

**Der Redoxsensor Rex –  
Ein Transkriptionsregulator der Lösungsmittelbildung  
in *Clostridium acetobutylicum***

**Dissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

**Mandy Wietzke**

geb. am 15.09.1981 in Rostock

aus Rostock

Rostock, Juni 2013

Gutachter:	<b>Prof. Dr. Hubert Bahl</b> Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie
	<b>Prof Dr. Martin Hagemann</b> Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biowissenschaften, Pflanzenphysiologie
Datum der Einreichung:	29. Mai 2013
Datum der Verteidigung:	27. September 2013

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Physiologie und Zellzyklus von <i>Clostridium acetobutylicum</i>	2
1.2 Kohlenstoff- und Elektronenfluss in <i>C. acetobutylicum</i>	3
1.3 Aerobe Bakterien und Redoxhomöostase	5
1.4 Einfluss des Redoxstatus auf die Solventogenese in <i>C. acetobutylicum</i>	6
1.5 Ziele der Arbeit	8
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1 Organismen und Plasmide	9
2.2 Nährmedien	9
2.2.1 Nährmedien für <i>Clostridium acetobutylicum</i>	9
2.2.2 Medium für <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.3 Medienzusätze	12
2.2.4 Titan-(III)-NTA-Lösung	12
2.3 Stammkulturen und Reinheitskontrolle	13
2.4 Anaerobe Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i>	13
2.4.1 Anzucht in statischer Kultur („Batch“-Kultur)	13
2.4.2 Anzucht in kontinuierlicher Kultur (Chemostat)	14
2.4.3 Anzucht auf Festmedium	14
2.5 Bestimmung physiologischer Parameter	15
2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte	15
2.5.2 Berechnung der Wachstumsrate	15
2.5.3 Bestimmung des pH-Wertes	15
2.5.4 Lichtmikroskopie	15
2.5.5 Gaschromatographie	15
2.5.6 Bestimmung der gebildeten Gasprodukte	16
2.5.7 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung	16
2.5.8 Optisch-enzymatische Laktatbestimmung	17
2.5.9 Bestimmung der Trockenmasse	18
2.6 Isolierung von Nukleinsäuren	18
2.6.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	18
2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.6.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	18

2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	19
2.7 Molekularbiologische Standardmethoden	19
2.7.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	19
2.7.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	19
2.7.2.2 Isopropanolfällung	19
2.7.2.3 Natriumacetatfällung	20
2.7.2.4 Ammoniumacetatfällung	20
2.7.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	20
2.7.3 Agarosegelektrophorese	20
2.7.3.1 Standard-Gelektrophorese	20
2.7.3.2 Denaturierende Gelektrophorese	21
2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren	22
2.8.1. Primerdesign	22
2.8.2 PCR-Techniken	22
2.8.2.1 Standard-PCR-Reaktionsbedingungen	22
2.8.2.2 „High Fidelity“-PCR	23
2.8.2.3 „Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR	24
2.8.3 Enzymatische Modifikation von DNA	24
2.8.3.1 Spezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	24
2.8.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	25
2.8.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten	25
2.9 Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen	26
2.9.1 DNA-Transfer in <i>E. coli</i>	26
2.9.1.1 CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation in <i>E.coli</i>	26
2.9.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	26
2.9.2 DNA-Transfer in <i>C. acetobutylicum</i>	26
2.9.2.1 Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> durch Elektroporation	26
2.10 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	27
2.10.1 Sonden-Markierung	27
2.10.2 Übertragung von DNA auf Membranen (Southern Blot)	27
2.10.2.1 Southern Hybridisierung	28
2.10.2.2 Detektion Digoxigenin markierter DNA	29
2.10.3 Übertragung von RNA auf Membranen (Northern Blot)	30
2.10.3.1 Northern Hybridisierung	30
2.10.3.2 Detektion Digoxigenin markierter DNA (Northern)	31

2.11 ClosTron-Insertionsmutagenese	32
2.11.1 Erzeugung genspezifischer pMTL007C-E2 Vektoren	32
2.11.2 Transformation in <i>C. acetobutylicum</i>	32
2.11.3 Nachweis der Insertion	33
2.11.3.1 PCR-Screening	33
2.11.3.2 Southern Hybridisierung	33
2.12 Bestimmung der intrazellulären Nukleotide	34
2.12.1 Bestimmung von ATP und ADP	34
2.12.1.1 Extraktion von ATP und ADP	34
2.12.1.2 Enzymatische ATP/ADP-Bestimmung	34
2.12.2 Bestimmung von NAD(P)H und NAD(P) <sup>+</sup>	35
2.12.2.1 Extraktion von NAD(P)H und NAD(P) <sup>+</sup>	35
2.12.2.2 Enzymatische NAD(P)H/NAD(P) <sup>+</sup> -Bestimmung	35
2.13 Arbeiten mit Proteinen	36
2.13.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall	36
2.13.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.13.3 Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepharose	37
2.13.4 Polyacrylamidgelektrophorese	37
2.13.4.1 SDS-PAGE	37
2.13.4.2 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie	38
2.13.5 „Electro mobility shift assay“ (EMSA)	38
2.13.6 Enzymassays	39
2.13.6.1 Thiolase Assay	39
2.13.6.2 Crotonase Assay	40
2.13.6.3 Alkohol-Dehydrogenase Assay	40
2.13.6.4 Hydrogenase Assay	41
2.13.6.5 Acetat- und Butyratkinase Assay	41
2.13.6.6 Phosphotransbutyrylase Assay	42
2.13.6.7 Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase Assay	42
2.13.6.8 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Assay	43
2.14 Bezugsquellen	43
<b>3 Experimente und Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1 Identifikation des Repressors Rex	45
3.2 Funktionelle Analyse des potentiellen Repressors Rex	47
3.2.1 Klonierung und Überexpression von Rex	47

3.2.1.1	Klonierung von <i>rex</i> in den pT-Vektor	48
3.2.1.2	Heterologe Expression von Rex	50
3.2.2	Promotor-Bindungsstudien von Rex <i>in vitro</i>	51
3.2.2.1	Amplifikation von Promotorfragmenten	51
3.2.2.2	,Electrophoretic mobility shift assays' (EMSA)	52
3.3	Erzeugung einer Rex-Insertionsmutante	54
3.3.1	Erzeugung genspezifischer pMTL007C-E2 Klone	55
3.3.2	Nachweis der Insertion	57
3.3.2.1	PCR-Screening	57
3.3.2.2	Southern Hybridisierung	58
3.4.	Plasmid basierte Komplementation von <i>C. acetobutylicum rex::int(95)</i>	60
3.4.1	Klonierung von <i>rex</i> in den pCons:: <i>upp</i> -Vektor	60
3.5	Charakterisierung von <i>C. acetobutylicum rex::int(95)</i>	62
3.5.1	Glukose-Fermentation in statischen Kulturen	62
3.5.2	Wasserstoff-/Kohlenstoffdioxid-Messung	67
3.5.3	Expressionsanalyse von potentiell Rex regulierten Genen	68
3.5.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten	70
3.5.5	Bestimmung der intrazellulären Nukleotide	72
3.6	Beeinflussung der Elektronenübertragung	74
3.6.1	Kultivierung in Gegenwart von Methylviologen	75
3.7	Kontinuierliche Kultur von <i>C. acetobutylicum rex::int(95)</i>	78
3.7.1	Glukose-Fermentation in kontinuierlichen Kulturen	79
3.7.2	Verifikation der Mutation während kontinuierlicher Kulturführung	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1	Identifizierung von Rex als Transkriptionsregulator in <i>C. acetobutylicum</i>	84
4.1.1	Lokalisation, Proteinstruktur und Funktion von Rex	84
4.1.2	Promotor-Bindungsstudien <i>in vitro</i>	88
4.2	Wachstumsphysiologie einer <i>rex</i> -negativen Mutante	90
4.2.1	Mutantenerzeugung und Komplementation	90
4.2.2	Wachstum unter statischen Kulturbedingungen	91
4.2.3	Wachstum unter kontinuierlichen Kulturbedingungen	93
4.2.4	Rex-regulierte Gene und Enzyme	95
4.3	Einfluss von Rex auf die Redoxhomöostase	98
4.4	Rex als Regulator der Solventogenese	103

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>121</b>
	Danksagung	130
	Lebenslauf	131
	Selbständigkeitserklärung	132

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosin-5-diphosphat
AP	alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5-triphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
C	Cytosin
C.	<i>Clostridium</i>
Cm	Chloramphenicol
d	Desoxy-, Dicke
Da	Dalton
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
EBS	exon binding site
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	"et alteri" (und andere)
Em	Erythromycin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
konz.	konzentriert
l	Liter, Länge
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
μ	mikro ( $10^{-6}$ )

m	Meter, milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar
mind.	mindestens
mod.	modifiziert
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano ( $10^{-9}$ )
N	Normal
N-	Amino
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	,open reading frame'
PAGE	Polyacrylamidgel
PCR	,Polymerase Chain Reaction'
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Streptomyces</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
term.	terminal
theoret.	theoretische
Thiam	Thiamphenicol
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
T	Thymin
T.	<i>Thermus</i>
U	Unit
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

## 1 Einleitung

Die Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation von Clostridien gehört nach der Ethanolproduktion durch *Saccharomyces cerevisiae* zu den am längsten und umfangreichsten industriell genutzten Fermentationsprozessen weltweit (Dürre und Bahl, 1996; Dürre, 2008; Jones und Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008b; Lütke-Eversloh und Bahl, 2010). Die mikrobielle Bildung von Lösungsmitteln wie Butanol und Aceton wurde erstmalig im Jahr 1862 charakterisiert. Zu diesem Zeitpunkt beschrieb der französische Forscher Louis Pasteur den fermentativen Prozess seiner sogenannten „Vibrionen butyrique“ in anaeroben Kulturen (Pasteur, 1862). Es ist sehr wahrscheinlich, dass hier bereits ohne direktes Wissen eine Anreicherung von Butyrat bildenden Clostridien beschrieben wurde. Die Grundlage der industriellen ABE-Fermentation bildete jedoch die Isolierung des Bakteriums *Clostridium acetobutylicum* durch Chaim Weizman um 1915. Dieser strikt anaerobe Mikroorganismus *C. acetobutylicum* produzierte natürlicherweise große Mengen an Aceton und Butanol.

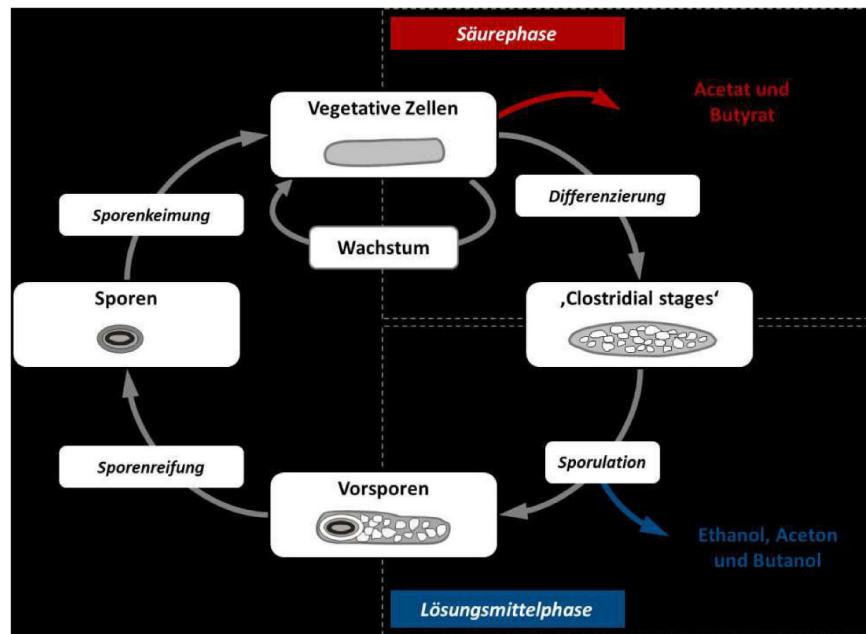
Erste Produktionsanlagen zur ABE-Fermentation wurden zur Zeit des ersten Weltkriegs errichtet, um so Aceton zur Herstellung von Kordit (rauchschwaches Schießpulver) zu synthetisieren, wobei Butanol im Gegensatz zu Aceton nur ein unerwünschtes Nebenprodukt darstellte. Mit der aufstrebenden Automobilindustrie nach dem Krieg und der damit einhergehenden Verwendung von Lösungsmitteln in der Lackherstellung stieg auch der Bedarf an Butanol. Dennoch verlor die fermentative Butanolproduktion nach 1950 stetig an Relevanz und wurde durch die weitaus wirtschaftlicheren und effizienteren petrochemischen Produktionsverfahren verdrängt (Dürre, 2008; Jones und Woods, 1986). Die Ölkrise 1973 und die Begrenztheit fossiler Brennstoffe führte zu neuem Interesse an der Lösungsmittelproduktion durch *C. acetobutylicum* in Wissenschaft und Wirtschaft. Auch vor dem Hintergrund immer steigender Erdölpreise und einem positiv veränderten Umweltbewusstsein verstärkte sich der Fokus auf die biotechnologische Herstellung von *n*-Butanol als Alternativtreibstoff (Dürre, 2008; Jones und Woods 1986; Lee *et al.*, 2008a). Die daraus resultierende intensive Forschung an *C. acetobutylicum* führte dazu, dass sich das Bakterium zu einem Modellorganismus für die Molekularbiologie und Genetik von apathogenen Clostridien entwickelte (Young *et al.*, 1989). In der jüngeren Vergangenheit führte die Entwicklung und Etablierung von zahlreichen Methoden zur genetischen Modifikation des Organismus, vor allem um die Butanolausbeute zu erhöhen, zu wegweisenden Ergebnissen in der Erforschung der Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum* (Heap *et al.*, 2007; 2010; Mermelstein und Papoutsakis, 1993; Tummala *et al.*, 1999; 2003). Aktuelle Arbeiten konzentrieren sich neben ‚Metabolic engineering‘-Strategien auch auf systembiologische Ansätze,

um *in silico*-Modelle zur funktionellen Gesamtorganisation des Stoffwechsels zu entwickeln (Haus *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2010; Millat *et al.*, 2013).

## 1.1 Physiologie und Zellzyklus von *Clostridium acetobutylicum*

*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ist ein Gram-positives, strikt anaerobes, stäbchenförmiges und apathogenes Bakterium aus dem Stamm der *Firmicutes* (Madigan *et al.*, 2000). Es hat seinen natürlichen Lebensraum in Böden, Schlammern, Sedimenten sowie Abwässern und ist fähig, Endosporen zubilden. Das besondere Kennzeichen des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* ist der biphasische Gärungsverlauf. Hierbei werden in der exponentiellen Wachstumsphase aus Kohlenhydraten neben CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> die organischen Säuren Butyrat und Acetat gebildet. Die Säuren werden ausgeschieden und führen zum Absinken des pH-Wertes in der Umgebung. Aus dem Grund wird diese Wachstumsphase als Säurephase (Acidogenese) bezeichnet. In der anschließenden zweiten Wachstumsphase erfolgt ein Umschalten des Stoffwechsels, wobei die verbliebenen Kohlenhydrate und die zuvor gebildeten Säuren vorrangig zu den neutralen Lösungsmitteln Aceton, Butanol und Ethanol vergoren werden. Der Organismus befindet sich nun in der sogenannten Lösungsmittelphase (Solventogenese) (Dürre, 2008; Jones, 2001; Jones und Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008b; Lütke-Eversloh und Bahl, 2011). Das Umschalten von Säure- zu Lösungsmittelphase wird allgemeinhin als Lösungsmittel-‘Shift’ bezeichnet und durch eine Reihe von Faktoren ausgelöst. Zu diesen zählen der sinkende pH-Wert, die Konzentration an Säuren, Nährstoffmangel bei gleichzeitigem Kohlenstoffüberschuss, aber auch die internen ATP/ADP- und NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnisse (Bahl *et al.*, 1982a; Bahl und Gottschalk, 1984; Hüsemann und Papoutsakis, 1986; Grupe und Gottschalk, 1992).

Neben dem Phänomen der Lösungsmittelproduktion zeichnet sich *C. acetobutylicum* durch das Auftreten typischer Zellmorphologien aus (Jones *et al.*, 1982). Zunächst differenzieren vegetative Stäbchen zu sogenannten ‚Clostridial stage‘-Zellen (Abb. 1.1). Dabei handelt es sich um Granulose akkumulierende Zellen in einer charakteristischen Zigarrenform. Anschließend entwickeln sich aus diesem Zellstadium Vorsporen, welche zu Endosporen ausreifen können (Long *et al.*, 1984b). Sporen sind Ruhestadien von Bakterien, die sich durch ausgeprägte Resistenzen auszeichnen und somit zur Überdauerung langer Perioden ungünstiger Umwelteinflüsse fähig sind (Cohn, 1876; Koch, 1876; Madigan *et al.*, 2000). Unter vorteilhaften Bedingungen entwickeln sich aus den Sporen während der Sporenkeimung wieder vegetative Zellen, womit sich der Zellzyklus schließt (Abb. 1.1).



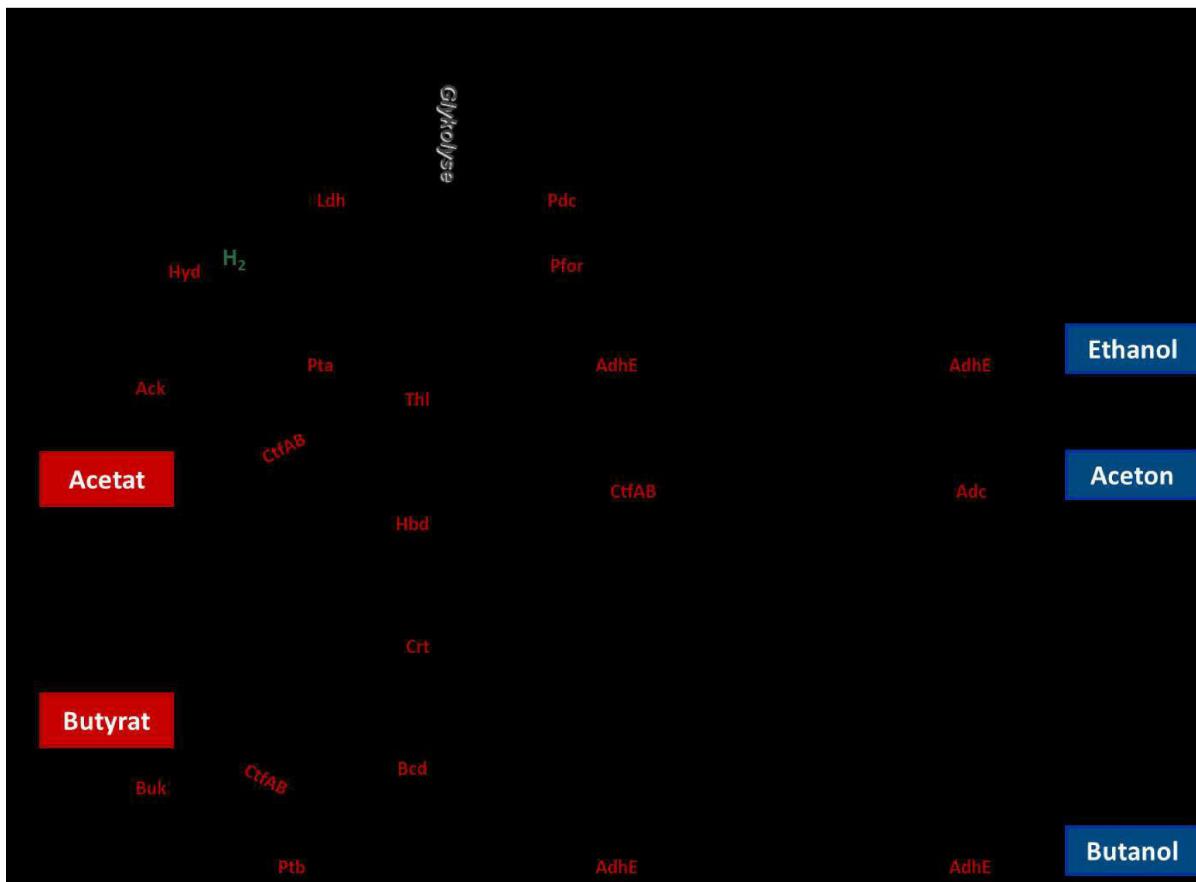
**Abb. 1.1:** Zellzyklus von *C. acetobutylicum* (Lütke-Eversloh und Bahl, 2011; mod.). Morphologische Veränderungen im Zellzyklus sind mit der Lösungsmittelproduktion und Sporulation assoziiert.

## 1.2 Kohlenstoff- und Elektronenfluss in *C. acetobutylicum*

Der Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ist durch zwei unterschiedliche Wachstumsphasen charakterisiert. Eine Übersicht über den Kohlenstoff- und Elektronenfluss von *C. acetobutylicum* zeigt dazu die Abbildung 1.2.

In der Glykolyse wird über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg die entsprechende Kohlenstoffquelle unter der Bildung von ATP und NAD(P)H zu Pyruvat umgesetzt. Neben in der Glykolyse generierten ATP wird zudem Energie über die Substratkettensphosphorylierung während der Acetat- und Butyratsynthese gewonnen. Hierbei wird nur ein Teil der produzierten Reduktionsäquivalente der Glykolyse wieder oxidiert. Überschüssige Elektronen gibt *C. acetobutylicum* in Form von molekularem Wasserstoff in die Umgebung ab, um so das intrazelluläre Redoxgleichgewicht aufrecht zu erhalten. Während der Acidogenese ist der Kohlenstofffluss also hauptsächlich auf die Säurebildung und der Elektronenfluss auf die Wasserstoffproduktion ausgerichtet. Es werden so die größtmöglichen Energieausbeuten für das anaerobe Wachstum erzielt. Die ausgeschiedenen Säuren führen zum Absinken des externen pH-Wertes. Um einer Zerstörung des essentiellen Protonengradienten an der Membran durch den ausgelösten Stress entgegenzuwirken, erfolgt der Wechsel von Acidogenese zu Solventogenese (Dürre, 2008; Paredes *et al.*, 2005). Während der Solventogenese werden die organischen Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol in einem Verhältnis von 3:6:1 gebildet. Die Alkoholbiosynthese erfolgt dabei durch Dehydrogenase vermittelte Reaktionen, wobei das

überschüssige NAD(P)H aus der Säurephase verbraucht und die regenerierten Elektronenakzeptoren (NAD(P)<sup>+</sup>) wieder der Glykolyse zugeführt werden. Durch die Produktion von Ethanol und Butanol wird der Elektronenüberschuss abgebaut, was wiederum eine verminderde Wasserstoffproduktion nach sich zieht (Jones und Woods, 1986).



**Abb. 1.2: Acidogenese und Solventogenese von *C. acetobutylicum* (Lütke-Eversloh und Bahl, 2011; mod.).**  
Gezeigt ist der Stoffwechsel der Säure- und Lösungsmittelphase mit den charakteristischen Endprodukten. Die roten Kästchen stellen die Säuren und die blauen Kästchen die Lösungsmittel dar. Die roten Buchstaben geben die entsprechend involvierten Enzyme an. Ldh, Lactat-Dehydrogenase; Pdc, Pyruvat-Decarboxylase; Hyd, Hydrogenase; Pfor; Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Fd, Ferredoxin; Pta, Phosphotransacetylase; Ack, Acetat-Kinase; AdhE, Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase; CtfAB, Acetacetyl Acyl-CoA-Transferase; Adc, Acetacetat-Decarboxylase; Thl, Thiolase; Hbd, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; Crt, Crotonase; Bcd, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; Etf, Elektronen-Transfer-Flavoprotein; PtB, Phosphotransbutyrylase; Buk, Butyrat-Kinase. AAc-CoA, Acetacetyl-CoA; Ac/Bu, Acetat/Butyrat; Ac-CoA/Bu-CoA, Acetyl-CoA/Butyryl-CoA; ox, oxidiert; red, reduziert.

Da die Lösungsmittelproduktion unter anderem von der intrazellulären NAD(P)H-Verfügbarkeit abhängig ist, liegt das derzeitige wissenschaftliche Hauptaugenmerk auf der Veränderung des Elektronenflusses zur Erhöhung der Butanolproduktion. Theoretisch ist in Bezug auf einen ausgeglichenen Kohlenstoff- und Elektronenfluss in *C. acetobutylicum* sogar eine Homo-Butanol-Fermentation möglich (Lütke-Eversloh und Bahl, 2011). Dazu würde Glukose unter der Voraussetzung, dass kein molekularer Wasserstoff gebildet wird, zu Butanol und CO<sub>2</sub>

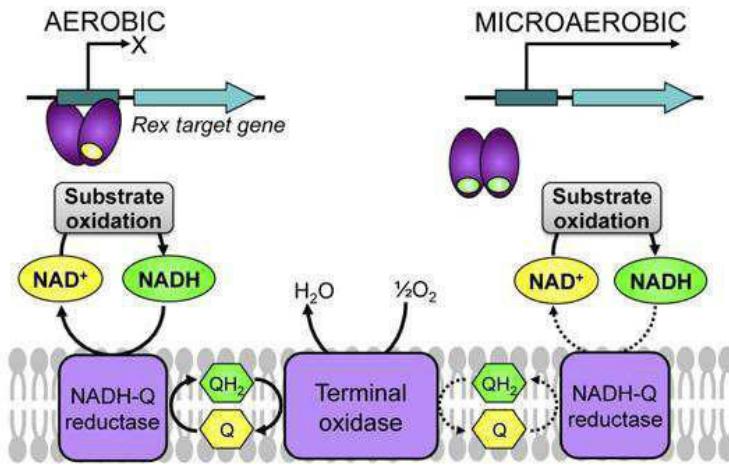
umgesetzt werden. So könnten aus einem mol Glukose in der Glykolyse zwei mol ATP generiert werden. Die entstandenen Reduktionsäquivalente werden anschließend auf dem Stoffwechselpfad zu Butanol recycelt. Zahlreiche Arbeiten der jüngeren Zeit beschäftigten sich mit ‚Metabolic engineering‘-Ansätzen zur Erhöhung der Produktivität und Ausbeute der Butanolproduktion und zur Reduzierung von gebildeten Nebenprodukten (Cooksley *et al.*, 2012; Jiang *et al.* 2009; Lehmann und Lütke-Eversloh, 2011; Kuit *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2012a; Lehmann *et al.*, 2012b). Die Tatsache, dass es bis dato nicht gelungen ist, einen ausschließlich Butanol produzierenden Stamm von *C. acetobutylicum* oder anderen Clostridien zu erschaffen, weist jedoch auf eine komplexe Beziehung von Kohlenstoff- und Elektronenfluss hin.

### 1.3 Aerobe Bakterien und Redoxhomöostase

In lebenden Zellen liefert die glykolytische Umsetzung von Glukose zu Pyruvat Energie in Form von ATP, wobei außerdem Reduktionsäquivalente in Form von NAD(P)H gebildet werden. Dieser Prozess setzt jedoch nur einen Teil der in einem Glukosemolekül enthaltenen Energie frei. Deutlich mehr Energie entsteht, wenn Pyruvat mit Eintritt in den Zitronensäurezyklus zu Acetyl-CoA umgesetzt und anschließend das gebildete NAD(P)H in der Atmungskette in Anwesenheit des Elektronenakzeptors O<sub>2</sub> oxidiert wird (Singh *et al.*, 2009). Aus der Oxidation von NAD(P)H resultiert ein elektrochemischer Protonengradient, dessen Energie dazu genutzt wird, während der Atmungskettenphosphorylierung ATP aus ADP und anorganischem Phosphat zu synthetisieren. Dabei erfordern das Wachstum und der Stoffwechsel von Bakterien die Aufrechterhaltung einer Redoxhomöostase. Ist jedoch nicht ausreichend Sauerstoff in der Umgebung vorhanden, führt dies dazu, dass der Atmungskette der Elektronenakzeptor entzogen und NAD(P)H in der Zelle angereichert wird.

Im Laufe der Zeit haben aerobe Mikroorganismen die Fähigkeit entwickelt, Veränderungen des internen Redoxzustands zu erfassen und sich anzupassen. Diese Fähigkeit ist essentiell für das Überleben von Aerobiern. Es konnte gezeigt werden, dass in vielen Gram-positiven Bakterien der Transkriptionsregulator Rex an der Erfassung der intrazellulären NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentrationen und der Regulation der Expression von Genen der Atmungskette sowie des Fermentationsmetabolismus beteiligt ist (Brekasis und Paget, 2003; Gyan *et al.*, 2006; McLaughlin *et al.*, 2010; Pagels *et al.*, 2010; Sickmier *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008, 2011). Mittels Analysen der Röntgenkristallstruktur von Rex aus *Bacillus subtilis* und *Thermus aquaticus* konnten zwei charakteristische Domänen identifiziert werden. Es handelt sich hierbei zum einen um eine Dinukleotid-Bindedomäne und zum anderen um eine DNA-Bindedomäne

(Sickmier *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Ein von McLaughlin *et al.* (2010) postulierte Modell zur Rex vermittelten Genregulation im aeroben Bakterium *T. aquaticus* ist in Abb. 1.3 dargestellt.



**Abb. 1.3:** Modell der Rex-Regulation in *Thermus aquaticus* (McLaughlin *et al.*, 2010). Gezeigt ist ein Schema zur Rex vermittelten Genexpression unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen (Erläuterungen siehe Text). Reduzierte Coenzyme (grün), oxidierte Coenzyme (gelb), Rex (violett).

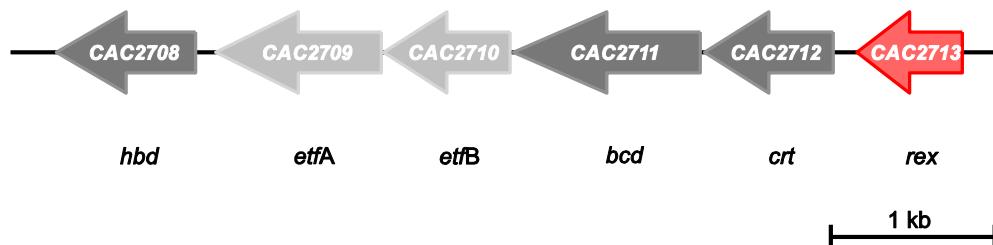
Während der Substratoxidation unter aeroben Bedingungen bindet der Repressor Rex  $\text{NAD(P)}^+$  und reprimiert die Genexpression. Demgegenüber führt ein Anstieg von Reduktionsäquivalenten bei mikroaerobem Wachstum zur Bindung von  $\text{NAD(P)H}$  und somit zur Konformationsänderung von Rex. Dies hat wiederum eine Verdrängung der Repressors von seiner DNA-Erkennungssequenz und Aktivierung der Genexpression zur Folge (Abb. 1.3). In *B. subtilis* umfasst das Rex-Regulon unter anderem die Regulation des Cytochrom-*bd*-Oxidase-Komplex, der NADH-Dehydrogenase und der NADH-abhängigen Laktat-Dehydrogenase (Gyan *et al.*, 2006). Unter mikroaeroben Bedingungen kann  $\text{O}_2$  so effizient genutzt und das überschüssige  $\text{NAD(P)H}$  durch die Bildung von Laktat recycelt werden. Auch in *Staphylococcus aureus* konnte gezeigt werden, dass Rex durch die Bindung an eine sogenannte Rex-Box (Rex-Bindemotiv) die Genexpression reprimiert (Pagels *et al.*, 2010) und als eine Art ‚Master regulator‘ in einem Rex-Superregulon unter Sauerstofflimitierung fungiert (Hecker *et al.*, 2009).

## 1.4 Einfluss des Redoxstatus auf die Solventogenese in *C. acetobutylicum*

Basierend auf dem Kohlenstoff- und Elektronenfluss während des biphasischen Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* lassen sich zwei unterschiedliche Redoxzustände definieren: (1) zusätzlich zum glykolytisch gebildeten ATP wird Energie während der

Säurereproduktion konserviert und die Redoxbalance durch die Bildung von Wasserstoff ausgeglichen, (2) mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase erfolgt die Regeneration von NAD(P)<sup>+</sup> durch die Initiation der Alkoholbiosynthese, was zu einer verminderten Wasserstoffproduktion führt. Der Stoffwechsel wechselt dabei, aufgrund des ansteigenden NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Levels in der Acidogenese, vom oxidativen (1) in den reduktiven (2) Redoxzustand. Wie oben bereits beschrieben, wird dies als Lösungsmittel-,Shift' bezeichnet. Dabei sind die genetischen und regulatorischen Hintergründe während des Wechsels von Säure- zur Lösungsmittelproduktion bis heute wenig geklärt. Jedoch wurde in Arbeiten von Bahl und Gottschalk (1988) sowie Grupe und Gottschalk (1992) postuliert, dass ein Anstieg von Reduktionkraft einen „Shift“-induzierenden Parameter darstellt und die intrazellulären NAD(P)H-Konzentrationen eine zentrale Rolle im anaeroben Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* einnimmt. Um Einblicke in Mechanismen des Lösungsmittel-Shifts' zubekommen, wurden in der Vergangenheit unter anderem verschiedene Fermentationsexperimente und wachstumsspezifische Enzymmessungen oder aber Bestimmungen weiterer physiologischer Parameter der Säure- und Lösungsmittelphase in *C. acetobutylicum* durchgeführt (Girbal *et al.*, 1995; Girbal und Soucaille, 1998). Dies beinhaltete z. B. die Applikation von Kohlenstoffmonoxid, die Anwendung von künstlichen Elektronencarriern wie Methylviologen oder Neutralrot, Eisenlimitierungen aber auch die Erzeugung eines erhöhten H<sub>2</sub>-Drucks und die Kontrolle des Redoxpotentials während der Kultivierung (Bahl *et al.*, 1986; Girbal *et al.*, 1995; Grupe und Gottschalk, 1992; Hüsemann und Papoutsakis, 1989; Doremus *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1984; Pegin *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2012; Hönicke *et al.*, 2012). Weiterhin fanden Substratgemische aus Glukose und Glyzerin Anwendung in der Fermentation von *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994). All diese Ansätze zeigten, dass der Stoffwechsel durch die Verschiebung des intrazellulären NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Ratios zu Gunsten von NAD(P)H „künstlich“ von der Wasserstoffproduktion in Richtung Alkoholbildung gelenkt werden kann. Dies führte zu der Annahme, dass ein putativer Redoxsensor in *C. acetobutylicum* existiert, der den Redoxzustand sensorisch wahrnimmt und an der Initiation der Solventogenese beteiligt ist. Im Genom von *C. acetobutylicum* wurde basierend auf Sequenzabgleichen mit bekannten Rex-Redoxregulatoren aus aeroben Bakterien dem Genprodukt des offenen Leserahmens (ORF) CAC2713 eine Funktion als „Redox sensing transcriptional repressor Rex“ zugeordnet (Nölling *et al.*, 2001; Paredes *et al.*, 2004). Interessanterweise befindet sich dieser ORF in unmittelbarer Nachbarschaft zum Butyryl-CoA-Synthese-(bcs)-Operon, dessen Gene eine zentrale Rolle im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* einnehmen (Boynton *et al.*, 1996; Hillmann, 2009) (Abb. 1.4). Der Zusammenhang zwischen dem NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis als entscheidenden

Faktor während des Lösungsmittel-,Shifts' und dem putativen Redoxregulator Rex (CAC2713) in *C. acetobutylicum* ATCC 824 sollte während dieser Arbeit geklärt werden.



**Abb. 1.4:** Anordnung von *rex* im Genom von *C. acetobutylicum* (Wietzke und Bahl, 2012; mod.). Es ist die genetische Anordnung von *rex* (CAC2713) vor dem Butyryl-CoA-Synthese-(*bcs*)-Operon dargestellt. Die Richtungspfeile repräsentieren die offenen Leserahmen und deren fortlaufende Nummerierung. *rex*, 'Redox sensing transcriptional repressor Rex'; *crt*, Crotonase; *bcd*, Butyryl-CoA-Dehydrogenase; *etfA/B*, Elektronen-Transfer-Flavoprotein; *hbd*, 3-Hydroxybutyryl-CoADehydrogenase.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Das intrazelluläre NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis spielt sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle beim Lösungsmittel-,Shift' von *C. acetobutylicum*. In anderen Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* und *S. aureus* wird der interne Redoxstatus durch den Transkriptionsregulator Rex reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher das putative Rex-Protein (CAC2713) in *C. acetobutylicum* ATCC 824 näher untersucht werden. Dies sollte zum einen für den Nachweis dienen, dass dem genannten Protein auch in *C. acetobutylicum* eine Rolle als Redoxregulator zukommt. Zum anderen sollte die Rolle von Rex die dem Lösungsmittel-,Shift' zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen geklärt werden.

Hierzu sollte Rex heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, aufgereinigt und für *in vitro*-Bindungsstudien an potentielle Promotorsequenzen von Zielgenen eingesetzt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss der NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnisse auf die Bindung von Rex an Promotorbereiche untersucht werden. Um eine regulatorische Aktivität von Rex auch *in vivo* zu zeigen, war die Konstruktion einer Rex-Defektmutante in *C. acetobutylicum* und deren Charakterisierung auf Transkriptions- und physiologischer Ebene vorgesehen. Diese Arbeit soll weitere Einblicke in die Mechanismen des Lösungsmittel-,Shifts' liefern und gegebenenfalls neue Alternativen aufzeigen, um zukünftig die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* zu verbessern. Die wichtigsten im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurden in der Publikation Wietzke und Bahl (2012) veröffentlicht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen und Plasmide

Die verwendeten Organismen sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Organismen

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	American Type Culture Collection
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>	Gruppe II Intron integrierte zw. 95./ 96. Bp von <i>rex</i> (CAC2713), Erm <sup>R</sup>	Laborsammlung Nr. 163/ Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , φ80lacZΔM15, Δ( <i>lacZYA</i> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ <sup>-</sup>	Laborsammlung Nr. 272/ Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> ER2275	<i>mcrA</i> , <i>mcrBC</i> , <i>hsdR</i> , <i>recA1</i>	Laborsammlung Nr. 271/ Mermelstein and Papoutsakis, 1993
<i>Escherichia coli</i> BL 21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> <i>hsdSB(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>)</i> , <i>gal dcm</i> , <i>rne131</i>	Novagen

### 2.2 Nährmedien

#### 2.2.1 Nährmedien für *Clostridium acetobutylicum*

Anaerobe Medien wurden nach Breznak und Costilow (1994) hergestellt. Nach Einstellung des pH-Wertes wurde durch Aufkochen bis zum Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (0,1 % [w/v]) gelöster Sauerstoff entfernt. Während der Abkühlung verhinderte eine Durchgasung mit molekularem Stickstoff ein erneutes Lösen von Sauerstoff. Die Kulturgefäße wurden luftdicht verschlossen und anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert. Bei nicht ausreichend anaeroben Medien konnte vor der Verwendung niedervalentes Titan (Ti-(III)-NTA) (2.3.4) als Reduktionsmittel bis zum erneuten Farbumschlag des Redoxindikators zu getropft werden. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe von Medienzusätzen (Tab. 2.2).

**CGM (clostridial growth medium)** (Roos *et al.*, 1985; mod.)

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

1) Glukose wurde dem Medium nach dem Autoklavieren aus einer 50 %igen [w/v], sterilen und sauerstofffreien Stammlösung zugegeben.

2) Diese Komponente wurde aus Stammlösungen vor dem Autoklavieren zugegeben.

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

Glukose x H <sub>2</sub> O	60	g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,55	g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,55	g	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,22	g	
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	11	mg	
Acetat (konz.)	2,3	ml	
p-Aminobenzoesäure (8 mg/l) <sup>3)</sup>	10	ml	
Biotin (0,08 mg/l) <sup>4)</sup>	1	ml	
MES	21,3	g	
Resazurin (0,1 % [w/v]) <sup>2)</sup>	1	ml	
<i>A. dest.</i>	ad	1000	ml

2) bis 4) Diese Komponenten wurden aus den angesetzten Stammlösungen vor dem Autoklavieren zugegeben.

Nach pH-Einstellung auf 6,6 mit NH<sub>4</sub>OH erfolgte die Zugabe der Vitamin-Stammlösungen, erst dann wurde das MES hinzugefügt. Dieses Medium kann zudem zur Herstellung einer Sporensuspension verwendet werden. Zeitweise erfolgte die Herstellung ohne das Zufügen von Acetat, aus diesem Grund wurde erst nach der MES-Zugabe der pH-Wert eingestellt.

**RCA-Medium (Reinforced clostridial agar)**

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

Der pH-Wert entsprach in der Regel ohne Einstellen 6,8. Dieses Medium wurde als fertige Komponente geliefert (Oxoid GmbH, Wesel).

**Phosphatlimitiertes Minimalmedium für kontinuierliche Kulturen (Fischer *et al.*, 2006)**

Glukose x H <sub>2</sub> O	600	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,05	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,5	g
NaCl	0,15	g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,15	g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,15	g
MnSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,225	g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,225	g
p-Aminobenzoesäure	0,03	g
Thiamin-HCl	0,03	g
Biotin	1,5	mg
A. dest.	ad	15 l

Der pH-Wert des Mediums wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf 2 eingestellt. Anschließend wurde es mit N<sub>2</sub>-Überdruck durch einen Filter EKS 14ØD (Pall SeitzSchenk Filtersysteme, Bad Kreuznach) in eine autoklavierte Mediumsvorratsflasche sterilfiltriert.

## 2.2.2 Medium für *Escherichia coli*

*E. coli*-Zellen wurden entweder in LB-Flüssigmedium oder auf Nähragarplatten bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe von Medienzusätzen.

### LB-Medium (Luria-Bertani) (Sambrook und Russell, 2001)

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

Der pH-Wert lag ohne Einstellung zwischen 7 bis 7,5. Zur Herstellung von Festmedium wurde der Nährösung vor dem Autoklavieren 1,5 % [w/v] Agar-Agar (2.14) zugesetzt.

## 2.2.3 Medienzusätze

Im Bedarfsfall wurden den Medien die in Tabelle 2.2 aufgeführten Zusätze zur Selektion beigemischt. Das entsprechende Antibiotikum wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf unter 50 °C steril zugesetzt.

Tab. 2.2: Medienzusätze

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	
Ampicillin	50 mg/ml in <i>A. dest.</i> (sterilfiltriert) <sup>1)</sup>	100	µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v]) <sup>2)</sup>	25	µg/ml
Erythromycin	50 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v]) <sup>2)</sup>	2,5	µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v]) <sup>2)</sup>	10	µg/ml
Thiamphenicol	50 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v]) <sup>2)</sup>	15	µg/ml

1) Porengröße 0,2 µm

2) In Ethanol gelöste Substanzen brauchen nicht sterilfiltriert werden.

## 2.2.4 Titan-(III)-NTA-Lösung

Zur Herstellung von 75 ml einer 100-mM-Titan-(III)-NTA-Lösung wurden 5,73 g Nitrilotriessigsäure (NTA) (400 mM) in 30 ml *A. dest.* und 20 ml 5 M NaOH gelöst. Anschließend wurde diese Lösung zur Sauerstoffentfernung mit Stickstoff durchgast. In einer Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation; Meinrup, Löhden) fand unter ständigem Rühren die Zugabe von 6,4 ml einer 15 %igen [w/v] TiCl<sub>3</sub>-Lösung und 10 ml einer anaerober 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung statt. Die fertige Lösung wurde mit anaerobem *A. dest.* aufgefüllt und sterilfiltriert.

Nitrilotriessigsäure (NTA)	5,73	g
5 M NaOH	20	ml
TiCl <sub>3</sub> -Lösung (15 % [w/v])	6,4	ml
2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung (anaerob)	10	ml
Anaerobes <i>A. dest.</i>	ad	75
		ml

## 2.3 Stammkulturen und Reinheitskontrolle

Alle verwendeten *C. acetobutylicum*-Stämme wurden als Sporensuspensionen in MS-MES-Medium (2.2.1) bei -20 °C gelagert. Bei Stämmen mit Sporulationsdefekt wurde eine 1 ml exponentiell wachsende CGM-Kultur mit 0,5 ml einer CGM-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) versetzt und bei -70 °C gelagert. Zur Stammhaltung der *E. coli*-Stämme wurden zu 1-ml-Aliquots exponentiell wachsender Zellen 0,5 ml einer LB-Glycerin-Lösung (60 % [v/v] Glycerin, LB-Medium [v/v]) gegeben, gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert. Eine vorübergehende Lagerung in LB-Medium (2.2.2) erfolgte bei 4 °C bis zu 4 Wochen, auf Festmedien bis zu 6 Wochen. Die Reinheit und Vitalität der Bakterienstämme wurde durch Ausstrich auf Nähragarplatten und mittels Lichtmikroskopie (2.6.4) überprüft.

## 2.4 Anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum*

### 2.4.1 Anzucht in statischer Kultur („Batch“-Kultur)

Da in wissenschaftlichen Abhandlungen der englische Begriff „Batch“-Kultur zunehmend als Ausdruck für Bakterienwachstum unter statischen Bedingungen genutzt wird, werden in dieser Arbeit beide Bezeichnungen synonym verwendet. Statische Kulturen von *C. acetobutylicum* wurden anaerob unter abgeschlossener N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen oder Müller&Krempel-Serumflaschen durchgeführt. Es dienten 0,1 Vol. Inokulum einer MS-MES-Sporensuspension (2.2.1) zum Animpfen einer 10 ml „Batch“-Kultur. Die Sporen wurden durch Pasteurisierung (10 min, 80 °C) reaktiviert. Nach dem Animpfen erfolgte eine Inkubation bei 37 °C. Diese Kulturen dienten zudem als Vorkultur für die Batch-Hauptkulturen in Müller&Krempel-Serumflaschen, die aufgrund des Druckanstiegs durch Gasentwicklung nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens gefüllt wurden. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in Komplexmedium (CGM, 2.2.1). Die Wachstumsexperimente wurden vornehmlich in MS-MES durchgeführt, dazu musste von der CGM-Vorkultur zuvor in eine MS-MES-Vorkultur überimpft werden. Diese wurde dann zur Inokulation der MS-MES-Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur wurde in der Regel mit einer optischen Dichte von 0,1 bis 0,2 inkuliert. Die Untersuchung des

Wachstums erfolgte durch eine regelmäßige Prüfung der optischen Dichte, des pH-Wertes, der Glukosekonzentration und der gebildeten Produkte.

#### **2.4.2 Anzucht in kontinuierlicher Kultur (Chemostat)**

Die kontinuierliche Kulturführung der Mutante *C. acetobutylicum rex::int(95)* wurde in einem Kulturgefäß mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 l durchgeführt. Die Vorbereitung der Vorkulturen verlief wie unter 2.5.1 beschrieben. Zwei 10 ml-MS-MES-Vorkulturen dienten zur Inokulation einer weiteren 200 ml MS-MES-Vorkultur. Diese wurde für 8 bis 16 h bei 37 °C inkubiert. Ausschließlich gut gasende Kulturen dienten anschließend zum Beimpfen des Kulturgefäßes. Der Aufbau des Chemostat erfolgte wie bei Janssen (2010) beschrieben. Der Fermentationsprozess wurde mit einer Regeleinheit vom Typ Biostat B (BBI, Melsungen) gesteuert. Die Kulturführung verlief bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und der pH-Wert wurde durch Zufuhr von 2 M KOH reguliert. Die Zufuhr des phosphatlimitierten Minimalmediums (2.2.1) erfolgte mit einer Durchflussrate von 0,075 h<sup>-1</sup>. Vor dem Animpfen wurde das mit 1,2 l MS-MES (2.2.1) gefüllte Kulturgefäß autoklaviert und anschließend während des Abkühlens mit Stickstoff durchgast. Vor dem Beimpfen des Kulturgefäßes mit 200 ml einer 8 bis 16 h alten, logarithmisch wachsenden Vorkultur wurde das Medium mit maximal 1 ml einer Titan-(III)-NTA-Lösung (2.2.4) bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin reduziert. Nach dem Beimpfen des Kulturgefäßes wurde die N<sub>2</sub>-Durchgasung beendet und die Rührung auf 50 Upm eingestellt. Nachdem die Kultur angewachsen war (OD<sub>600nm</sub> etwa 2 bis 3), wurde die Begasung ausgestellt und die Rührung auf 200 Upm erhöht. Zusätzlich erfolgte das Anschalten der Zufuhr des Vorratsmediums, was mit dem Beginn der kontinuierlichen Kulturführung einherging.

#### **2.4.3 Anzucht auf Festmedium**

Die anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium erfolgte bei 37 °C in der Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation; Meintrup, Lähden) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Dafür mussten die aeroben Nähragarplatten (RCA, 2.2.1) vor Verwendung 1 bis 2 Tage in der Anaeroben-Werkbank gelagert werden. Zur Reduktion von eingetragenem Sauerstoff wurde eine maximale Konzentration von 5 % [v/v] Wasserstoff zugegeben. Die regelmäßige Kontrolle der Sauerstoffkonzentration erfolgte mittels Indikatorpapier (Anaerobic Indicator BR55; Oxoid, Wesel).

## 2.5 Bestimmung physiologischer Parameter

### 2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen einen entsprechenden Leerwert in einem Spektralphotometer (Zeiss Spekol 1100; Jena Analytik, Jena) verfolgt. Proben von *C. acetobutylicum* Zellsuspensionen wurden in Plastikküvetten (Schichtdicke 1 cm) analysiert. Ab einer Zelldichte von OD<sub>600nm</sub> ca. 0,3 wurde die Suspension entsprechend verdünnt.

### 2.5.2 Berechnung der Wachstumsrate

Die Wachstumsrate ( $\mu$ ) ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase und wird wie folgt berechnet (Schlegel, 1992):

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)}$$

**Formel 1:** **Wachstumsrate.**  $x_t/x_0$ , Messwert zu den Zeitpunkten 1 und 2;  $t/t_0$ , Messwert zu den Zeitpunkten 1 und 2.

### 2.5.3 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde während der Kultivierung messtechnisch überwacht und nach Sedimentation (16.000 x g, 4 °C, 5 min) in zellfreiem Überstand gemessen.

### 2.5.4 Lichtmikroskopie

Die Analyse der Zellmorphologie wurde mittels Hellfeldmikroskopie (Olympus CHS-Mikroskop; Olympus, Hamburg) bei einer 400-fachen Vergrößerung (Objektiv A40LP) durchgeführt.

### 2.5.5 Gaschromatographie

Die Analyse und Quantifizierung flüssiger Gärungsprodukte erfolgte mit einem Gaschromatographen Agilent 7890A unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID) (Agilent, Böblingen) wie bei Lehmann (2012) beschrieben. Als Trägergas diente N<sub>2</sub>, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Neben Wasser und Sauerstoff konnten dadurch auch schweflige und chlorierte Substanzreste zurückgehalten werden. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff, wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt. Der Einsatz

einer mit Chromosorb 101 (80 bis 100 mesh) gepackten Säule erlaubte die Analyse sowohl von Alkoholen als auch von Carbonsäuren. Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden in 2-ml-Reaktionsgefäß en sedimentiert (12.000 x g, 5 min) und der zellfreie Überstand zur Bestimmung der Produktspektren verwendet.

### **2.5.6 Bestimmung der gebildeten Gasprodukte**

Um die gebildete Gasmenge in 100-ml-,Batch'-Kulturen zu bestimmen, wurden wassergefüllte Glaszyliner (1 l Fassungsvermögen) über Schläuche mit den Müller&Krempel-Serumflaschen verbunden. Das während des Wachstumsverlaufes produzierte Gas strömte über den Schlauch in den Gaszyliner und verdrängte das entsprechende Wasservolumen, welches in Erlenmeyerkolben aufgefangen und zu bestimmten Zeitpunkten mit Hilfe eines Messzyliners bestimmt werden konnte. Gleichzeitig erfolgte die Gasentnahme mit einer gasdichten Spritze. Die Analyse und Quantifizierung gasförmiger Gärungsprodukte erfolgte mit einem Gaschromatographen (7820A GC-System; Agilent, Böblingen) unter Verwendung eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors (WLD). Um die prozentualen Anteile an Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff am Gaschromatographen zu bestimmen, erfolgte anhand einer mit Eichgasen (10 % CO<sub>2</sub> [90 % H<sub>2</sub>], 50 % CO<sub>2</sub> [50 % H<sub>2</sub>], 80 % CO<sub>2</sub> [20 % H<sub>2</sub>]) erstellten Eichgerade. Die Quantifizierung der gasförmigen Produkte wurde durch manuelles Einspritzen von 100 µl Probe, die aus der Gasphase der Kultur genommen wurden, detektiert. Mit Hilfe der Eichgeraden konnten die Flächen der jeweiligen gemessenen Produkte aus den Proben mit den prozentualen Anteilen der Eichgase in Bezug gesetzt werden. Die gesamte Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm EZ Chrom Elite (Agilent, Böblingen). Unter folgenden Analysebedingungen konnten die Substanzen Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff detektiert werden:

Chromatographiesäule	:	50 M x 0,53 mm CP-Carbobond Silizium Säule
Säulentemperatur	:	155-197 °C, 9 °C/min
Trägergas	:	N <sub>2</sub> (30 ml/min)
Injektor	:	195 °C
Detektor	:	WLD
Probenvolumen	:	100 µl

### **2.5.7 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung**

Zur Bestimmung des Glukoseverbrauchs in *C. acetobutylicum* diente ein optisch-enzymatischer Test nach Bergmeyer (1983). Die im Medium verbliebene Glukose wurde mit Hilfe des Enzyms Hexokinase [EC 2.7.1.1] unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-Phosphat und ADP umgesetzt. Glukose-6-Phosphat wird dann unter NADP<sup>+</sup>-Verbrauch mit Hilfe des Enzyms Glukose-6-Phosphat-

Dehydrogenase [EC 1.1.1.49] (Roche, Mannheim) zu 6-Phospho-D-Glukonat und NADPH umgewandelt. Die umgesetzte Menge an NADPH ist direkt proportional zur Glukosemenge und kann photometrisch mittels Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden. Die Berechnung des Glukosekonsums erfolgt anschließend nach hier aufgeföhrter Formel:

$$C_{\text{Glukose}} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot MW_{\text{Glukose}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot VF \left[ \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] \quad (2)$$

**Formel 2:** **Glukosebestimmung.** c, Konzentration;  $\Delta E$ , Extinktionsänderung; V, Gesamtvolumen des Ansatzes; MW, Molekulargewicht (180,1 [g/mol]);  $\varepsilon$ , Extinktionskoeffizient ( $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); d, Schichtdicke (1 cm); v, Probenvolumen.

Die Glukosebestimmung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Zentrifugation der Zellsuspension ( $12.000 \times g$ , 5 min) im Reaktionsgefäß
2. Zugabe folgender Komponenten in eine Plastikküvette mit 1 cm Schichtdicke:
 

200 mM Tris-HCl-Puffer + 2 mM MgSO <sub>4</sub> (pH 7,6)	900	$\mu\text{l}$
NADP <sup>+</sup> (44 mg/ml)	10	$\mu\text{l}$
ATP (96 mg/ml)	10	$\mu\text{l}$
Probe (zellfreier Überstand)	10	$\mu\text{l}$
3. Mischen des Ansatzes und Leerwertermittlung bei 340 nm
4. Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Enzymgemisch Hexokinase/Glu-6-P-DH (3 mg/ml)
5. Mischen des Ansatzes und Inkubation für 5 min bei RT
6. Bestimmung der Extinktionsänderung bei 340 nm

### 2.5.8 Optisch-enzymatische Laktatbestimmung

Die während des Wachstums gebildete Laktatmenge wurde mittels eines Kits ‚D-Lactic Acid and L-Lactic Acid‘ (Megazyme, Wicklow Irland) bestimmt. Der Gehalt an D- bzw. L-Lakat wird basierend auf zwei aufeinander folgenden Enzymreaktionen im Reaktionsansatz gemessen. In der ersten Reaktion katalysiert die D-Laktat- [EC 1.1.1.27] bzw. L-Laktat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.27] in Anwesenheit von NAD<sup>+</sup> die Oxidation von D-Laktat bzw. L-Laktat zu Pyruvat. Anschließend wird das Pyruvat zu D-Alanin und 2-Oxoglutarat mit Hilfe der D-Glutamat-Pyruvat-Transaminase [EC 2.6.1.2] umgewandelt, wenn D-Glutamat im Überschuss vorhanden ist. Diese zweite enzymatische Umwandlung verhindert die Rückreaktion von Pyruvat zu D-/L-Laktat. Die gebildete Menge an NADH ist direkt proportional zur Laktatmenge und kann photometrisch durch die Bestimmung der Extinktionsänderung bei 340 nm ermittelt werden. Zur Berechnung wurde die Formel 2 (2.5.7) herangezogen, wobei das Molekulargewicht von Laktat (90,1 g/mol) einbezogen wurde. Die Laktatbestimmung erfolgte wie bei Lehmann (2012) erläutert.

### **2.5.9        Bestimmung der Trockenmasse**

Zur Bestimmung der Trockenmasse von Zellen wurden 10 ml Kultur für 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1 ml A. dest. suspendiert, in ein vorher gewogenes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und wiederum für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet für mindestens 24 h gefriergetrocknet. Durch Wiegen des Reaktionsgefäßes und Abziehen des Leergewichtes konnte die Trockenmasse bestimmt werden.

## **2.6           Isolierung von Nukleinsäuren**

### **2.6.1        Vorbehandlung von Geräten und Lösungen**

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert um Nukleasen zu inaktivieren. Arbeitsflächen und hitzelabile Gebrauchsgegenstände wurden mit Ethanol (70 % [v/v]) desinfiziert und getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden durch einen Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96 %igen [v/v] Ethanol behandelt oder abgeflammt. Alle für den Umgang mit RNA benötigten Lösungen und Materialien wurden zweimal autoklaviert. Die Geräte sowie der Arbeitsplatz wurden mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem, Darmstadt) gesäubert. Das Tragen von ebenso behandelten Einweghandschuhen minimierte zusätzlich mögliche Kontaminationen mit RNasen.

### **2.6.2        Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte prinzipiell nach dem Protokoll der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). In der Regel dienten 2 ml einer Übernachtkultur zur Gewinnung der Plasmid-DNA. Das Protokoll ist bei Zechlau (2007) erläutert.

### **2.6.3        Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum***

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte aus 50 ml in CGM-Medium (2.2.1) angezogenen Zellen (Inokulation 0,1 Vol. Vorkultur). Die Zellen wurde bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 bis 1,2 durch Zentrifugation bei 7.500 x g für 10 min und 4 °C (Sorvall RC5C; Thermo scientific, Braunschweig) geerntet. Das erhaltene Sediment wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, in 2-ml-Reaktionsgefäßen aufgeteilt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bertram (1989).

Das Protokoll ist bei Lehmann (2012) beschrieben. Abschließend wurde eine Qualitätsüberprüfung der DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel durchgeführt (2.7.3.1).

#### **2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum***

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte mittels ‚Hot Phenol‘-Extraktion nach Fischer *et al.* (2006). Dazu wurde während eines Wachstumsversuches zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein Probenvolumen von 30 ml entnommen, zentrifugiert (7.500 x g, 5 min, 4 °C), die Pellets sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Daran anschließend erfolgte eine Qualitätsüberprüfung der RNA durch eine Elektrophorese (2.8.3.1) in einem sterilen 1 %igen Agarosegel. Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurden die Proben 1:400 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm am Photometer (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig) in einer Quarzküvette gemessen. Die Reinheit konnte anhand des Verhältnisses der Absorption bei OD<sub>260nm</sub> und OD<sub>280nm</sub> bestimmt werden. Ein Wert zwischen 1,7 und 2 deutete auf eine reine RNA Lösung hin (Sambrook und Russell, 2001).

### **2.7 Molekularbiologische Standardmethoden**

#### **2.7.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren**

##### **2.7.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook und Russell, 2001)**

Die Aufreinigung und Deproteinierung der DNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Eine Emulsion entstand nach der Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) zu der DNA-Lösung. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation für 3 min bei 6.000 x g und RT bewirkt. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Um noch vorhandene Phenolreste aus der Interphase zu entfernen, erfolgte die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) und eine Wiederholung der Zentrifugation. Abschließend wurde eine Natriumacetatfällung der DNA durchgeführt (2.7.2.3).

##### **2.7.2.2 Isopropanolfällung (Sambrook und Russell, 2001)**

Diese Methode wurde ausschließlich zur Fällung von Plasmid-DNA während der Plasmidisolierung (Birnboim und Doly (1979), [2.6.2]) aus *E. coli* verwendet.

**2.7.2.3 Natriumacetatfällung (Sambrook und Russell, 2001)**

Nukleinsäurelösungen wurden mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst) versetzt, gründlich gemischt und bei -20 °C für 1 h (alternativ 4 °C über Nacht bzw. -70 °C für 30 min) inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach den Angaben unter 2.7.2.1. Verwendung fand diese Methode vorrangig bei der Fällung von Plasmid-DNA, Restriktionsansätzen und chromosomaler DNA.

**2.7.2.4 Ammoniumacetatfällung (Sambrook und Russell, 2001)**

Diese Methode wurde zur Fällung von PCR-Fragmenten verwendet. Ihr Vorteil besteht in der geringen Kopräzipitation von Salzen und Oligonukleotiden. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M; pH 7,5) und 3 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst) versetzt, gründlich gemischt und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.7.2.1 beschrieben

**2.7.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Zur Extraktion von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt (2.7.3.1) und anschließend unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Abtrennung der Agarose von der DNA und Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) (2.14) gemäß den Angaben des Herstellers. Abschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert (2.7.3.1).

**2.7.3 Agarosegelelektrophorese****2.7.3.1 Standard-Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001)**

Die horizontale Agarosegelelektrophorese diente der analytischen sowie präparativen Auftrennung von DNA-Molekülen und ihrer qualitativen und quantitativen Beurteilung. Hierzu wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % bis 2 % ([w/v] in 1x TAE-Puffer) verwendet. Zur Markierung der Lauffront und um ein möglichst vollständiges Einsinken der Proben zu gewährleisten, wurden die Proben vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Als Längenstandard wurde ein GeneRuler™ 1-kb-Marker (Thermo scientific, Braunschweig) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V bis 90 V (Power Pack P 25; Biometra, Göttingen) unter Verwendung von 1x TAE-Puffer als Laufpuffer. Nach einer 30-minütigen Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) erfolgte die Visualisierung und Dokumentation der Nukleinsäuren bei 254 nm in einer

Photodokumentationsanlage (Gelprint 2000; MWG-Biotech, Ebersberg). Während der RNA-Agarosegelelektrophorese wurde mit gesondert gereinigten Elektrophoresetensilien (2.7.3) und mit autoklavierter Agarose und Laufpuffer gearbeitet.

#### 50x TAE-Puffer

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

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

#### 6x Loading Dye

Bromphenolblau	125	mg
Xylencyanol	125	mg
Glycerin (86 % [v/v])	17,44	ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	5	ml
<i>A. dest.</i>	ad	10 ml

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

#### **2.7.3.2 Denaturierende Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001)**

Für Northern Hybridisierungen (2.10.3) wurde RNA unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel aufgetrennt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Zugabe von Formaldehyd und Formamid zu den RNA-Proben sowie Formaldehyd zum Laufpuffer und Agarosegel verhinderte während der Auftrennung die Ausbildung intramolekularer Basenpaarungen. Es wurde eine 1,5 %ige Agaroselösung angesetzt, autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit Formaldehyd (Endkonzentration 0,7 % [v/v]) sowie 10 % [v/v] 10x Laufpuffer versetzt. Die RNA-Proben (0,5 bis 15 µg) wurden mit 0,2 Vol. RNA-Auftragspuffer beschwert, anschließend für 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis überführt und kurz zentrifugiert. Zusätzlich wurden 4 µl Längenstandard aufgetragen. Unter einer konstanten Spannung von 60 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mit Hilfe von 1x Laufpuffer.

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

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

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen der Agaroselösung auf 50 °C erfolgte die Zugabe des Formaldehyds und des 10x Laufpuffers.

**RNA-Auftragspuffer**

Bromphenolblau	20	mg
1x Laufpuffer	25	ml
Glycerin (86 % [v/v])	25	ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	10	µl

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

**10x Laufpuffer**

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

Das Einstellen von pH 7,0 erfolgte mit NaOH vor dem Autoklavieren.

**1x Laufpuffer**

10x Laufpuffer	100	ml
A. dest.	880	ml
Formaldehyd (37 % [v/v])	8,2	ml

Das Formaldehyd wurde nach dem Autoklavieren zugesetzt.

## 2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.8.1 Primerdesign

Oligonukleotide (Tab. A.2, Anhang) wurden zur Amplifikation spezifischer Zielgene eingesetzt. Am 5'- und am 3'-Ende der Primer wurden, unter Billigung von Fehlpaarungen, Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mit Hilfe des Oligo Analyzers 3.1 ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)), der gleichzeitig zur Überprüfung auf Self- und Heterodimere diente, dabei sollte ihre theoretischen Schmelzpunkte ( $T_m$ ) maximal 1 °C voneinander abweichen.

### 2.8.2 PCR-Techniken

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten gezielt DNA-Fragmente amplifiziert werden, um Fragmente zur Klonierung oder Sonden-Templates zu erhalten. Die Reaktion fand im Thermocycler mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler; Biometra, Göttingen) statt.

#### 2.8.2.1 Standard-PCR-Reaktionsbedingungen

Für Standard-PCRs wurde die peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template DNA		10 - 200	ng	
Primer fw (10 µM)	je	1	µM	
Primer rev (10 µM)	je	1	µM	
dNTP-Gemisch (10 mM)		20	µM	
Polymerase (1 U/µl)		1	U	
10x Reaktionspuffer		5	µl	
Mg <sup>2+</sup> -Lösung (25 mM)		2	µl	
A. dest.	ad	50	µl	

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	3	min	1 x
Denaturierung	94 °C	30	s	
Annealing	T <sub>m</sub> (Primer)	60	s	
Elongation	72 °C	1	min/kBp	
Abschlusssynthese	72 °C	5	min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	unendlich	

Als Matrize für die PCR diente Plasmid- oder chromosomal DNA (2.6.2, 2.6.3). Zur Gewinnung von chromosomaler DNA für PCR-Screenings wurden auf Festmedium wachsende *C. acetobutylicum* Kolonien verwendet. Diese wurden in 50 µl A. dest. suspendiert, dann 5 min bei 100 °C erhitzt und anschließend 5 µl der abgekühlten Zellsuspension als Template im PCR-Reaktionsansatz eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im Agarosegel (2.7.3.1) analysiert, weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.8.2.2 ,High fidelity'-PCR

Der hierzu verwendete ‚High fidelity enzyme mix‘ (Thermo scientific, Braunschweig) ist ein Enzymgemisch aus einer ‚Proofreading‘- und einer *Taq*-Polymerase. Aus diesem Grund wurde dieser Enzym-Mix zur Amplifikation von großen (> 2,5 kBp) oder verwendet. Der PCR-Ansatz entspricht der Standard-PCR (2.9.2.1) unter Verwendung der enzymespezifischen Puffer. Es unterschied sich jedoch das PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	5	min	1 x
Denaturierung	94 °C	30	s	
Annealing	T <sub>m</sub> (Primer)	30	s	
Elongation	68 °C	1	min/kBp	
Denaturierung	94 °C	30	s	
Annealing	T <sub>m</sub> (Primer)	30	s	
Elongation	68 °C	1	min/kBp +10 s	15 - 25 x
Abschlusssynthese	68 °C	10	min	
Lagerung	4 °C	∞	unendlich	1 x

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel (2.7.3.1) aufgetrennt, weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.8.2.3 „Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR (Ho *et al.*, 1989)

Das Gruppe II Intron des ClosTron® Systems (2.11) kann genspezifisch durch abgeleitete Oligonukleotide, welche spezifisch für das Intron und das Zielgen sind, mittel SOE („Splicing by overlap extension“)-PCR modifiziert werden. Hierbei mussten in einem PCR-Reaktionsansatz vier verschiedene Primer unterschiedlicher Konzentrationen eingesetzt werden. Diese Oligonukleotide (Tab. A.2, Anhang) wurden auf die entsprechenden Molarität verdünnt und dann zu einem Gemisch (Vier-Primer-Mix) vereinigt. Dies ist damit zu begründen, dass EBS2 und EBS Universal die unvollständigen 100 Bp und 200 Bp Fragmente herstellen sollen, welche daraufhin als Template für die äußereren Oligonukleotide (IBS und EBS1d) dienten. Dadurch konnte vermehrt das genspezifische 350-Bp-Fragment hergestellt werden.

Der Vier-Primer-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

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

Anschließend wurde dieser Primer-Mix für die SOE-PCR verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Amplifikation erfolgten wie unter 2.8.2.1 beschrieben. Es wurde lediglich anstelle der einzelnen Primer 5 µl des Vier-Primer-Mixes eingesetzt. Als DNA-Template diente die zuvor isolierte Plasmid-DNA (2.6.3) des pMTL007-*glgA* (Tab. A.1, Anhang). Zum Schluss wurden die PCR-Produkte im Agarosegel (2.7.3.1) aufgetrennt und mittels Gelextraktion (2.7.2.5) aufgereinigt.

## 2.8.3 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.8.3.1 Spezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen liefert lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden. Die sequenzspezifische Hydrolyse von Plasmiden oder PCR-Produkten erfolgte in mindestens 10 µl pro 1 µg DNA für 1 bis 15 h. Gemäß den Herstellerangaben erfolgte die Restriktion in den entsprechenden Puffersystemen bei der für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur. Bei „FastDigest“-Enzymen erfolgte die Restriktion ausschließlich in dem vom Hersteller empfohlenen „FastDigest“-Puffer für 5 bis 30 min bei 37 °C. Die Restriktion von chromosomaler DNA wurde während dieser Arbeit bis zu 24 h bei 37 °C durchgeführt. Eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte im Anschluss an den letzten Restriktionsschritt. Kontrollrestriktionen konnten auch durch Zugabe von 2 µl 6x Loading-Dye zu 10 µl Reaktionsansatz beendet werden. Die entstandenen DNA-Fragmente konnten

anschließend sowohl im Agarosegel (2.7.3.1) kontrolliert als auch für eine Ligation (2.8.3.3) verwendet werden. Die verwendeten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen und Puffer, sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

**Tab. 2.3:** Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Puffersystem (Thermo scientific)
<i>Bam</i> HI	5` A ^ AGCT v T 3`	10x <i>Bam</i> HI-Puffer, 10x Tango™
<i>Bam</i> HI FastDigest	5` A ^ AGCT v T 3`	10x FastDigest-Puffer™
<i>Bsp</i> 1407I ( <i>Bsr</i> GI)	5` T ^ GTAC v A 3`	10x Tango™
<i>Cfr</i> 9I ( <i>Xma</i> I)	5` C ^ CCGG v G 3`	10x <i>Cfr</i> 9I-Puffer, 10x Tango™
<i>Xma</i> I	5` CCC ^ v GGG 3`	10x FastDigest-Puffer™
<i>Eco</i> RI	5` G ^ AATT v C 3`	10x <i>Eco</i> RI-Puffer, 10x Tango™
<i>Hind</i> III	5` A ^ AGCT v T 3`	10x Puffer R, 10x Tango™
<i>Fnu</i> 4HI ( <i>Sat</i> I)	5`GC ^ N v GC 3`	10x Puffer G, 10x Tango™

^ Restriktionsschnittstelle

v Restriktionsschnittstelle im Parallelstrang

### 2.8.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Selbstligation restriktierter Vektor-DNA zu vermeiden, wurde diese einer Dephosphorylierung am 5'-Ende durch Einsatz von ‚FastAP‘ alkalischer Phosphatase (Thermo scientific, Braunschweig) direkt in den Restriktionsansatz im Anschluss an die Spaltung des Vektors unterzogen (Sambrook und Russell, 2001). Bis zu 10 µg linearisierte Vektor-DNA wurden mit 1 U ‚FastAP‘ (1 U/µl) und 1x ‚FastAP‘-Puffer (10x konzentriert) versetzt und für max. 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der ‚FastAP‘ durch 20 minütige Erhitzung auf 65 °C und eine Weiterbehandlung der Vektor-DNA entsprechend 2.8.3.3.

### 2.8.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zunächst wurde als Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation die Konzentration der zu ligierenden Fragmente bestimmt. Es wurde dann im Ligationsansatz i. d. R. ein molares Verhältnis von 1:3 bis 1:1 (Vektor:Insert) gewählt. Pro Ansatz wurden 50 ng Vektor und die adäquate Menge Insert-DNA eingesetzt. Das Standardvolumen der Ligationsansätze betrug 20 µl. Die T4-DNA-Ligase (Thermo scientific, Braunschweig) wurde mit einer Konzentration von 0,1 U/µl im entsprechenden Ligationspuffer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte ü. N. bei 16 °C. Es schloss sich eine Hitzeinaktivierung der T4-DNA-Ligase zur Erhöhung der Transformationseffizienz bei 65 °C für 20 min an. Die Ligationsansätze konnten direkt für die chemische Transformation von

CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt (2.9.1.1) bzw. bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.

## **2.9 Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen**

### **2.9.1 DNA-Transfer in *E. coli***

#### **2.9.1.1 CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation in *E. coli***

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte durch Zugabe der Ligationsansätze (2.8.3.3) zu CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli*-Zellen. Dazu wurden die kompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und 5 bis 20 µl des Ligationsansatz zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde für 90 s bei 42 °C der Hitzeschock ausgelöst. Anschließend wurde dem Ansatz 500 µl LB-Medium (2.2.2) zugegeben und die Zellen für 60 min bei 37 °C und 500 Upm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) regeneriert. Abschließend wurden 50 µl und 100 µl des Transformationsansatzes im Doppelansatz auf LB-Nähragarplatten mit den für die Selektion erforderlichen Zusätzen (2.2.3) ausplattiert und ü. N. bei 37 °C angezogen.

#### **2.9.1.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation**

Als standardisierte Methode zur Transformation von Fremd-DNA in *E. coli*-Zellen wurde die Elektroporation genutzt (Dower *et al.*, 1988). Die Elektroporation erfolgte in einem Gene PulserII™ (Biorad, München). Zu Beginn wurden die Elektroporationküvetten (Elektrodenabstand 2 mm; Peqlab, Erlangen) auf 4 °C abgekühlt und 0,5 bis 5 µl Plasmid-DNA hinein gegeben. Pro Ansatz wurden 40 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut und ebenfalls in die Kuvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten zwischen 4,5 bis 5,2 ms erreicht wurden. Es schloss sich eine Regeneration von 60 min bei 37 °C nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (2.2.2) an. Zum Schluss wurden 100 µl des Reaktionsansatzes auf ein selektives Festmedium ausplattiert.

### **2.9.2 DNA-Transfer in *C. acetobutylicum***

#### **2.9.2.1 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation**

Die Transformation von Fremd-DNA in *C. acetobutylicum* erfolgte im Wesentlichen nach Mermelstein *et al.* (1992). Es wurden stets frisch hergestellte elektrokompetente Zellen von *C. acetobutylicum* für eine Transformation verwendet. Die Elektroporation erfolgte in einer Anaeroben-Werkbank (Meintrup, Lähden). Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurden

50 ml CGM-Medium (2.2.1) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> 0,8 bis 1,0 angezogen. Anschließend erfolgte eine weitestgehend anaerobe und zügige Durchführung auf Eis. Das Protokoll ist bei Zechlau (2007) erläutert.

## **2.10 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen**

### **2.10.1 Sonden-Markierung**

Die DNA-Sonden ermöglichen die Untersuchung einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch. Sie können durch den Einbau von Desoxyuridin-Nukleotiden (dUTPs) mit kovalent gebundenem Digoxigenin markiert und für verschiedenste Hybridisierungen verwendet werden. Der Einbau von Digoxigenin markiertem Desoxyuridintriphosphat geschieht während der matrizenabhängigen Synthese von komplementären DNA-Strängen durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Verwendung von hexameren ‚Random‘-Primern. Für Markierungsansätze wurde ein ‚DIG DNA Labeling Kit‘ (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers genutzt. Als Matrize für die Markierungsreaktion wurden eigens dafür hergestellte PCR-Produkte (2.8.2.1) mit einer Länge zwischen 200 und 1000 Bp verwendet. Zur Vorbehandlung und Sicherstellung der Spezifität wurde das Zielfragment durch eine Gelextraktion (2.7.2.5) aufgereinigt. Die Menge an DNA im Markierungsansatz betrug ca. 1 µg.

### **2.10.2 Übertragung von DNA auf Membranen (Southern Blot)**

Um DNA auf Nylonmembranen zu übertragen, fand das Prinzip des Kapillarblotting Anwendung (Southern, 1975). Diese kann dann auf der Membran immobilisiert werden. Zunächst wurde die isolierte DNA (2.6.3) hydrolysiert und in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.7.3.1). Das Gel wurde anschließend 10 min bei RT in 0,25 M HCl bewegt. Die Säure erzeugte Einzelstrangbrüche und erleichterte so den Transfer der DNA. Es schloss sich eine Denaturierung und eine Neutralisierung für 30 min bei RT an. Während dieser Zeit wurde eine Nylonmembran exakt auf Gelgröße zugeschnitten und auf der DNA-abgewandten Seite markiert. Nach einer 5-minütigen Äquilibrierung des Gels sowie der Nylonmembran (Schleicher und Schüll BioScience, Dassel) in 2x SSC-Puffer erfolgte der Aufbau der Hybridisierungsapparatur (eigener Bauart). Dazu wurden 5 Lagen Whatman-Papier (Schleicher und Schuell BioScience, Dassel) mit 2 x SSC-Puffer angefeuchtet, auf 5 bis 10 cm Filterpapier geschichtet und schließlich die Nylonmembran blasenfrei aufgelegt. Das Agarosegel wurde nun genau auf der mit 2x SSC-Puffer angefeuchteten Membran luftblasenfrei platziert und der Aufbau mit einer Glasscheibe und einem Gewicht von 500 g beschwert. Der Transfer erfolgte nun ‚semidry‘ aus dem Gel auf die Membran in 16 bis 24 h.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran von jeder Seite für 3 min UV-fixiert und danach getrocknet.

#### 20x SSC-Puffer

NaCl	75	g
Na <sub>3</sub> -Citrat x H <sub>2</sub> O	88,2	g
A. dest.	ad	1000 ml

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

#### Denaturierungspuffer

NaCl	35,06	g
NaOH	16	g
A. dest.	ad	1000 ml

#### Neutralisierungspuffer

NaCl	87,66	g
Tris	60,55	g
A. dest.	ad	1000 ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit konz. HCl (ca. 30 ml) auf 7,5 titriert.

### **2.10.2.1 Southern Hybridisierung**

Die DNA, kovalent auf einer Nylonmembran fixiert, wurde in gut verschließbaren Behältern zunächst 1 h mit 15 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. So können unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Dazu wurde die Membran, mit der DNA der Röhrchenwand abgewandt, in Hybridisierungsröhrchen geschoben. Die markierte DNA (2.10.1) wurde in 5 ml Hybridisierungslösung gegeben und konnte als DNA-Sonde verwendet werden. Nach dem Denaturieren der DNA-Sonde (10 min bei 100 °C) wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und die heiße Sonde zur Membran gegeben. Die Hybridisierung der Membran mit der DNA-Sonde erfolgte für 16 bis 24 h bei 42 °C unter gleichmäßiger Rotation in einem Hybridisierungsgefäß (Biometra, Göttingen). Danach schlossen sich die Waschschrifte der Membran an, was die Hybridisierung stoppte und diese für die nachfolgende Detektion vorbereitete. Nach einer Wiederholung des Vorgehens 2x SSC, 0,1 % SDS [w/v] bei RT für 5 min erfolgte der Schritt zweimal 15 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS [w/v] bei 42 °C. Die gewaschene Nylonmembran wurde direkt zur Detektion verwendet oder trocken gelagert.

#### Hybridisierungslösung

20x SSC-Puffer	25	ml
Formamid (deionisiert)	50	ml
SDS (10 % [w/v])	200	µl
N-Laurylsarkosin (20 % [w/v])	200	µl
Blockingreagenz	2	g
A. dest.	ad	100 ml

Die Lösung muss unter Umständen auf 70 bis 80 °C erwärmt werden, bis sich das Blockingreagenz (Roche, Mannheim) löst. Die Lösung bleibt jedoch trüb.

### 2.10.2.2 Detektion Digoxigenin markierter DNA

Um spezifische DNA-Fragmente in einer Lösung nachzuweisen, gibt es verschiedene Markierungssysteme. Eine Variante ist der optische Nachweis, wobei mit Haptenen wie Digoxigenin (DIG) markiert wird. Das Anti-Digoxigenin-System beruht auf der Interaktion von DIG und DIG-spezifischen Antikörpern. Dabei wird eine alkalische Phosphatase als Reportergruppe verwendet. Diese setzt optische Substrate wie NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) um. So wird blaufarbenes Indigo freigesetzt, welches den Nachweis der DNA bestätigt. Dazu wurde die Membran 1 min mit Puffer 1 gewaschen und anschließend 1 bis 2 h mit Puffer 2 inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit Puffer 1 für 5 min folgte eine Inkubation der Membran mit 20 ml der Antikörperkonjugat-Lösung für 1 h. Danach wurde die Nylonmembran wieder mit Puffer 1 für 15 min gewaschen und der Waschvorgang wiederholt. Die anschließende Äquilibrierung wurde für 2 min mit Puffer 3 durchgeführt. Der optische Nachweis der Banden auf der Membran erfolgte mit 10 ml einer Färbelösung. Diese Reaktion konnte nach ausreichender Färbung durch intensives Waschen mit A. dest. gestoppt werden.

#### Puffer 1

Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	100	g
NaCl	8,76	g
A. dest.	ad	1000 ml

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

#### Puffer 2

Blockingreagenz	1	g
Puffer 1	100	ml

#### Puffer 3

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	g
NaCl	5,84	g
MgCl <sub>2</sub>	4,76	g
A. dest.	ad	1000 ml

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

#### Antikörperkonjugat-Lösung (1:5000)

Anti-Digoxigenin-AP	4	µl
Puffer 1	20	ml

#### Färbelösung

Puffer 3	10	g
NBT/BCIP-Stammlösung	50	µl

### 2.10.3 Übertragung von RNA auf Membranen (Northern Blot)

Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode, die zur Detektion spezifischer RNA-Transkripte genutzt wird. Die isolierte RNA wird dazu elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Hierzu wurde Gesamt-RNA im denaturierenden Agarosegel (2.7.3.2) aufgetrennt und anschließend die Gele zur partiellen Hydrolyse für 5 min in 50 mM NaOH inkubiert und anschließend für 5 min in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) neutralisiert. Die Strangbrüche durch die Hydrolyse sind notwendig, um den Transfer der RNA auf die Membran zu gewährleisten. Das benötigte Whatman-Papier und die Nylonmembran (Schleicher und Schüll BioScience, Dassel) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und vor dem Aufbau des Blots mit 10x SSC-Puffer (2.10.2) befeuchtet. Anschließend erfolgte der Aufbau der Blotapparatur wie unter 2.10.2 beschrieben. Nach 16 bis 24 h wurde der Blot abgebaut und die RNA auf der Nylonmembran UV-fixiert. Die Nylonmembran wurde bis zur Hybridisierung bei RT gelagert.

#### 2.10.3.1 Northern Hybridisierung

Die kovalent an die Membran gebundene RNA sollte nun mit der Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert werden. Hierzu wurde die trockene Membran so in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, dass die Membranseite mit der gebundenen RNA nach innen zeigte. Zu Beginn erfolgte eine Prähybridisierung mit 15 ml Hybridisierungslösung für 1 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen, wodurch unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Die Sonde wurde dann in 10 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach dem Entfernen der Prähybridisierungslösung erfolgte die Zugabe der heißen Sonde zur Membran und Inkubation bei 42 °C. Nach etwa 16 bis 20 h wurde die Hybridisierung durch Waschen der Membran zweimal für 5 min in 2x SSC-Puffer mit 0,1 % SDS [w/v] bei RT und zweimal 15 min in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS [w/v] bei 68 °C beendet.

#### Hybridisierungslösung

20x SSC-Puffer	12,5	ml
Na-Phosphat-Puffer (0,5 M; pH 7,2)	5	ml
Formamid (deionisiert)	25	ml
SDS (10 % [w/v])	3,5	g
N-Laurylsarkosin (20 % [w/v])	50	µl
Blockingreagenz	1	g
A. dest.	ad	100

Die Lösung muss unter Umständen auf 70 bis 80 °C erwärmt werden, bis sich das Blockingreagenz (Roche, Mannheim) löst. Die Lösung bleibt jedoch trüb.

### **2.10.3.2 Detektion Digoxigenin markierter DNA (Northern)**

Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte mit einem Konjugat aus Anti-Digoxigenin-Antikörper und einer alkalischen Phosphatase (Roche, Mannheim). Die alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des Substrats Cyclodioxetanphosphat (CDP), wodurch dieses zerfällt und Licht mit einer Wellenlänge von 466 nm abgibt. Die Detektion der Chemiluminesenz erfolgte mittels einer entsprechend sensitiven Kamera (Luminescent Image Analyzer LAS-1000; Fujifilm, Düsseldorf). Zunächst wurde die Membran 1 min in Waschpuffer inkubiert. Es folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 40 ml Puffer 2 für 30 min, danach wurde der Puffer 2 verworfen. Anschließend wurde die Antikörperkonjugat-Lösung für 1 h zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer 1 für 15 min wurde die Membran für 2 min mit Puffer 3 äquilibriert. Der Nachweis der Banden erfolgte dann durch Zugabe von 5 ml Puffer 3 mit 50 µl CDP-Star™-Stammlösung (Roche, Mannheim) für 5 min. Zum Abschluss wurde die Membran vorsichtig in Frischhaltefolie verpackt und Signale mittels Raytest bei 15 s bis 60 min Exposition detektiert.

#### Puffer 1

Maleinsäure	11,6	g
NaCl	8,76	g
A. dest.	ad	1000 ml

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

#### Waschpuffer

Tween 20	30	µl
Puffer 1	100	ml

#### Puffer 2

Blocking-Reagenz	1	g
Puffer 1	100	ml

#### Puffer 3

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	g
NaCl	5,84	g
MgCl <sub>2</sub>	4,76	g
A. dest.	ad	1000 ml

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

#### Antikörper-Konjugat-Lösung (1:5000)

Anti-Digoxigenin-AP	4	µl
Puffer 1	20	ml

#### Färbelösung

Puffer 3	10	g
CDP-Star	50	µl

## 2.11 ClosTron-Insertionsmutagenese

### 2.11.1 Erzeugung genspezifischer pMTL007C-E2 Vektoren

Bei dem ClosTron® System (Heap *et al.*, 2007) diente ein Gruppe II Intron zur Inaktivierung spezifischer Gene. Mit Hilfe eines Programms ([www.sigmapogenosys.com/targettron](http://www.sigmapogenosys.com/targettron) bzw. [www.clostron.com/clostron2.php](http://www.clostron.com/clostron2.php)) wurden *in silico* mögliche Insertionsorte für das Gruppe II Intron im Zielgen errechnet. Bei der Wahl musste zum einen darauf geachtet werden, dass ein möglichst geringer E-Value-Wert gegeben war (< 0,5) und zum anderen die Insertion möglichst weit im 5'-Bereich des Gens erfolgte. Zu Beginn der Insertionsmutagenese wurde die Intron-DNA (350-Bp-Fragment) mittels SOE (‘Splicing by overlap extension’)-PCR (2.8.2.3) und den genspezifisch Oligonukleotiden (Tab A.2, Anhang) an das Zielgen angepasst. Zur Klonierung in den Vektor pMTL007C-E2 wurde das genspezifische 350-Bp-Fragment mit *Hind*III und *Bsp*1407I (Isoschizomer von *Bsr*GI) hydrolysiert, wodurch das *lacZα*-Gen (250-Bp-Fragment) ersetzt wurde. Daraus resultierend ist die Synthese der β-Galaktosidase inhibiert und das Chromogen (X-Gal) kann nicht umgesetzt werden. Die dadurch bedingten weißen Kolonien wurden zur Überprüfung einer Kontrollrestriktion unterzogen und positive Klone sequenziert (LGC Genomics, Berlin).

### 2.11.2 Transformation in *C. acetobutylicum*

Die Restriktionsendonuklease *Cac*824I aus *C. acetobutylicum* besitzt eine Erkennungssequenz, die häufig in Plasmiden aus *E. coli* vorkommt. Dies macht die Verwendung von Fremd-DNA in *C. acetobutylicum* unmöglich. Mit der Entdeckung der φ3T I Methyltransferase des *B. subtilis* Phagen φ3T (Mermelstein und Papoutsakis, 1993) konnte dieses Problem gelöst werden. Durch die Methyltransferase wird das Plasmid in *E. coli* *in vivo* methyliert und so vor dem Abbau durch *C. acetobutylicum* geschützt. Die Methylierung erfolgte in *E. coli* ER2275. Dieser Stamm enthält das pAN-2 Plasmid, welches das Gen (*φ3tI*) der Methyltransferasen aus dem *B. subtilis* Phagen φ3T exprimiert und zudem eine Tetracyclinresistenz vermittelt. Nach der Elektroporation in *E. coli* ER2275 (2.9.1.2) erfolgte die Selektion auf LB-Agar mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Chloramphenicol (25 µg/ml) und nach der Plasmidpräparation die Testrestriktion mit *Fnu*4HI. Das Enzym erkennt unmethylierte Basensequenzen und schneidet diese, als Kontrolle diente deshalb ein unmethylierter Vektor. Danach wurde die Elektroporation der genspezifisch angepassten pMTL007C-E2 Plasmide in *C. acetobutylicum* durchgeführt (2.9.2.1). Nach der Inkubation auf Selektionsmedium (RCA-Agar mit 15 µg/ml Thiamphenicol) wurden 500 µl CGM-Medium (2.2.1) mit Thiamphenicol (7,5 µg/ml) mit einer Kolonie inkuliert, 4 h inkubiert und anschließend auf RCA-Agar mit Erythromycin (30 µg/ml) selektiert. Positive Klone waren

Erythromycin resistent, da nach korrekter Insertion des Gruppe II Introns der Marker ErmRAM aktiv wird.

### **2.11.3        Nachweis der Insertion**

#### **2.11.3.1      PCR-Screening**

Da die Selektion mit Erythromycin nur ein Hinweis auf die Integration des Gruppe II Introns ins Chromosom ist, wurden folgend PCR-Amplifikationen als Nachweis für die korrekte Insertion in das Zielgen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Verwendung der genspezifischen Primer (Tab. A.2, Anhang), dabei konnte bei einer erfolgreichen Integration ein um das Gruppe II Intron (1,9 kBp) vergrößertes Fragment amplifiziert werden. Weiterhin erfolgte eine sogenannten Gen-Intron PCR, hierfür wurden ein genspezifischer Primer und ein Intron spezifischer Primer eingesetzt. Es konnte demnach nur ein Fragment amplifiziert werden, wenn sich das Intron im Zielgen befand. Die ‚Sense‘ beziehungsweise ‚Antisense‘ Insertion des Introns gab die Wahl des Intron-Primers vor. Da die Insertionsmutante dieser Arbeit in ‚Sense‘-Orientierung vorlag, wurde der EBS\_Universal-Primer (Tab. A.2, Anhang) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.2.1 und 2.8.2.2 beschrieben. Zeigten die PCR-Ergebnisse die erwarteten Fragmentgrößen, schloss sich eine DNA-Hybridisierung an (2.11.3.2).

#### **2.11.3.2      Southern Hybridisierung**

Abschließend wurde die Insertion der mittels PCR detektierten positiven Klone durch die DNA-Hybridisierung verifiziert. Diese Methode ermöglicht den Nachweis der exakten Insertion des Gruppe II Introns ins Zielgen in einem komplexen DNA-Gemisch. Durch zuvor durchgeführte *in silico*-Analysen konnten Restriktionsschnittstellen (Tab. 2.3) aufgezeigt werden, die sich in unmittelbarer Umgebung des Zielgens befanden. Die Wahl der Restriktionsenzyme erfolgte basierend auf den Sequenzdaten des Wildtyps (Nölling *et al.*, 2001), so dass die chromosomalen Fragmente, welche das Zielgen enthielten, eine Größe zwischen 1 bis 8 kBp aufwiesen. Dann wurde wie unter 2.10.2 beschrieben die DNA-Hybridisierung der zu untersuchenden Mutante und des Wildtyps als Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde ca. 500 ng DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen hydrolysiert und verwendet. Zur Detektion der Signale wurden Gen- und ErmRAM-Sonden hergestellt. Die Sondenherstellung erfolgte wie unter 2.10.1 erläutert.

## 2.12 Bestimmung der intrazellulären Nukleotide

### 2.12.1 Bestimmung von ATP und ADP

#### 2.12.1.1 Extraktion von ATP und ADP

Die Extraktion von Purin- und Pyrimidinnukleotiden aus Zellproben erfolgte mit Perchlorsäure nach Cole *et al.* (1967). Dazu wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

1. 2 ml Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführen
2. Zugabe von 500 µl HClO<sub>4</sub>-Lösung (30 % [v/v], eiskalt)
3. Mischen des Ansatzes
4. Inkubation: 10 min bei 60 °C (im Wasserbad)
5. Anschließend 10 min auf Eis abkühlen
6. Neutralisieren des Zellextrakts mit 1,5 ml 1 N KOH  
(⇒ schrittweise Zugabe von 50 µl und nachfolgend vortexen)
7. Sedimentation des neutralisierten Zellextrakts (5.000 × g, 10 min, 4 °C)
8. Überstand in eine neues 15-ml-Reaktionsgefäß überführen

Der hergestellte Zellextrakt wurde anschließend direkt enzymatisch vermessen, konnte aber auch max. 24 h bei -20 °C gelagert werden

#### 2.12.1.2 Enzymatische ATP/ADP-Bestimmung

Neben der Bestimmung von ATP kann auch ADP gemessen werden. Dazu muss das ADP zunächst in einer enzymatischen Reaktion in ATP umgewandelt werden (Bergmeyer, 1983). Das Substrat Creatin-Phosphat und ADP reagieren dabei mittels Creatin-Phosphokinase [EC 2.7.3.2] (Applichem, Darmstadt) zu Creatin und ATP. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

1. Zugabe folgender Komponenten in ein 2-ml-Reaktionsgefäß:
 

Zellextrakt	1000	µl
Creatin-Phosphat-Puffer	900	µl
Creatin-Phosphokinase (2 mg/ml)	10	µl
2. Mischen des Ansatzes und Inkubation für 15 min bei 38 °C
3. Hitzeinaktivierung der Reaktion bei 100 °C für 3 min

Der vorbereitete Zellextrakt wurde dann wie für die ATP-Bestimmung verwendet.

#### Creatin-Phosphat-Puffer

Creatin-phosphat (14 mM)	750	mg
Glycin (0,1 mM)	25	mg
MgSO <sub>4</sub> (1 mM)	500	mg
A. dest.	ad	ml

Der pH wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 9,0 eingestellt.

Die Bestimmung von ATP erfolgte prinzipiell mit Hilfe des gekoppelten Enzymtests wie unter 2.5.7 erläutert (Bergmeyer, 1983). Die umgesetzte Menge an NADPH ist direkt proportional zur ATP-Menge und kann photometrisch mittels Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer

Wellenlänge von 340 nm gemessen werden. Durch eine mit ATP erstellte Eichgerade im Bereich von 0 bis 50 µM konnten die ATP-Konzentrationen in den Proben errechnet werden. Die ATP-Bestimmung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Zugabe folgender Komponenten in eine Plastikküvette mit 1 cm Schichtdicke:
 

200 mM Tris-HCl-Puffer + 2 mM MgSO <sub>4</sub> (pH 7,6)	900	µl
Glukose (50 mM)	10	µl
NADP <sup>+</sup> (44 mg/ml)	10	µl
Probe	10	µl
2. Mischen des Ansatzes und Leerwertermittlung bei 340 nm
3. Zugabe von 10 µl Enzymgemisch Hexokinase/Glu-6-P-DH (3 mg/ml)
4. Mischen des Ansatzes und Inkubation für 5 min bei RT
5. Bestimmung der Extinktionsänderung bei 340 nm

### **2.12.2 Bestimmung von NAD(P)H und NAD(P)<sup>+</sup>**

#### **2.12.2.1 Extraktion von NAD(P)H und NAD(P)<sup>+</sup>**

Die Extraktion von Nicotinamidadenindinukleotiden aus Zellproben erfolgte nach Wimpenny und Firth (1972) und es wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

1. Je 2 ml Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführen
2. Zugabe von 1 ml 0,1 N HCl (Extraktion von NAD(P)<sup>+</sup>) oder 1 ml 3 N KOH (Extraktion von NAD(P)H)
3. Mischen des Ansatzes
4. Inkubation: 10 min bei 60 °C (im Wasserbad)
5. Anschließend auf Eis abkühlen
6. Neutralisieren des Zellextrakts mit 1,3 ml 0,1 N NaOH oder 0,8 ml 3 N HCl  
(⇒ um hohe Säure- bzw. Basenkonzentrationen zu vermeiden, schrittweise Zugabe von 50 µl und nachfolgend vortexen)
7. Sedimentation des neutralisierten Zellextrakts (5.000 x g, 10 min, 4 °C)
8. Überstand in ein neues 15-ml-Reaktionsgefäß überführen

Der neutralisierte Zellextrakt wurde anschließend direkt enzymatisch vermessen, konnte aber auch max. 24 h bei -20 °C gelagert werden.

#### **2.12.2.2 Enzymatische NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Bestimmung**

Die Bestimmung von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> wurde gemäß des ‚Micro cycling assays‘ von Bernofsky und Swan (1973) durchgeführt. In der Alkohol-Dehydrogenase gekoppelten Reaktion wird der Alkohol unter Verwendung von NAD(P)<sup>+</sup> zum entsprechenden Aldehyd oxidiert, während das 2,5-Di-Phenyltetrazolium-Bromid (MTT) durch das dabei gebildete NAD(P)H oxidiert wird. Die Reduktion von MTT führt zur Entstehung von unlöslichen Formazan, welches als blau-violetter Niederschlag ausfällt und sich durch eine Absorptionsänderung bei 570 nm bestimmen lässt. Die Formazanbildung diente als indirekter Nachweis der Dinukleotide. Durch eine mit NAD(P)H bzw.

NAD(P)<sup>+</sup> erstellte Eichgerade im Bereich von 0 bis 5 µM konnten die entsprechenden Konzentrationen in den Proben errechnet werden. Um die Spezifität des ‚Micro cycling assays‘ zu untermauern, wurden mit standardisierten Mengen an NAD(P)H bzw. NAD(P)<sup>+</sup> Kontrollextraktionen (2.12.2.1) durchgeführt und diese anschließend enzymatisch bestimmt.

Zur Bestimmung wurde folgender Ansatz pipettiert:

1. Zugabe folgender Komponenten in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß:

A. <i>dest.</i>	400	µl
100 mM Tris-HCl-Puffer + 0,1 % Gelatine (pH 8,6)	500	µl
PES (33,2 mM)	50	µl
MTT (8,4 mM)	50	µl
Ethanol (96 %, reinst)	10	µl
Probe	50	µl

2. Mischen des Ansatzes, Inkubation für 3 min bei 35 °C (Heizblock)
3. Zugabe von jeweils 10 µl der Alkohol-Dehydrogenase (3 mg/ml)
4. Mischen des Ansatzes und Inkubation für 5 min bei 35 °C
5. Abstoppen der Reaktion mit 200 µl 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 6,0)
6. Überführen des Ansatzes in eine Plastikküvette (Schichtdicke 1 cm)
7. Bestimmung der Extinktionsänderung bei 570 nm

## 2.13 Arbeiten mit Proteinen

### 2.13.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zur Herstellung geklärter Lysate von *E. coli* wurden 250 ml Zellkultur für 10 min bei 7.500 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 5 ml Puffer W (2.13.3) suspendiert und 12 bis 16 h bei -20 °C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (UP200S Hielscher, Teltow) unter Verwendung der Sonotrode S2. Die Beschallung erfolgte für dreimal 1 min mit jeweils 1 min Pause unter Kühlung auf Eis. Danach erfolgte eine erneute Beschallung der Probe für 30 Sekunden. Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation für 30 min bei 16.000 x g und 4 °C entfernt. Der so geklärte Überstand konnte direkt für die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Strep-Tactin-Sepharose eingesetzt werden (2.13.3). Zur Gewinnung von Gesamt-Protein aus *C. acetobutylicum* Zellen wurden die Insertionsmutante sowie der Wildtyp in eine CGM-Vorkultur (bei den putativen Insertionsmutanten, CGM mit Erythromycin [20 µg/ml]) inkkuliert und bei 37 °C über Nacht inkubiert (2.4.1). Dann in eine MS-MES-Vorkultur und anschließend in eine 200-ml-MS-MES-Hauptkultur überführt, am nächsten Tag geerntet (7.500 x g, 4 °C, 10 min) und das Zellpellet in 5 ml Puffer W resuspendiert. Die Proben wurden entweder sofort für die Ultraschallbehandlung verwendet oder bei -20 °C gelagert. Die Probenahmen sowie der Zellaufschluss für anaerobe Enzymassays erfolgten in einer Anaeroben-Werkbank (Meintrup, Lähden), um die Enzymaktivität von O<sub>2</sub>-sensitiven Enzymen so wenig wie möglich zu beeinträchtigen. Wurden diese Zellproben

nicht sofort aufgeschlossen, konnten sie bei -20 °C in einem zuvor N<sub>2</sub>-begasten Hungate gelagert werden. Der Zellaufschluss (UP200S; Hielscher, Teltow) erfolgte auf Eis für sechsmal 3 min mit je einer min Pause, nach 4 min Abkühlung wurde erneut viermal 3 Min mit einer min Pause geschallt. Mittels Lichtmikroskopie (2.5.4) erfolgte die Überprüfung der Ultraschalleffizienz. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 60-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C pelletiert und die Proteinbestimmung (2.13.2) durchgeführt.

### **2.13.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976)**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in einer Lösung erfolgte nach Bradford (1976). Dazu wurden verschiedene Verdünnungen mit *A. dest.* angesetzt. Zu je 50 µl der Verdünnungen wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert mit 50 µl *A. dest.* und 1 ml Bradford-Reagenz im Photometer (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig) gemessen. Mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichgerade im Bereich von 0 bis 0,15 mg/ml konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben errechnet werden.

#### Bradfordreagenz

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

### **2.13.3 Affinitätschromatographie an *Strep-Tactin-Sepharose***

Die native Aufreinigung von ‚*Strep-tagII*‘ Fusions-Proteinen erfolgte, wie bei Riebe (2009) beschrieben, mittels Affinitätschromatographie an *Strep-Tactin-Sepharose* (IBA, Göttingen). Die aufgereinigten *Step-tagII*-Fusionsproteine wurden bei 4 °C gelagert. Eine Überprüfung der erfolgreichen Aufreinigung erfolgte einerseits durch Konzentrationsbestimmung nach Bradford (2.13.2), andererseits durch die anschließende SDS-PAGE (2.13.4.1).

### **2.13.4 Polyacrylamidgelektrophorese**

#### **2.13.4.1 SDS-PAGE**

Die denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese wurde während dieser Arbeit zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe durchgeführt (Laemmli, 1970; mod.). Es wurde stets 12 % [v/v] an Acrylamid im Trenngel und 4 % [v/v] Acrylamid im Sammelgel verwendet. Die

Zusammensetzung der Acrylamidgele sowie der Aufbau und die Durchführung der Polyacrylamidelektrophorese erfolgte wie bei Riebe (2009) erläutert.

#### **2.13.4.2 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie**

Zur Proteinfärbung von eindimensionalen Acrylamidgelen wurde kolloidalles Coomassie verwendet. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie schon geringe Proteinmengen (bis > 10 ng) detektiert und bei der Analyse keine störenden Silberverbindungen vorliegen. Die Durchführung ist bei Janssen (2010) dargelegt.

#### **2.13.5 „Electro mobility shift assay“ (EMSA)**

Zum Nachweis der Bindung von Proteinen an DNA wurden entsprechende DNA-Fragmente mittels PCR (2.8.2.1) amplifiziert und aufgereinigt (2.7.2.5). Die Bindungsreaktion erfolgte zwischen einem „Strep-tagII“ Fusionsprotein und den entsprechenden DNA-Fragmenten. Der Bindeassay wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt und hierfür wurde der gelistete Reaktionsansatz pipettiert:

2x Tris-Binde-Puffer	7,5	µl
Proteinlösung (0,5-2 µg/µl)	x	µl
DNA-Fragment (5 ng/µl)	1	µl
BSA <sup>1)</sup> (1 mg/ml)	1	µl
<i>A. bidest.</i>	ad	15 µl

1) Die Zugabe von BSA diente als Negativkontrolle und erfolgte nur in den Ansätzen ohne Ziel-Protein.

Die Spezifität der DNA-Protein-Bindung wurde durch die Zugabe von 1 µg Lachsspermien DNA bestätigt. Grundsätzlich inkubierten die Bindungsansätze für 20 min bei 25 °C und die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Loading Dye gestoppt. Je nach Fragestellung wurde den Ansätzen zusätzlich NAD<sup>+</sup> und/oder NADH in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Um eine DNA-Nicotinamid Ko-Präzipitation zu verhindern, wurde das Tris-HCl des 2x Binde-Puffers durch HEPES ersetzt. Für den Bindeassay wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

2x HEPES-Binde-Puffer	7,5	µl
Proteinlösung (0,5 µg/µl)	x	µl
DNA-Fragment (5 ng/µl)	1	µl
BSA <sup>1)</sup> (1 mg/ml)	1	µl
NAD <sup>+</sup> (50 mM)	x	µl
NADH (50 mM)	x	µl
<i>A. bidest.</i>	ad	15 µl

1) Die Zugabe von BSA diente als Negativkontrolle und erfolgte nur in den Ansätzen ohne Ziel-Protein.

Um die Bindung von Protein und Coenzym zu begünstigen, wurde zunächst der Reaktionsansatz ohne DNA-Fragmente angesetzt. Dann erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei 25 °C. Eine weitere Inkubation von 15 min bei 25 °C schloss sich nach der Zugabe der DNA-Fragmente an. Zum Abstoppen aller Reaktion wurde den Ansätzen 2 µl Loading Dye zugesetzt und anschließend auf ein 6 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Um eine Überhitzung während der Elektrophorese zu verhindern, wurde diese bei 4 °C mit einer konstanten Spannung von 80 V für 2 h in 0,5x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Zur Entfernung von überschüssigem APS erfolgte zudem ein Vorlauf bei 80 V, 4 °C für 1 h. Hatte die Lauffront ca. 2/3 des Polyacrylamidgels passiert, wurde die Elektrophorese beendet und es folgte eine Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) für 30 min. Abschließend wurde die DNA visualisiert.

#### 2x Binde-Puffer

Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	4	ml	40	mM
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	800	µl	4	mM
NaCl	1,64	mg	300	mM
Ficoll 400 (20 % [v/v])	30	ml	6	%
DTT (1 M)	100	µl	1	mM
<i>A. bidest.</i>	ad	100	ml	

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit verdünnter HCl auf 7,5 eingestellt. Erst nach der Sterilisation erfolgt die Zugabe von DTT aus einer sterilen Stammlösung (1 M). Zudem wurde, wenn notwendig, Tris-HCl durch HEPES gleicher Konzentration ersetzt.

#### Polyacrylamidgel (6 % [w/v], nativ)

Acrylamidlösung 4 K (6 %)	100	ml
APS	1	ml
TEMED	50	µl

### 2.13.6 Enzymassays

#### 2.13.6.1 Thiolase Assay (Hartmanis und Gatenbeck, 1984)

Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall (2.13.1) wurde die Proteinsuspension für 30 min, 4°C und 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand nach der Bradfordmessung (2.13.2) für die Bestimmung der Thiolaseaktivität (Acetyl-CoA Acetyltransferase, [EC 2.2.1.9]) genutzt. Die Messung der Reaktion erfolgt in Richtung der CoA-abhängigen Acetacetyl-CoA Spaltung. Während dieser Reaktion wird die Acetoacetatyl-CoA-Abnahme bei 303 nm spektralphotometrisch (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig) bestimmt. Die Messung der Aktivität erfolgt aerob bei RT und wird wie folgt pipettiert:

1. 450 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,0) in eine Plastikküvette (Schichtdicke 1 cm) vorlegen
2. Zugabe von 2,5 µl Acetacetyl-CoA (10mM) und 10 µl freies CoA (10mM)
3. Starten der Reaktion durch Zugabe von zellfreiem Rohextrakt (kann entsprechend der Proteinkonzentrationen bis zu 50 µl betragen)

Nach Bestimmung der Extinktionsänderung bei 303 nm wurde die spezifische Aktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot (-)1000}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot c_{\text{Protein}}} \cdot VF \quad \left[ \frac{U}{mg} \right]$$

**Formel 3: Spezifische Aktivität.** V, Gesamtvolumen; v, Probenvolumen; ΔE, Extinktionsänderung; ε, Extinktionskoeffizient von Acetacetatyl-CoA (14.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>); d, Schichtdicke (1cm); c<sub>Prot</sub>, Proteinkonzentration.

#### 2.13.6.2 Crotonase Assay (Andersch *et al.*, 1983)

Die Crotonaseaktivität (L-3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase, [EC 4.2.1.17]) kann durch die Absorptionsabnahme von Crotonyl-CoA, bedingt durch die Hydratation der konjugierten Doppelbindung, gemessen werden. Der zellfreie Extrakt wurde wie unter 2.13.6.1 beschrieben vorbereitet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in eine Küvette vorgelegt und die Extinktion bei 263 nm aerob bei Raumtemperatur bestimmt (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig). Mit der erhaltenen Extinktionsänderung, dem Extinktionskoeffizienten von Crotonyl-CoA (6.700 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) und der oben beschriebenen Formel 3 (2.13.6.1) konnte anschließend die spezifische Aktivität der Crotonase berechnet werden.

1. 480 µl 100 mM Tris-HCl- Puffer (pH 7,6) in einer Plastikküvette vorlegen
2. Zugabe von 7,5 µl Crotonyl-CoA (10 mM)
3. Zugabe von 5 bis 10 µl von zellfreiem Extrakt (unter Umständen musste der Rohextrakt verdünnt eingesetzt werden)

#### 2.13.6.3 Alkohol-Dehydrogenase Assay (Dürre *et al.*, 1987)

Die Butanol-Dehydrogenase {Butanol:NAD<sup>+</sup> Oxidoreduktase [Alkohol-Dehydrogenase] [EC 1.1.1.1], Butanol:NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase [Alkohol-Dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>)] [EC 1.1.1.2]} Aktivität konnte durch die Oxidation von NADPH oder NADH (Clark *et al.*, 1989) untersucht werden. Ebenso wurde die Alkohol-Dehydrogenase Aktivität durch den Austausch von Butyraldehyd zu Acetaldehyd überprüft. Die gesamte Methodendurchführung wurde soweit es möglich war anaerob durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte mittels Formel 3 unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für NAD(P)H (6.220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (2.13.6.1).

1. 800 µl 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6; anaerob) in eine Plastikküvette vorlegen
2. Zugabe von 2,3 µl NADPH/NADH (100 mM) und 1,5 µl Butyraldehyd/Acetaldehyd (1M)
3. Zugabe von 50 bis 200 µl von zellfreiem Rohextrakt
4. Spektrophotometrische Messung der NADPH/NADH-Abnahme (anaerob bei 340 nm, 30 °C)

#### **2.13.6.4 Hydrogenase Assay (Junelles *et al.*, 1988)**

Zur Aktivitätsbestimmung der Hydrogenase [EC 1.12.7.2] im Rohextrakt wurde Methylviologen als künstlicher Elektronencarrier verwendet. Die Änderung des Redoxstatus von Methylviologen kann spektrophotometrisch bei 560 nm gemessen werden. Da die Hydrogenaseaktivität durch Sauerstoff negativ beeinflusst wird (Gheshlaghi *et al.*, 2009), erfolgte die Analyse bei 30 °C unter strikt anaeroben Bedingungen. Die Proben wurden, wie unter 2.13.6.1 erläutert, vorbereitet und die Messung erfolgte in einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre plus 5 % Wasserstoff. Zudem wurde β-Mercaptoethanol zu Stabilisierung des Enzyms genutzt und der Reaktionsansatz folgendermaßen angesetzt:

1. 800 µl 100 mM Ka-Phosphat-Puffer (pH 7,2; anaerob) in eine Plastikküvette vorlegen
2. Zugabe von 100 µl β-Mercaptoethanol (7 M)
3. Zugabe von 100 µl Methylviologen (200 mM)
4. Starten der Reaktion durch Zugabe von 5 µl zellfreiem Extrakt

Mit der erhaltenen Extinktionsänderung, dem Extinktionskoeffizient von Methylviologen ( $7.710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und der oben beschriebenen Formel 3 (2.13.6.1) konnte anschließend die spezifische Aktivität der Hydrogenase berechnet werden.

#### **2.13.6.5 Acetat- und Butyratkinase Assay (Rose, 1955)**

Die Aktivitätsbestimmung der Acetatkinase [EC 2.7.2.1] und Butyratkinase [EC 2.7.2.7] im Zellextrakt erfolgte durch die Messung der Acylphosphatbildung aus Acetat beziehungsweise Butyrat. Dabei reagiert Acylphosphat mit Hydroxylamin zu Hydroxamic Säure. Diese Säure formt mit Eisen Ionen eine charakteristisch gelbe Farbe mit einer maximalen Absorption bei 540 nm, welche spektrophotometrisch ermittelt wurde. Die Enzymaktivität wurde basierend auf dem Extinktionskoeffizienten für Hydroxylamin  $169 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wie zuvor beschrieben berechnet (2.13.6.1, Formel 3).

1. Herstellung der Stocklösung (3,2 M Ka-Aacetat oder Na-Butyrat; 1 M Tris-HCl, pH 7,4; 1 M MgCl<sub>2</sub>; im Verhältnis 25:5:1) und Hydroxylaminlösung (28 % Hydroxylaminhydrochlorid und 4 M KOH; im Verhältnis 1:1)  
→ beides immer frisch ansetzen
2. 300 µl Stocklösung, 350 µl Hydroxylaminlösung, 100 µl ATP (100 mM), 1 bis 10 µl zellfreiem Extrakt, mit *A. dest.* auf 1 ml auffüllen
3. Reaktionsansatz auf 29 °C erhitzen
4. Starten der Reaktion durch Zugabe von zellfreiem Extrakt
5. Inkubation bei 29 °C für 2 min
6. Abstoppen der Reaktion durch 1 ml 10 % Trichloracetat und Entfernen von eventuellen Präzipitaten durch Zentrifugieren (4000 x g, 10 min, 4 °C)
7. Farbreaktion durch Zugabe von 4 ml FeCl<sub>3</sub>-Reagenz (1,25 % FeCl<sub>3</sub> in 1N HCl), Absorptionsbestimmung bei 540 nm

#### 2.13.6.6 Phosphotransbutyrylase Assay (Wiesenborn *et al.*, 1989)

Die Messung der Aktivität der Phosphotransbutyrylase [EC 2.2.1.19] erfolgte in Richtung der Butyrylphosphat-Bildung. Dabei wird die Bildung des Komplexes zwischen CoASH und 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoësäure) (DTNB) bei 412 nm gemessen (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig). Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

1. 1-ml-Reaktionsansatz in einer Plastikküvette
2. Zugabe von 0,1 M Ka-Phosphat-Puffer (pH 7,0) sowie 10 µl Butyryl-CoA (6 mM) und 4 µl DTNB (1 M)
3. Starten der Reaktion durch Zugabe von 1 bis 100 µl des zellfreien Extraktes
4. Bestimmung der Extinktion bei 412 nm

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte wie unter 2.13.6.1 beschrieben und unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten für DTNB ( $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 2.13.6.7 Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase Assay (Meinecke *et al.*, 1989)

Zur Aktivitätsbestimmung der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor) [EC 1.2.7.1] im Rohextrakt wurde Methylenblau als künstlicher Elektronencarrier verwendet. Die Änderung des Redoxstatus von Methylenblau kann spektrophotometrisch bei 660 nm gemessen werden (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig). Da die Pfor-Aktivität durch Sauerstoff negativ beeinflusst wird (Meinecke *et al.*, 1989), erfolgte die Analyse bei 30 °C unter strikt anaeroben Bedingungen. Die Proben wurden, wie unter 2.13.6.1 erläutert, vorbereitet und der Reaktionsansatz folgendermaßen angesetzt:

1. 0,73-ml-Reaktionsansatz in einer Plastikküvette
2. Zugabe von 25 mM KPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 6,9; anaerob), 0,14 mM CoASH, 55 µM Methylenblau und 1,4 mM Na-Pyruvat
3. Starten der Reaktion durch Zugabe von 1 bis 5 µl von zellfreiem Extrakt
4. Bestimmung der Extinktion bei 660 nm

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte wie unter 2.13.6.1 beschrieben und unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten für Methylenblau ( $77.970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **2.13.6.8 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Assay (Martinez et al., 2008)**

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysiert unter Verwendung des Cofaktors  $\text{NAD(P)}^+$  die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Glycerinaldehyd-1,3-Bisphosphat. Die GAPDH-Aktivität kann durch die Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  bestimmt werden. Die Vorbereitung des zellfreien Extrakts erfolgte wie unter 2.13.6.1 beschrieben. Der Reaktionsansatz wurde in eine Küvette vorgelegt und die Extinktion bei 340 nm aerob bei Raumtemperatur gemessen (Ultrospec 3000; Amersham, Braunschweig). Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

1. 1-ml-Reaktionsansatz in einer Quarzküvette
2. Zugabe von 200 µl zellfreiem Extrakt, 250 µl Tricin-Puffer (200 mM; pH 8,5), 300 µl β-Mercaptoethanol, 100 µl von 10 mM  $\text{NAD}^+$  (10 mM) oder  $\text{NADP}^+$  (10 mM) und 50 µl *A. dest.*
3. Starten der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Glycerinaldehyd-3-Phosphat (10 mM)
4. Bestimmung der Extinktion bei 340 nm

Mit der erhaltenen Extinktionsänderung, dem Extinktionskoeffizienten von  $\text{NAD(P)}^+$  ( $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und der oben beschriebenen Formel 3 (2.13.6.1) konnte anschließend die spezifische Aktivität der GAPDH berechnet werden.

### **2.14 Bezugssquellen**

Soweit nicht anders in Tabelle 2.4 vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Qiagen (Hilden) Thermo scientific (Braunschweig), Peqlab (Erlangen), Applichem (Darmstadt), Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Diagonal (Münster), Fluka/Riedel-de Haën (über Sigma-Aldrich), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) bezogen. In der Regel hatten sie die Reinheitsgrade „reinst“ oder „zur Analyse“. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert.

**Tab. 2.4: Bezugssquellen**

Hersteller	Produkt
Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>	Oligonukleotide, Antibiotika, Ficoll 400, Butyryl-CoA, Crotonyl-CoA, Methylviologen, DTNB
Oxoid GmbH, Wesel <a href="http://www.oxoid.com">www.oxoid.com</a>	Reinforced Clostridial Agar (RCA)

Thermo scientific Inc., Braunschweig <a href="http://www.thermofischer.com">www.thermofischer.com</a>	Gene Ruler 1kb DNA Ladder, FastAP Alkalische Phosphatase mit Puffer, FastDigest Restriktionsenzyme mit Puffern, Restriktionsenzyme mit Puffern, T <sub>4</sub> -Ligase mit Puffer, High Fidelity Enzyme Mix, dNTPs
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe <a href="http://www.carl-roth.de">www.carl-roth.de</a>	Agarose, Butyraldehyd, Acetaldehyd
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim <a href="http://www.roche-applied-science.com">www.roche-applied-science.com</a>	Agar-Agar, DIG DNA Labeling Kit, Anti-Digoxigenin AP, Blocking Reagent, Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-DH, DNA Molecular Weight Marker II, Anti-Digoxigenin-AP, CDP-Star <sup>TM</sup>
Qiagen GmbH, Hilden <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a>	QIAquick Gel Extraction Kit
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen <a href="http://www.peqlab.de">www.peqlab.de</a>	peqGold Pwo Ploymerase I
Applichem GmbH, Darmstadt <a href="http://www.applichem.de">www.applichem.de</a>	Ribonuklease A, NBT, BCIP, NADP, ATP, Phenol-Chloroform-IAA, Proteinase K, Ethidiumbromid, EDTA, DMSO, Formaldhyd, Formamid, DNasel, RNaseA, NBT, BCIP, NADPH, NADH, NADP, ATP, Erythromycin, Trypton, Hefeextrakt, Phenol pH 4,0, RNase-ExitusPlus <sup>TM</sup> , Lysozym, Na-Butyrat
Megazyme International Ltd., Wicklow, Irland <a href="http://www.megazyme.com">www.megazyme.com</a>	D-Lactic Acid (D-Lactate) and L-Lactic Acid (L-Lactate) Kit
Invitrogen <sup>TM</sup> , Carlsbad <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>	SuperScript III Reverse Transkriptase Kit
IBA GmbH, Göttingen <a href="http://www.ibo-go.com">www.ibo-go.com</a>	Strep-Tactin-Sepharose, Desthiobiotin
Sartorius stedim AG, Göttingen <a href="http://www.sartorius.de">www.sartorius.de</a>	10 kDa Aufkonzentrierungssäulen

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des potentiellen Transkriptionsregulators Rex im Metabolismus von *C. acetobutylicum* ATCC 824 untersucht. Insbesondere sollte geklärt werden, ob Rex an der Erfassung des intrazellulären NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Levels beteiligt ist und damit verbunden einen Einfluss auf den Kohlenstoff- und Elektronenfluss besitzt. Durchgeführte *in silico*- und *in vitro*-Analysen sollten dabei den Mechanismus der DNA-Bindung des Repressors Rex in Abhängigkeit von NADH und NAD<sup>+</sup> und der damit verbundenen Regulation der Transkription von Kandidatengenen aufklären. Weiterhin sollte durch eine genetische Manipulation mittels ClosTron® Methode (Heap *et al.*, 2007; 2010) die Funktion des offenen Leserahmens *CAC2713* (*rex*) während der Produktbildung näher beleuchtet werden.

#### 3.1 Identifikation des Repressors Rex

Wie einleitend bereits erwähnt, befindet sich nach Nölling *et al.* (2001) im Genom von *C. acetobutylicum* ein offener Leserahmen *CAC2713*, dessen Genprodukt als ‚Redox sensing transcriptional repressor Rex‘ ausgewiesen ist. Der ORF *CAC2713* aus *C. acetobutylicum* konnte zunächst durch genomische ‚Blast‘-Analysen (Cummings *et al.*, 2002), mit Hilfe der Proteinsequenzen von *B. subtilis*, gefunden werden. Die Gensequenz von *CAC2713* besteht aus 645 Bp und das abgeleitete Genprodukt umfasst 214 As. Ein Abgleich der Aminosäuresequenz des putativen Rex-Proteins aus *C. acetobutylicum* mit bereits beschriebenen Redoxregulatoren mittels ‚EMBOSS align‘-Software (Rice *et al.*, 2000) ergab hohe Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Proteinen in *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces coelicolor* (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenz des ORF *CAC2713* (*rex*) mit bekannten Rex-Proteinen.

Protein	ORF	Aminosäuresequenz Ähnlichkeit/Identität [%]
Rex <i>C. acetobutylicum</i>	<i>CAC2713</i>	100/100
Rex <i>B. subtilis</i>	<i>BSU05970</i>	54/36
Rex <i>S. coelicolor</i>	<i>SCO3320</i>	45/33
Rex <i>S. aureus</i>	<i>SAOUHSC_02273</i>	56/38

Aus Untersuchungen in *B. subtilis* und *S. aureus* ist bekannt, dass die Repressoren der Rex-Familie an spezifische ‚Inverted repeats‘ (IR) in den Promotorbereichen ihrer Zielgene binden. Diese DNA-Sequenzabschnitte werden als Rex-Boxen bezeichnet (Wang *et al.*, 2008; Pagels *et al.*, 2010). Um nun Rex-Boxen bzw. ‚Inverted repeats‘ vor putativen Zielgenen zu identifizieren, erfolgte ein *in silico*-Abgleich der Genomsequenz von *C. acetobutylicum* ATCC 824 mit den entsprechenden Rex-Box Sequenzmotiven aus *B. subtilis* und *S. aureus* (IR<sub>B.subtilis</sub> und IR<sub>S.aureus</sub>) unter Verwendung der ‚Virtual footprint‘-Software der Prodoric Datenbank (Münch *et al.*, 2003).

**Tab. 3.2:** Putative Rex-Boxen vor ausgewählten Genen in *C. acetobutylicum*. Die Tabelle zeigt ausgewählte Gene und deren annotierte Funktion, welche ein potentielles Rex-Bindemotiv beinhalten. Die Zahlen geben den Abstand zum Start-Codon wieder und die schwarz unterlegten Buchstaben verweisen auf konservierte Basenpaare.

Gen/ORF	Annotierte Funktion <sup>1)</sup>	Sequenzmotiv <sup>2)</sup> und Abstand zum ATG
<i>ldh</i>	L-Laktat-Dehydrogenase	<b>TTGTT</b> aat <b>T</b> Taa <b>TTAACtA</b> (-81)
<i>crt</i>	Enoyl-CoA Hydratase/Crotonase	<b>TTGTT</b> ataaa <b>T</b> a <b>TTAACAA</b> (-28)
<i>thl</i>	Acetyl-CoA Acetyltransferase/Thiolase	<b>TTGT</b> gttt <b>TT</b> t <b>TTAACAA</b> (-144)
<i>adhE2</i>	bifunktionale Acetaldehyde/ Alkohol-Dehydrogenase	<b>TTGTT</b> aaa <b>T</b> gt <b>TTgACAA</b> (-245)
<i>CAC1523</i>	Fruktokinase	<b>TTGTT</b> act <b>TT</b> t <b>TTcACAt</b> (-25)
<i>fadB</i>	Enoyl-CoA Hydratase	<b>TTGT</b> aaaaa <b>T</b> ac <b>TtACAA</b> (-315)
<i>CAC2271</i>	FeS Oxidoreduktase	a <b>T</b> a <b>TG</b> aaaaaa <b>TTcATAA</b> (-34)
<i>CAC2451</i>	SoxR-Familie Transkriptionsregulator	<b>TTG</b> agatt <b>TT</b> tttc <b>AtAA</b> (-173)
<i>perR</i>	‘Ferric uptake’-Regulator	c <b>TGT</b> aaaaa <b>TtTTAAaAA</b> (-124)

1) Entsprechend der Datenbank des National Center of Biological Investigation, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) gelistet.

2) Sequenzmotive wurden mit Hilfe der ‚Virtual footprint‘-Software der Prodoric Datenbank identifiziert (<http://prodoric.tu-bs.de>; Münch *et al.*, 2003). Als zu suchendes Motiv wurde die Nukleotidsequenz 5'-TTGTGAAW<sub>4</sub>TTCACAA-3' verwendet.

Die Softwareeinstellungen dieser Analyse wurden so gewählt, dass ausschließlich die palindromische Nukleotidsequenz mit maximal drei Fehlpaarungen zugelassen wurde. So konnten 72 Gene ermittelt werden, die innerhalb von 350 Bp ‚upstream‘ des jeweiligen Startcodons eine potenzielle Rex-Box besitzen (Tab. A.3, Anhang). Zu den Genen mit putativen Rex-Boxen in ihrem Promotorbereich gehörten unter anderem diejenigen, die für die L-Laktat-Dehydrogenase (*ldh*, CAC0267), die Crotonase (*crt*, CAC2712) und die Acetyl-CoA Acetyltransferase/Thiolase (*thl*, CAC2873) sowie für die auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisierte Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 (*adhE2*, CAP0035) kodieren (Tab. 3.2). Ein weiterer Abgleich der putativen Sequenzmotive der genannten Gene ergab ein 18 Bp großes

Rex-Bindemotiv mit einer Konsensus-Sequenz, welche als 5`-TTGTTwwwTTwTTAACAA-3` definiert wurde.

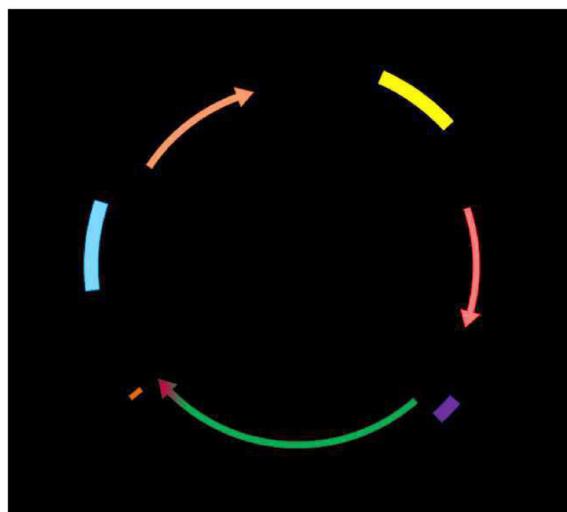
### **3.2 Funktionelle Analyse des potentiellen Repressors Rex**

Nicht nur die Lage des offenen Leserahmens *CAC2713* in der 5`-untranslatierten Region (5`UTR) des *bcs*-Operons als auch die Ähnlichkeiten zu in der Vergangenheit ausführlich beschrieben NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Regulatoren anderer Gram-positiver Mikroorganismen (Brekasis und Paget, 2003; Pagels *et al.*, 2010; Wang *et al.* 2008) sondern auch die Existenz eines potenziellen Rex-Bindemotivs in der Promotorregion stellten einen interessanten Arbeitsansatz dar.

Um zu untersuchen, ob das Rex-Protein aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 an die vorausgesagten Rex-Boxen in den Promotorbereichen entsprechender Gene binden kann, wurden Promotor-Bindungsstudien mittels ‚Electrophoretic mobility shift assays‘ (EMSA) durchgeführt. Zudem sollte der Einfluss von NADH und NAD<sup>+</sup> auf die Ausbildung eines Rex-DNA-Komplexes experimentell untersucht werden. Hierfür wurde zunächst das von ORF *CAC2713* kodierende Rex-Protein heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt.

#### **3.2.1 Klonierung und Überexpression von Rex**

Zur heterologen Expression von Rex in *E. coli* wurde das pT-Vektorsystem verwendet (Girbal *et al.*, 2005). Dieses Vektorsystem basiert auf einem *E. coli* - *C. acetobutylicum* Shuttlevektor und zeichnet sich durch einen C-terminalen ‚Strep-tagII‘ aus (Abb. 3.1). Die Fusionsproteine können schnell und effizient über eine Strep-Tactin-Sepharose-Affinitätsmatrix chromatographisch aufgereinigt werden. Aufgrund der C-terminalen Lokalisation des ‚Strep-tags‘ können nur vollständig translatierte Proteine an der Matrix haften (Riebe, 2005). Von Nutzen ist zudem, dass bereits das Gen *hydA* aus *C. acetobutylicum* in dem pT-Vektor ligiert vorlag. Dieses Gen kann mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xma*I aus dem Vektor entfernt und durch ein entsprechend behandeltes DNA-Fragment ersetzt werden. Außerdem besitzt dieser Vektor den Thiolase-Promotor (*thl*-Promotor) aus *C. acetobutylicum*, von dem aus die klonierten DNA-Fragmente ohne Induktion transkribiert werden (Abb. 3.1). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieser Promotor auch in *E. coli* aktiv ist und zu hohen Proteinausbeuten führt (Riebe, 2009).

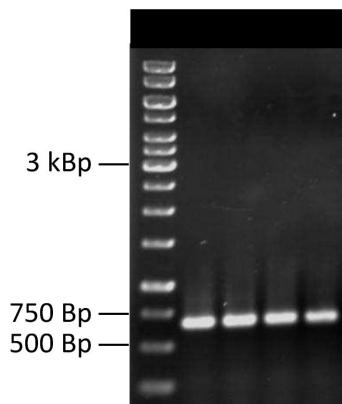


**Abb. 3.1:** Plasmidkarte von pThydA (Girbal et al., 2005; mod.). Dargestellt ist der Vektor pThydA. Hervorgehoben ist das zwischen den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I (*Cfr*9I) befindliche *hydA*-Gen (grün) mit dem C-terminalen ‚*Strep*-tagII‘ (rot), die Ampicillin- (orange) sowie die Erythromycinresistenz (rot) und der *thl*-Promotor (violett).

### 3.2.1.1 Klonierung von *rex* in den pT-Vektor

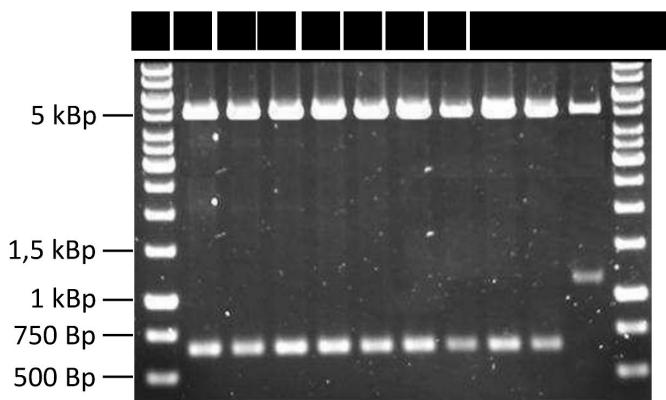
Zur Amplifikation des *rex*-Gens aus *C. acetobutylicum* wurden Primer so abgeleitet, dass diese, bis auf die eingefügten Restriktionsschnittstellen, vollständig homolog zu der Sequenz von CAC2713 waren. Für die spätere Klonierung des Gens in den Expressionsvektor wurden der Forward-Primer Rex\_BamHI\_fw und der Reverse-Primer Rex\_Cfr9I\_rev verwendet (Tab. A.2, Anhang).

Als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion diente chromosomal DNA (2.6.3) aus *C. acetobutylicum* ATCC 824. Der Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil zur Erzeugung der DNA-Fragmente entsprachen denen unter 2.8.2.1 beschrieben. Das Ergebnis der Amplifikation wurde mittels Agarosegelektrophorese (2.7.3.1) überprüft und ist in Abbildung 3.2 aufgeführt. Wie dem Gelbild zu entnehmen ist, konnte *rex* erfolgreich amplifiziert werden. Die Spuren 2 bis 5 zeigen das zu erwartende PCR-Fragment mit einer Größe von etwa 650 Bp. Anschließend wurden die Amplifikate mit *Cfr*9I (Isochizomer von *Xba*I) verdaut (2.8.3.1), danach wurde dem Reaktionsansatz *Bam*HI zugefügt und erneut inkubiert. Es schloss sich eine Gelextraktion der PCR-Fragmente an (2.7.2.5), bevor diese direkt in einer Ligation in den pT-Vektor eingesetzt wurden. Dazu wurde der Vektor pThydA ebenfalls sequenzspezifisch hydrolysiert (2.8.3.1). Anschließend erfolgte eine Restriktion von pThydA mit *Cfr*9I und eine Behandlung wie unter 2.7.2.3 beschrieben. Die so linearisierten und aufgereinigten Plasmide wurden dann mit Hilfe des ‚FastDigest‘ *Bam*HI-Restriktionsenzyms gespalten.



**Abb. 3.2:** **rex-Amplifikate.** Dargestellt sind mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente von *rex* (*CAC2713*), welche in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt wurden. Spur 1: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2 bis 5: PCR-Fragmente *rex* (648 Bp).

Weiterhin wurde dem Reaktionsansatz eine ‚FastAP‘ alkalische Phosphatase (2.14) zugesetzt, um eine Selbstligation zu verhindern (2.8.3.3). Eine Aufreinigung des linearisierten Vektors erfolgte, wie unter 2.7.2.5 erläutert, wobei auf den Schritt der Gelextraktion verzichtet und direkt mit der Anleitung laut Hersteller weiter verfahren wurde. Der so vorbereitete Vektor wurde mit behandeltem PCR-Fragment *rex* versetzt und mittels T4-DNA-Ligase ligiert (2.8.3.3). Dann wurde der Ligationsansatz für eine Transformation in  $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen eingesetzt (2.9.1.1). Eine Selektion von plasmidtragenden *E. coli*-Stämmen wird durch eine Ampicillinresistenz ermöglicht. Aus entsprechenden Klonen wurde die Plasmid-DNA (2.6.2) isoliert und eine Kontrollrestriktion mit ‚FastDigest‘ *Bam*HI und *Xba*I durchgeführt. Die gewünschten rekombinanten Plasmide sollten das *rex*-Gen aus *C. acetobutylicum* anstelle des *hydA*-Gens enthalten. Beispielhaft stellt die Abbildung 3.3 Kontrollrestriktionen in einem Agarosegel dar.

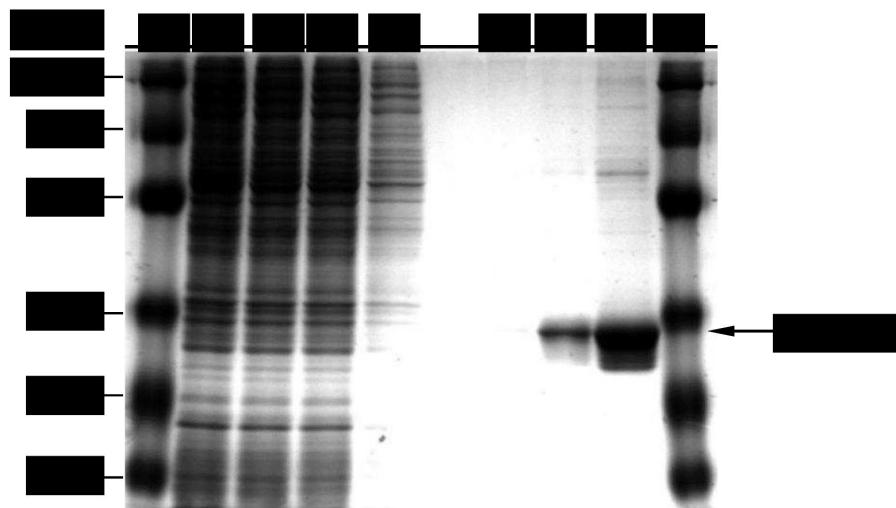


**Abb. 3.3:** **Restriktionsanalyse von rekombinanten pT-Klonen.** Die Plasmid-DNA von pTrex-Klonen sowie ein Referenzplasmid wurden mit *Bam*HI und *Xba*I (‚FastDigest‘) spezifisch hydrolysiert und anschließend in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Spur 1 und 12: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2 bis 10: doppelt restriktiertes pTrex Plasmid, Spur 11: Referenzplasmid pTnror (Insert 1,1 kBp).

Rekombinante Plasmide zeigten nach einer Restriktion einen linearisierten pT mit entsprechender Größe von ca. 5 kBp und eine zweite Bande mit einer Größe von etwa 650 Bp, die *rex* entsprach. Vor der Expression und Aufreinigung von Rex wurde das Plasmid einer Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) unterzogen. Die Analyse der Sequenz ergab, dass während der Amplifikation und Klonierung keine Punktmutationen aufgetreten sind. Abschließend erfolgte eine weitere Transformation (2.9.1.1) des erzeugten pTrex in elektrokompetente *E. coli* BL21-Zellen.

### 3.2.1.2 Heterologe Expression von Rex

Für Promotor-Bindungsstudien war es zunächst notwendig, ein möglichst reines Rex-Protein zur Verfügung zu stellen. Hierfür wurde Rex heterolog exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Zur Expression von Rex wurde 250 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (2.2.2) mit 2 ml der plasmidtragenden *E. coli*-Stämme BL21 (pTrex) angeimpft. Die Kulturen konnten ohne Induktion bei 30 °C und 180 Upm über Nacht inkubiert werden. Nach der Zellernte schloss sich eine Herstellung von geklärten Lysaten mittels Ultraschall an (2.13.1). Die Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Sepharose erfolgte wie unter 2.13.3 beschrieben. Um einen Erfolg der heterologen Expression zu überprüfen, wurden die verschiedenen Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.13.4.1). Exemplarisch ist ein SDS-Gel der Aufreinigung in Abbildung 3.4 dokumentiert.



**Abb. 3.4: Native Aufreinigung von Rex-Fusionsprotein aus Proteinextrakten nach Expression in *E. coli* BL21.**  
Gezeigt ist eine 12 %ige [w/v] SDS-PAGE nach Färbung mit kolloidalen Coomassie. Es wurden die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung an Strep-Tactin-Sepharose aufgetragen. Spur 1 und 9: Markerproteine (molekulare Masse), Spur 2: Rohextrakt, Spur 3: Durchfluss nach Beladen der Säule, Spur 4 bis 5: Waschfraktionen, Spur 6 bis 8: Elutionsfraktionen (2 bis 4).

Es war zwar keine verstärkte Proteinbande im Rohextrakt erkennbar, trotzdem konnte das Fusionsproteins „Strep-tagII“-Rex aufgereinigt werden. Die Spuren 7 und 8 zeigen eine prominente Bande bei etwa 26 kDa in den Elutionsfraktionen, deren Größe dem Protein Rex entsprach (Abb. 3.4, Spur 7 und 8). Es folgte nun die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Eluaten mittels Bradford Assay (2.13.2), wobei die Fraktionen 3 und 4 die höchsten Proteinkonzentrationen enthielten. Die durchschnittliche Proteinkonzentration betrug ca. 0,2 bis 0,3 µg/µl. Im Fall einer geringen Ausbeute wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und mittels einer 10 kDa-Säule (Sartorius stedim, Göttingen) laut Hersteller aufkonzentriert, so dass der Proteingehalt auf bis zu 1 µg/µl gesteigert werden konnte. Die Proteine wurden dann direkt für weitere Versuche eingesetzt oder maximal 48 h bei 4 °C gelagert.

### **3.2.2 Promotor-Bindungsstudien von Rex *in vitro***

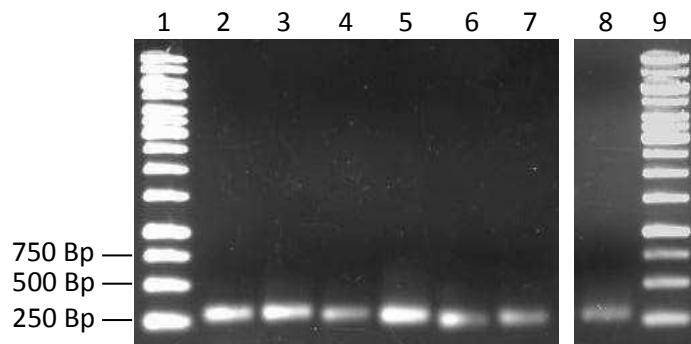
Die potentielle Rolle von Rex als redox-abhängiger Repressor erfordert die Fähigkeit des Proteins zur Bindung an spezifische Promotorsequenzen (Rex-Box). In *C. acetobutylicum* ATCC 824 ist bisher nur wenig über die Redoxregulation und deren Auswirkung auf den Stoffwechsel bekannt. Aus anderen Gram-positiven Bakterien weiß man jedoch, dass diese in der Lage sind, den Gehalt von NADH und NAD<sup>+</sup> in der Zelle zu bestimmen und durch eine DNA-Bindung an den Promotorbereich von Zielgenen deren Expression zu regulieren (Pagels *et al.*, 2010). Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Rex an der Regulation der Genexpression in *C. acetobutylicum* wurden „Gelshift“-Experimente durchgeführt.

#### **3.2.2.1 Amplifikation von Promotorfragmenten**

DNA-Fragmente der 5`UTR, die potentielle Rex-Boxen mit den Sequenzmotiv 5`-TTGTTwwwTTwTTAACAA-3` enthielten, wurden mittels PCR amplifiziert (2.8.2.1). Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie die putative Rex-Box innerhalb einer Sequenz von ca. 270 Bp umfassten. Als Matrize für die PCR diente chromosomal DNA von *C. acetobutylicum*. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle A.2 (Anhang) aufgelistet.

Es wurden die Promotorbereiche vor den Leserahmen der Crotonase (*crt*), 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (*hbd*), Thiolase (*thl*), Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 (*adhE2*), L-Laktat-Dehydrogenase (*ldh*), Rex (*rex*) sowie als Negativkontrolle der Promotorbereich vor dem 16SrRNA-Gen ausgewählt und amplifiziert. Der Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil sind unter 2.10.2.1 aufgeführt. Es konnten alle DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 200 Bp bis 270 Bp amplifiziert werden. Die PCR-Produkte des *crt*-Gens (268 Bp), *hbd* (268 Bp), vor *adhE2* (268 Bp), *thl* (194 Bp), *ldh* (208 Bp), *rex* (264 Bp) sowie der Kontrolle (244 Bp) wurden

elektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend mittels Gelextraktion (2.7.2.5) aufgereinigt. Nach Überprüfung des Aufreinigungserfolges mittels Agarosegelektrophorese (Abb. 3.5) wurden die Promotorfragmente auf eine Arbeitskonzentration von 5 ng/ $\mu$ l verdünnt und konnten für EMSAs eingesetzt werden.

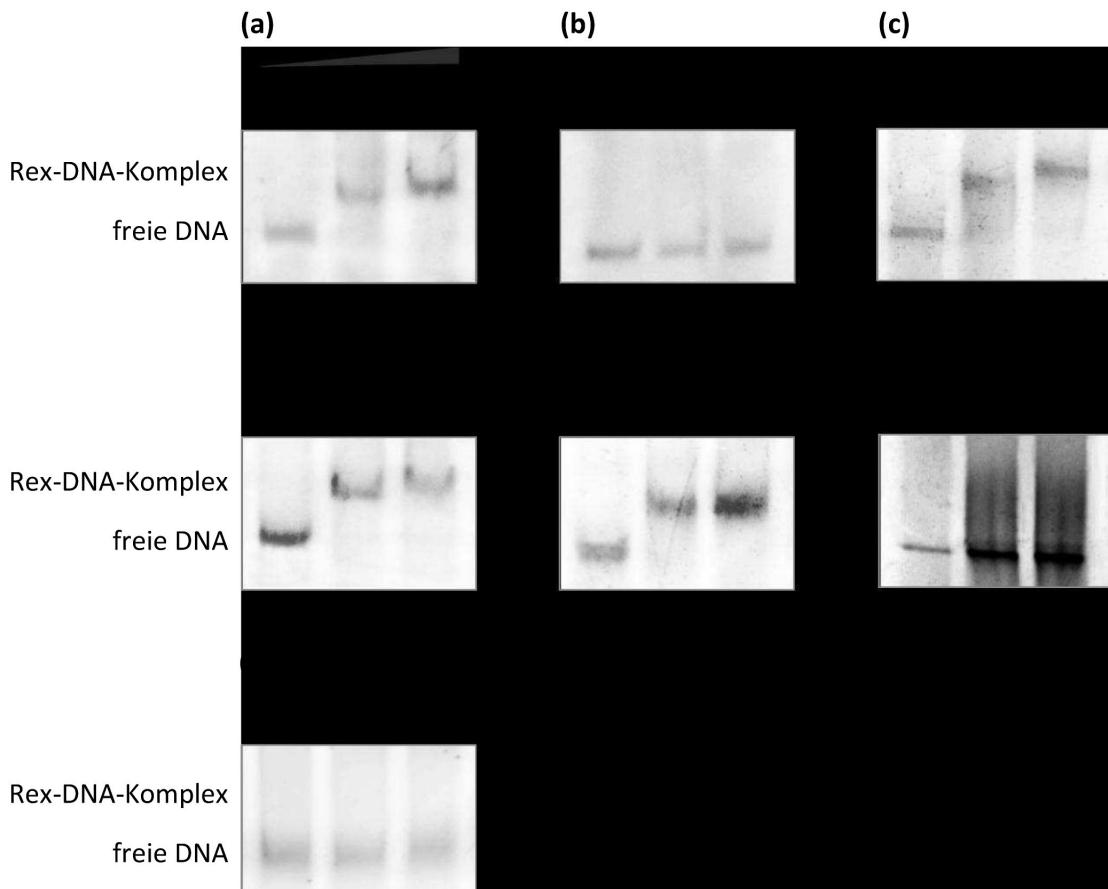


**Abb. 3.5:** Aufgereinigte Promotoramplifikate ausgewählter Gene aus *C. acetobutylicum*. Die PCR-generierten Promotorbereiche wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt und nachfolgend in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Spur 1 und 9: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2: *crt* (268 Bp), Spur 3: *hbd* (268 Bp), Spur 4: *adhE2* (268 Bp), Spur 5: 16 SrDNA (244 Bp), Spur 6: *thl* (194 Bp), Spur 7: *ldh* (208 Bp), Spur 8: *rex* (264 Bp).

### 3.2.2.2 „Electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA)

Für EMSAs wurden 5 ng der entsprechenden Promotorfragmente mit unterschiedlichen Mengen des Rex-Fusionsproteins inkubiert. Um die optimale Proteinkonzentration für „Gelshift“-Experimente zu bestimmen, wurden exemplarisch 5 ng des *crt*-Fragments mit Proteinmengen von 0,5 bis 2  $\mu$ g Rex-Fusionsprotein versetzt. Die Reaktion erfolgte wie unter 2.14.5 erläutert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.13.5) und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Es stellte sich eine Proteinmenge von 1,5 bis 2  $\mu$ g (6 bis 8  $\mu$ M) als optimal heraus, um einen vollständigen „Bandshift“ zu erzeugen. Geringere Proteinkonzentrationen an Rex-Fusionsprotein führten hingegen entweder zu keinem oder nur zu einem unzureichenden „Bandshift“ des DNA-Fragmentes, so dass, für alle weiteren hier aufgeführten EMSAs 6 bzw. 8  $\mu$ M Protein verwendet wurden. Um auszuschließen, dass allein die Zugabe von Protein zu den DNA-Fragmenten einen Einfluss auf das Laufverhalten in einer nativen PAGE hat, wurde einem Ansatz BSA zugefügt. Da kein verändertes Laufverhalten der DNA-Fragmente detektierbar war, wurde die BSA-Zugabe standardmäßig als Kontrolle verwendet (Abb. 3.6, 3.7; jeweils Spur 1). Nach der Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration für einen „Gelshift“ bei 5 ng DNA wurde ebenso für die amplifizierten Promotorregionen von *adhE2*, *thl*, *ldh*, *rex* und 16SrDNA verfahren.

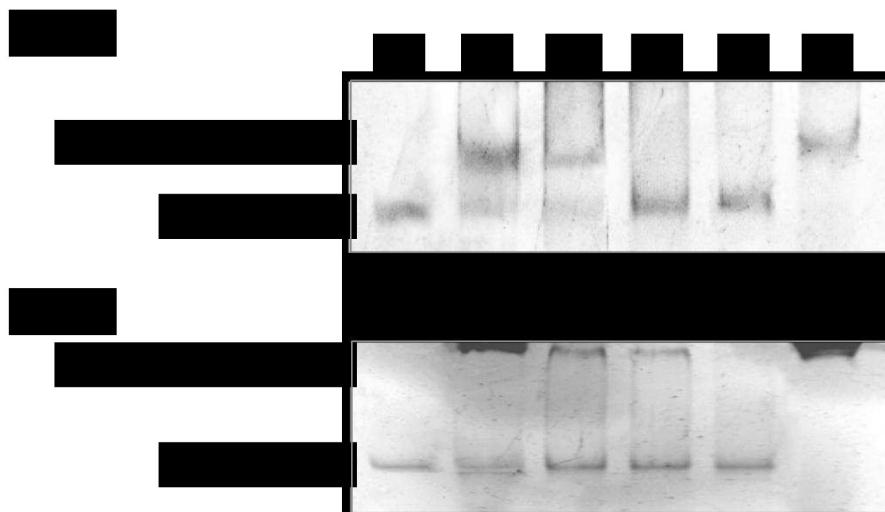
Wie in Abbildung 3.6 zu erkennen, sind die Promotorfragmente von *crt*, *adhE2*, *thl* und *ldh* vollständig geshiftet. Der 5`UTR von *rex* und *hbd* sowie des 16SrRNA-Gens (Negativkontrolle) zeigten keine spezifische Bindung an Rex (Abb. 3.6). Dies muss als Nachweis der Spezifität der Rex-Bindung an die anderen Promotorfragmente gewertet werden.



**Abb. 3.6:** **Interaktion von Rex-Fusionsprotein mit Promotorfragmenten ausgewählter Gene.** Die Verifikation von vorhergesagten Rex-Boxen in Promotorregionen der offenen Leserahmen der *crt* (a), *hbd* (b), *thl* (c), *adhE2* (d), *ldh* (e), *rex* (f) und der 16SrDNA (g) erfolgte mittels ‚Electrophoretic mobility shift assays‘. Der entstandene Protein-DNA-Komplex wurde in einer 6 %igen [w/v] nativen PAGE aufgetrennt und nachfolgend Ethidiumbromid gefärbt. Spur1: DNA ohne Protein, Spur 2: DNA mit 6 µM Rex, Spur 3: DNA mit 8 µM Rex.

Um neben der Bindungsfähigkeit von Rex an spezifische Promotorsequenzen zusätzlich die Allostere zwischen DNA und Dinukleotiden zu untersuchen, wurden EMSAs unter Zugabe von NADH und NAD<sup>+</sup> durchgeführt. Zunächst wurde den Reaktionsansätzen nur das Protein (6 µM) sowie das jeweilige Dinukleotid in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Danach erfolgte die Zugabe von DNA (5 ng) und es schloss sich eine weitere Inkubation an (2.13.5). Dies sollte die bestmögliche Bindung von NAD<sup>+</sup> und NADH an Rex gewährleisten. Die native Polyacrylamideelektrophorese (2.13.5) der Ansätze ist beispielhaft für die Promotorbereiche

von *adhE2* und *crt* in Abbildung 3.7 (a, b) dargestellt. Ein vollständiger ‚Bandshift‘ der *adhE2*- sowie *crt*-Promotorfragmente war nach Zugabe von gereinigtem Rex-Protein zu beobachten (Abb. 3.7, Spur 2). In den Spuren 3 bis 5 ist zu erkennen, dass mit steigendem NADH-Gehalt (1 bis 5 mM) die DNA-Fragmente nicht mehr vollständig geshiftet werden konnten (Abb. 3.7 a, b). Dieser Effekt konnte jedoch durch die Zugabe einer im Vergleich zur NADH-Konzentration (5 mM) fünffach höheren NAD<sup>+</sup>-Konzentration (25 mM) umgekehrt werden (Abb. 3.7, Spur 6).



**Abb. 3.7:** Auswirkungen von NADH und NAD<sup>+</sup> auf die DNA-Bindungsaffinität von Rex. Die ‚Gelshift‘-Experimente erfolgten unter Verwendung der Promotorregionen von *adhE2* (a) und *crt* (b). Die PCR-Produkte (5 ng) wurden mit 6  $\mu$ M aufgereinigtem Rex-Protein und verschiedenen Konzentrationen von NADH und NAD<sup>+</sup> inkubiert. Darauffolgend wurden die Reaktionsansätze in einem 6 %igen [w/v] nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Spur 1: DNA ohne Protein, Spur 2: DNA mit 6  $\mu$ M Rex, Spur 3: DNA mit 6  $\mu$ M Rex + 1 mM NADH, Spur 4: DNA mit 6  $\mu$ M Rex + 2 mM NADH, Spur 5: DNA mit 6  $\mu$ M Rex + 5 mM NADH, Spur 6: DNA mit 6  $\mu$ M Rex + 25 mM NAD<sup>+</sup>.

### 3.3 Erzeugung einer Rex-Insertionsmutante

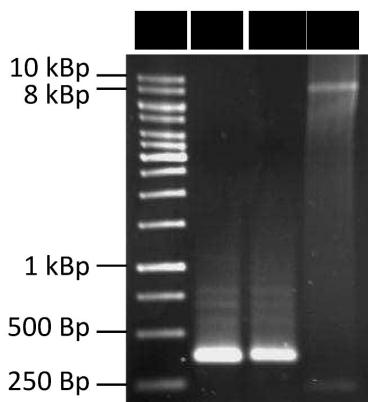
Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Erzeugung einer Rex-Insertionsmutante von *C. acetobutylicum*. Dazu wurde vom ClosTron® System Gebrauch gemacht, welches mittels eines Gruppe II Introns (ClosTron) eine gerichtete Mutagenese vermittelt (Heap *et al.*, 2007; 2010). Diese Methode ist für ein breites Spektrum an Prokaryoten anwendbar, zu denen auch *C. acetobutylicum* gehört (Heap *et al.*, 2007; Karberg *et al.*, 2001; Michel und Ferat, 1995). Während dieser Arbeit wurde das Vektorsystem pMTL007C-E2 verwendet (Heap *et al.*, 2010) (Abb. A.1, Anhang). Der Vektor pMTL007C-E2 ist eine Weiterentwicklung des zuvor beschriebenen Vektors pMTL007 (Heap *et al.*, 2007). Der Austausch des *fac*-Promotors gegen einen *fdx*-Promotor aus *Clostridium sporogenes* stellt eine Besonderheit des pMTL007C-E2 dar. In pMTL007C-E2

erfolgt die Expression des ClosTrons nun konstitutiv. Weiterhin enthält der Vektor ein 250-Bp-*lacZα*-Fragment. Zur Inaktivierung eines Zielgens wird das *lacZα*-Fragment durch eine genspezifisch angepasste 350-Bp-Intronsequenz im pMTL007C-E2 ersetzt, die die Erkennung und die Insertion des ClosTrons in das jeweilige Gen vermittelt. Dies ermöglicht außerdem ein Blau-Weiß-Screening auf Klone, die das gewünschte rekombinante Plasmid enthalten.

### 3.3.1 Erzeugung genspezifischer pMTL007C-E2 Klone

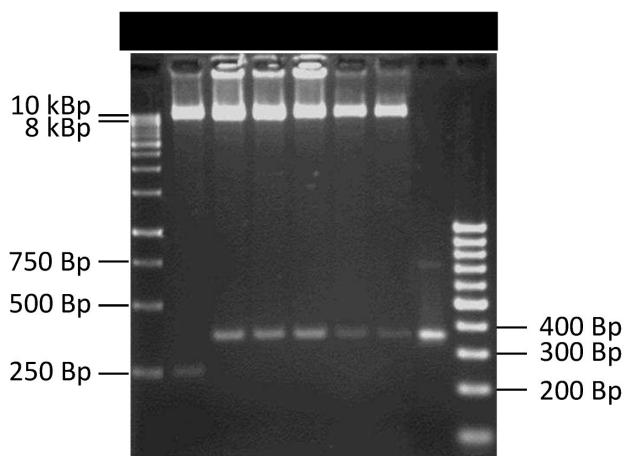
Zunächst musste die Erkennungssequenz des Introns von pMTL007C-E2 an das Zielgen *CAC2713* angepasst werden. Dazu wurde ein 350-Bp-Fragment des Vektors pMTL007 mittels SOE (‘Splicing by overlap extension’)-PCR (2.8.2.3) spezifisch modifiziert (Ho *et al.*, 1989). Die Entwicklung genspezifischer Primer, welche für die Anpassung des Introns an das *CAC2713* von Nöten waren, erfolgte über einen Computeralgorithmus ([www.sigma-genosys.com/targetron](http://www.sigma-genosys.com/targetron) bzw. [www.clostron.com/clostron2.php](http://www.clostron.com/clostron2.php)). Die Kriterien zur Auswahl der Oligonukleotide bei mehreren Insertionsmöglichkeiten in ein Zielgen sind unter 2.11.1 erläutert.

Für die Reaktion wurden gezielt angepasste Oligonukleotide (IBS1\_rex, EBS1d\_rex, EBS2\_rex) und ein universelles Oligonukleotid (EBS\_Universal) verwendet (Tab. A.2, Anhang). Gleichzeitig konnten so Restriktionsschnittstellen von *Hind*III und *Bsp*1407I (Isochizomer von *Bsr*GI) eingefügt werden. Die drei modifizierten Primer und der EBS Universal Primer wurden zunächst in einem Vier-Primer-Mix vereinigt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt (2.8.2.3). Der Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm entsprachen denen unter 2.8.2.1 beschrieben, dabei wurde das Temperaturprofil auf die Länge des zu amplifizierenden Intronfragments abgestimmt. Als Matrize für die SOE-PCR diente die Plasmid-DNA von pMTL007-*glgA* (Tab. A.1, Anhang). Zur Überprüfung wurden die Reaktionsansätze im Agarosegel aufgetrennt (2.7.3.1) und es konnten die drei zu erwartenden PCR-Fragmente mit den Größen 100 Bp, 250 Bp und 350 Bp amplifiziert werden (Abb. A.2, Anhang). Da nur das 350-Bp-Fragment die gesamte Sequenz des Introns umfasst, schloss sich direkt eine Gelelution (2.7.2.5) der Amplifikate an. Anschließend folgte eine Restriktion (2.8.3.1) des Geleluats mit *Hind*III und *Bsp*1407I. Es wurden etwa 200 bis 600 ng des gelextrahierten PCR-Produkts hydrolysiert (Abb. 3.8) und nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme direkt für die Ligation (2.8.3.3) in den Vektor pMTL007C-E2 eingesetzt. Der Vektor pMTL007C-E2 wurde vorher ebenfalls einer Restriktion (2.8.3.1) mit *Hind*III und *Bsp*1407I unterzogen, wodurch das ursprüngliche Intron (*lacZα*-Intron [250 Bp]) entfernt wurde und der Vektor dann linearisiert vorlag (Abb. 3.8, 3.9).



**Abb. 3.8:** **rex-Intronfragmente nach spezifischer Hydrolyse.** Dargestellt ist ein 0,8 %iges [w/v] Agarosegel. Es sind die mit *Hind*III und *Bsp*1407I verdauten *rex*-Intronfragmente sowie der ebenso restriktierte Vektor pMTL007C-E2 gezeigt. Spur 1: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2 und 3: *rex*-Intron, Spur 4: pMTL007C-E2.

Der vorbereitete Vektor wurde mit den verdauten Intronfragmenten von *rex* versetzt und mittels T4-DNA-Ligase ligiert (2.8.3.3). Im Anschluss erfolgte eine  $\text{CaCl}_2$ -vermittelte Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen (2.9.1.1). Die Selektion auf Kolonien erfolgreich transformierter *E. coli*-Zellen erfolgte anhand der Vektor-vermittelten Chloramphenicolresistenz sowie mittels Blau-Weiß-Screening, denn durch den Austausch des *lacZ* $\alpha$ -Introns im pMTL007C-E2 kann die  $\beta$ -Galaktosidase nicht gebildet und X-Gal nicht mehr umgesetzt werden. Daraus resultieren weiße Kolonien, deren Plasmid-DNA isoliert und mittels Kontrollrestriktion überprüft wurde (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9:** **Restriktionsanalyse von pMTL007-rex-Klonen.** Die Plasmid-DNA von pMTL007-rex-Klonen sowie eines Referenzplasmids wurden mit *Hind*III und *Bsp*1407I spezifisch hydrolysiert und anschließend in einem 1,5 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2: Referenzplasmid pMTL007C-E2, Spur 3 bis 7: doppelt restriktiertes pMTL007-rex Plasmid, Spur 8: Referenzfragment *rex*-Intron (350 Bp), Spur 9: Größenstandard (100-Bp-Marker).

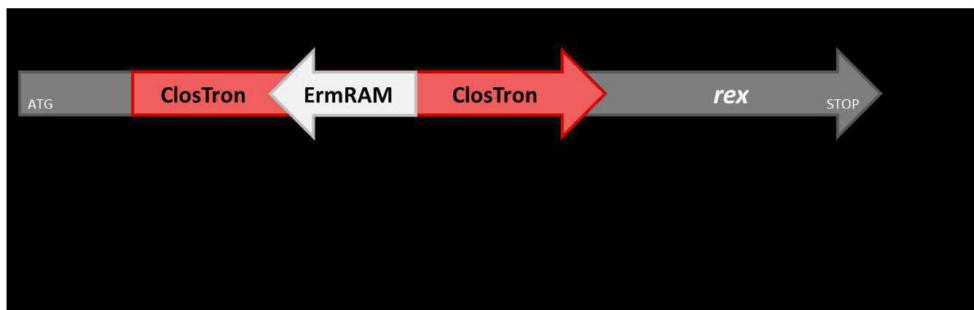
Die Abbildung 3.9 zeigt charakteristische Banden für das gewünschte rekombinante Plasmid nach Restriktion mit *Hind*III und *Bsp*1407I. Positive Klone (Spuren 3 bis 7) wiesen zwei Banden mit den Größen 8,6 kBp (linearer pMTL007C-E2) und 350 Bp (*rex*-spezifisches Fragment) auf. Zur weiteren Bestätigung wurden die rekombinanten Plasmide unter Verwendung der IBS1\_rex- und EBS1d\_rex-Primer (Tab. A.2, Anhang) einer Sequenzanalyse unterzogen (LGC Genomics, Berlin). Die Sequenzierung ergab, dass keine Punktmutationen vorlagen und die Modifikationen korrekt waren. Das entstandene Konstrukt pMTL007-rex wurde nach *in vivo*-Methylierung mittels Elektroporation (2.11.2) in *C. acetobutylicum* ATCC 824 transformiert. Hier sollte die Insertion des ClosTron in das *rex*-Gen erfolgen. Da die Insertion mit der Aktivierung des im Intron enthaltenen ErmRAM-Resistenzmarkers einhergeht, konnte anhand der Erythromycinresistenz auf Klone mit der gewünschten Insertion selektiert werden.

### 3.3.2 Nachweis der Insertion

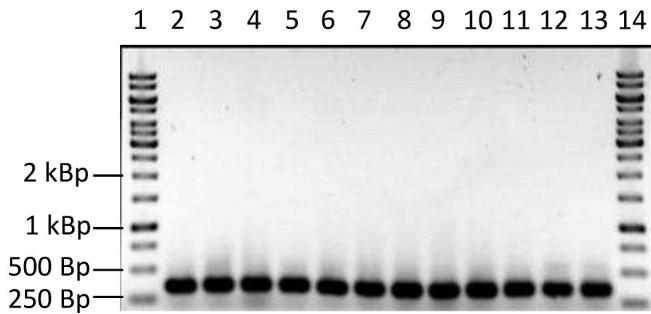
#### 3.3.2.1 PCR-Screening

Mit Hilfe von PCR-Analysen sollten in Erythromycin resistenten Klonen die korrekte Insertion des ClosTrons in das Zielgen bestätigt werden. Wie unter 2.11.3.1 beschrieben wurde zunächst eine Gen-Intron PCR durchgeführt. Da die Insertion in den ‚Sense‘-Strang des Gens erfolgte, wurden für diese Polymerase-Kettenreaktion der genspezifische Primer Rex\_BamHI\_fw und der ClosTron spezifische EBS\_Universal-Primer, welcher ausschließlich im Gruppe II Intron bindet, verwendet (Tab. A.2, Anhang). Weiterhin wurde die gesamte Genregion amplifiziert, um die Vergrößerung des Leserahmens durch die Insertion des ClosTrons (1,9 kBp) im Vergleich zum Wildtyp-Gen nachzuweisen (2.11.3.1). Für diese Gen-Gen PCR wurden genspezifische Oligonukleotide (Rex\_BamHI\_fw, Rex\_Cfr9I\_rev; Tab. A.2, Anhang) genutzt. Die Nachweismöglichkeiten zur Insertion des ClosTrons mittels PCR-Screening sind in Abb. 3.10 (a) schematisch veranschaulicht. Die Insertion erfolgte theoretisch nach dem 95. Bp ab dem Startcodon von *rex* (CAC2713). Aufgrund der Basenpaare bis zum EBS\_Universal-Primer (254 Bp) sollten während der Gen-Intron PCR DNA-Fragmente von 349 Bp synthetisiert werden. Dazu wurden wahllos 12 Erythromycin resistente Klone gepickt, deren chromosomale DNA isoliert (2.8.2.1) und diese als Matrize für die Amplifikation genutzt. Die Fragmentsynthese wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.7.3.1) überprüft und ist beispielhaft in Abbildung 3.10 (b) dargestellt. Für alle untersuchten Klone konnte ein Amplifikat von ca. 350 Bp synthetisiert werden (Abb. 3.10 b, Spur 2 bis 13).

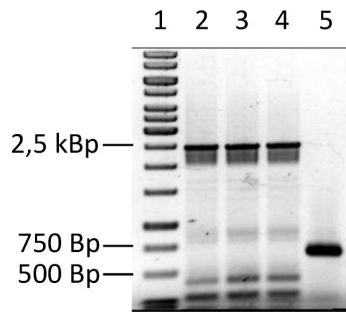
(a)



(b)



(c)



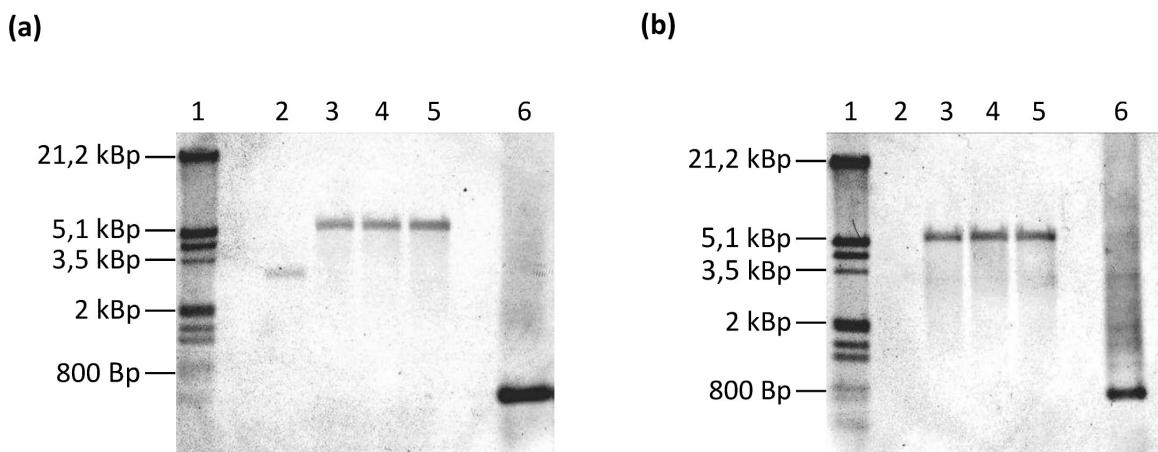
**Abb. 3.10:** Identifikation der ClosTron-Insertion in *rex* (*CAC2713*) mittels PCR-Analyse. (a) Es ist ein Schema zum Nachweis der genspezifischen Insertion des ClosTrons (Gruppe II Intron) dargestellt. Die dicken Pfeile symbolisieren das ClosTron (rot) im Zielgen (grau) und die kleinen Pfeile (schwarz) repräsentieren die relativen Positionen der verwendeten Oligonukleotide. Die DNA-Fragmente der Gen-Intron PCR (b) und Gen-Gen PCR (c) wurden in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. (b) Spur 1 und 14: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2 bis 13: Erythromycin resistente Klone (349 Bp). (c) Spur 1: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2 bis 4: positive Klone 5, 8 und 12 (2,5 kBp), Spur 5: *rex* WT-Gen (648 Bp).

Nachfolgend wurden nur die putativen Defektmutanten 5, 8 und 12 (Abb. 3.10 b) weiter untersucht. Dazu wurde die chromosomal DNA der ausgewählten Defektmutanten, wie unter 2.6.3 geschildert, isoliert und ebenfalls als Matrize in der Gen-Gen PCR (2.11.3.1) eingesetzt. Der Erfolg einer solchen PCR ist exemplarisch in der Abbildung 3.10 (c) dargestellt. Der offene Leserahmen von *rex* ist etwa 650 Bp groß und umfasst nach der Insertion etwa 2,5 kBp. Ein positives Signal der vergrößerten Genregion im Vergleich zum Wildtyp-Gen (Spur 5) ist in den Spuren 2 bis 4 zu erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor kalkulierte Sequenzgröße nach der ClosTron-Insertion. Die positiven Klone werden folgend als *C. acetobutylicum rex::int(95)* bezeichnet.

### 3.3.2.2 Southern Hybridisierung

Die Southern Hybridisierung ermöglicht den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch. Hier sollte die Methode zur Verifikation der korrekten Insertion des Gruppe II Introns in das *rex*-Gen dienen. Dazu wurde zunächst eine genspezifische DNA-Sonde gegen den

ORF CAC2713 (*rex*) und zudem eine DNA-Sonde gegen die ErmRAM-Resistenzkassette hergestellt. Dies erfolgte mittels PCR und chemischer Markierung der Sonden mit Digoxigen (2.10.1). Anschließend wurde die chromosomal DNA von *C. acetobutylicum* ATCC 824 sowie die mittels PCR-bestätigten *C. acetobutylicum rex::int(95)*-Stämme einer spezifischen Hydrolyse mit *Hind*III und *Eco*RI unterzogen (2.8.3.2). Dann wurden die Reaktionsansätze in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (2.10.2). Die Detektion der Signale wurde, wie unter 2.10.2.2 beschrieben, durchgeführt. Unter Verwendung der genspezifischen *rex*-Sonde sollte für die hydrolysierte DNA der Rex-Defektmutanten ein Signal von etwa 5 kBp detektierbar sein, wohingegen der Wildtyp eine Signalgröße von ca. 3,1 kBp aufweisen sollte. Wie in Abb. 3.11 (a) dargestellt, konnte die Fragmentgröße von 3,1 kBp beim Wildtyp und ein um das Intron vergrößertes Signal von ca. 5 kBp der ausgewählten Rex-Insertionsmutanten detektiert werden. Mit Hilfe der ErmRAM-spezifischen Sonde sollte zudem die Existenz einer weiteren unspezifischen Insertion im Genom von *C. acetobutylicum rex::int(95)* ausgeschlossen werden. Eine derartige Southern Hybridisierung zeigt die Abbildung 3.11 (b).



**Abb. 3.11:** **Verifikation der Insertion in *C. acetobutylicum rex::int(95)* mittels Southern Hybridisierung.** Es wurden ca. 500 ng genomiche DNA der Insertionsmutanten und des Wildtyps als Kontrolle mit *Hind*III und *Eco*RI verdaut. Nach einer Agarosegelektrophorese erfolgte die Übertragung auf eine Nylonmembran und die Signale wurden mittels NBT/BCIP detektiert. (a) Genspezifische Sonde; Spur 1: Größenstandard (Molecular weight marker III), Spur 2: WT, Spur 3 bis 5: Insertionsmutanten 5, 8 und 12, Spur 6: Positiv-Kontrolle. (b) ErmRAM-spezifische Sonde; Spur 1 bis 6: siehe (a).

Im Gegensatz zum Wildtyp konnte nur für die *rex*-negativen Mutanten ein DNA-Fragment von etwa 5,1 kBp identifiziert werden, welches der erwarteten Größe entsprach (Spur 3 bis 5). Die ebenfalls untersuchte chromosomal DNA von *C. acetobutylicum* ATCC 824 diente hier als Negativkontrolle, da der selektive Marker (ErmRAM) natürlicherweise nicht in diesem Prokaryoten vorkommt. So konnte mittels Southern Hybridisierungen die Insertionsmutation in

den *rex*-negativen Stämmen verifiziert werden. Nachfolgend sollte nun die Physiologie von *C. acetobutylicum rex::int(95)* charakterisiert werden.

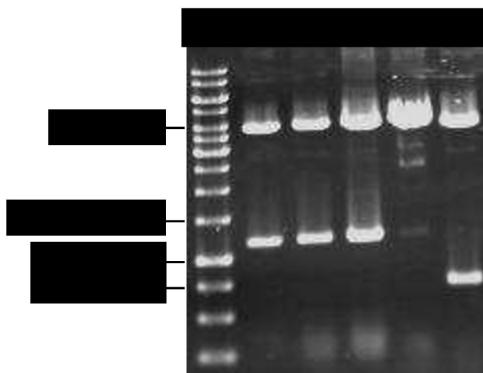
### **3.4. Plasmid basierte Komplementation von *C. acetobutylicum rex::int(95)***

Zur Untermauerung, dass ein hervorgerufener Phänotyp einzig auf ein Mutationsereignis zurück zu führen ist, wurde eine Plasmid gestützte Komplementation durchgeführt. Dabei wird das mutmaßlich inaktivierte Protein rekombinant in den Mutationsstamm eingebracht. Diese Art der Komplementation sollte auch während dieser Arbeit angewendet werden, um auszuschließen, dass eventuell polare Effekte auf dem Chromosom oder Punktmutationen (Brüggemann und Gottschalk, 2009), die möglicherweise durch die ClosTron Mutagenese auftreten, den Phänotyp im *rex*-negativen Stamm hervorrufen. Eine weitere Besonderheit dieser Plasmid basierten Komplementation in *C. acetobutylicum rex::int(95)* ist neben der Rückführung der für Rex kodierenden Gensequenz (*CAC2713*) auch die Vermittlung einer nativen Promotorregion des *rex*-Gens. Die native Expression von Rex in der Insertionsmutante soll dazu führen, dass wieder wildtyp-ähnliche Zustände, insbesondere der Produktsynthese, erreicht werden. Hierfür wurde das pCons::upp Vektorsystem genutzt (Soucaille *et al.*, 2006). Der pCons::upp Vektor stellte sich als geeignet heraus, da dieser weder einen induzierbaren noch einen konstitutiven Promotor besitzt und so die native Promotorregion verwendet werden kann. Außerdem beinhaltet dieser Vektor sowohl einen Replikationsursprung für Gram-negative (*ori*) als auch für Gram-positive Bakterien (*repL*) (Abb. A.3, Anhang). Die Selektion positiver Klone erfolgte mittels Chloramphenicolresistenz.

#### **3.4.1 Klonierung von *rex* in den pCons::upp-Vektor**

Zunächst wurden mit Hilfe der Primer *Rex\_com\_fw* und *Rex\_com\_rev* (Tab. A.2, Anhang) PCR-Fragmente von *CAC2713* (650 Bp), welche neben der kodierenden Sequenz zusätzlich 450 Bp der 5'-UTR enthielten, amplifiziert (2.8.2.1). Demnach sollte das Amplifikat eine Sequenzgröße von etwa 1,1 kBp aufweisen. Gleichzeitig wurden so passende *BamHI*-Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende des DNA-Fragments erzeugt. Als Matrize diente chromosomal DNA von *C. acetobutylicum* ATCC 824. Nach der erfolgreichen Polymerase-Kettenreaktion wurde der gesamte Reaktionsansatz elektrophoretisch aufgetrennt (2.7.3.1), geleluert und aufgereinigt (2.7.2.5). Zur Ligation wurde das behandelte *rex*-Komplementationsfragment (Abb. A.4, Anhang) sowie der pCons::upp spezifisch mit dem ‚FastDigest‘ *BamHI*-Restriktionsenzym gespalten. Um

eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurde diesem Reaktionsansatz eine ‚FastAP‘ alkalische Phosphatase (2.14) zugegeben. Abschließend wurden die Ansätze, wie unter 2.7.2.5 erläutert (wobei auf den Schritt der Gelextraktion verzichtet wurde), gereinigt. Im Anschluss an die Ligation erfolgte eine Transformation in  $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen (2.9.1.1). Nach einer Selektion auf Chloramphenicol resistente Kolonien erfolgte als Kontrolle eine Restriktion der Plasmid-DNA der Klone mit *Bam*HI. Rekombinante Plasmide ergaben nach der spezifischen Hydrolyse zwei distinkte Banden (Abb. 3.12, Spur 2 bis 5), eine dem linearisierten pCons::upp entsprechende Größe von etwa 4 kBp und eine zweite Bande mit einer Größe von etwa 1,1 kBp, welche das rex-Komplementationsfragment darstellt.



**Abb. 3.12:** **Restriktionsanalyse von pCons::upp-rex-Klonen.** Die Plasmid-DNA von pCons-rex-Klonen sowie ein Referenzplasmid wurden mit *Bam*HI verdaut und anschließend in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2 bis 5: restriktiertes pCons-rex Plasmid, Spur 6: Referenzplasmid pCons-perR.

Zur weiteren Überprüfung der korrekten Klonierung in den pCons::upp Vektor wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt (LGC Genomics, Berlin). Abschließend wurden die Komplementationskonstrukte (pCons::upp-rex) nach *in vivo*-Methylierung (2.11.2) in *C. acetobutylicum rex::int(95)* transformiert (2.9.2.1). Hier erfolgte die Selektion auf Festmedium mit Erythromycin und Thiamphenicol (säurestabiles Chloramphenicolderivat, anwendbar in *C. acetobutylicum*). Zur Überprüfung der Existenz von pCons::upp\_rex im generierten Komplementationsstamm *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Für diese Reaktion wurden Vektor abgeleitete Primer verwendet (pCons\_seq\_fw, pCons\_seq\_rev; Tab. A.2, Anhang), so dass nur ein PCR-Produkt in den komplementierten Stämmen synthetisiert werden sollte. Die Abbildung A.5 (Anhang) zeigt 8 untersuchte Klone, welche die erwartete Fragmentgröße (4 kBp) im Gegensatz zu *rex::int(95)* aufwiesen. So wird neben der erzeugten Mutante *C. acetobutylicum rex::int(95)* auch *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* als Kontrolle in die wachstumsphysiologische Charakterisierung einbezogen.

### 3.5 Charakterisierung von *C. acetobutylicum rex::int(95)*

Ein Schwerpunkt der Arbeit war es, die, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, erzeugte Defektmutante *C. acetobutylicum rex::int(95)* physiologisch zu untersuchen, um so weitere Rückschlüsse auf die Funktion von Rex im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ATCC 824 ziehen zu können. Hierzu wurden zunächst das Wachstum und die Produktbildung von Wildtyp, Rex-Insertionsmutante und Komplementante in Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle unter statischen Kulturbedingungen untersucht. Des Weiteren erfolgte die Charakterisierung der *rex*-negativen Mutante auf Transkriptions- und Translationsebene.

#### 3.5.1 Glukose-Fermentation in statischen Kulturen

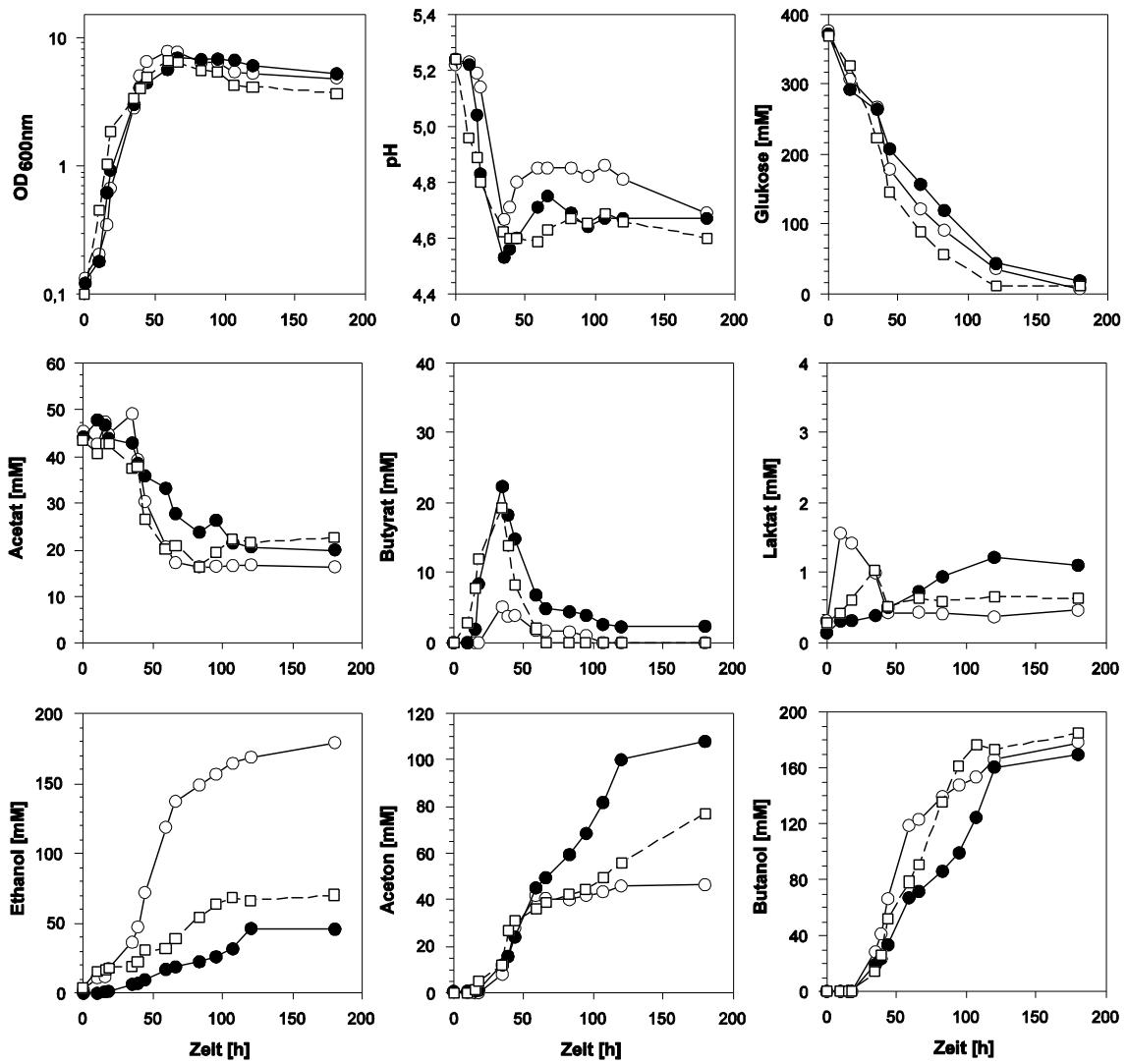
Die Abbildung 3.13 zeigt die wachstumsphysiologische Charakterisierung der Defektmutante *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum Wildtyp *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Komplementante *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl*. Die Wachstumsuntersuchungen erfolgten in anaeroben „Batch“-Kulturen in Müller&Krempel-Serumflaschen bei 37 °C, wobei die Kulturführung ohne zusätzliche Stickstoffbegasung und Rührung erfolgte. Die 200-ml-MS-MES-Hauptkulturen wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, inkuliert und in regelmäßigen Intervallen die physiologischen Parameter überwacht (2.5). Es wurden immer mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Zur Veranschaulichung ist je ein repräsentativer Datensatz von WT, Mutante und Komplementante über einen Zeitraum von 180 Stunden dargestellt (Abb. 3.13).

Hinsichtlich der Wachstumsraten ( $\mu$ ) zeigte der *rex*-negative Stamm mit  $0,23 \text{ h}^{-1}$  keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem WT mit  $0,25 \text{ h}^{-1}$ . Nach etwa 40 h gingen die Kulturen von der exponentiellen Wachstumsphase in die Transitionssphase und anschließend in die stationäre Phase über (nach ca. 60 h). Die maximale optische Dichte ( $OD_{600\text{nm}}$ ) von *rex::int(95)* lag hier bei 7,6, wobei die  $OD_{600\text{nm}}$  vom Wildtyp auf 6,9 anstieg. Abschließend fiel die optische Dichte beider Stämme in der stationären Phase leicht ab. Die Rex-Insertionsmutante erreichte nach 180 h einen Wert von 4,8 und der WT einen Wert von 5,2. Zudem wurde der Glukoseverbrauch in den Kulturen bestimmt (2.5.7). Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Konsum der verwendeten Kohlenstoffquelle von *C. acetobutylicum rex::int(95)* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Abb. 3.13 a). Leichte Unterschiede zeigten sich hingegen im pH-Verlauf der Kulturen von Wildtyp und Rex-Insertionsmutante. Der pH-Wert im Kulturüberstand der Mutante lag jedoch stets höher als der der Wildtypkultur (Abb. 3.13 a, Tab. 3.3). In den Kulturen beider Stämme nimmt während der exponentiellen Wachstumsphase der pH-Wert (Ausgangs-pH 5,30) aufgrund der Säureproduktion ab. Nach 40 h sank der pH der *rex*-negativen

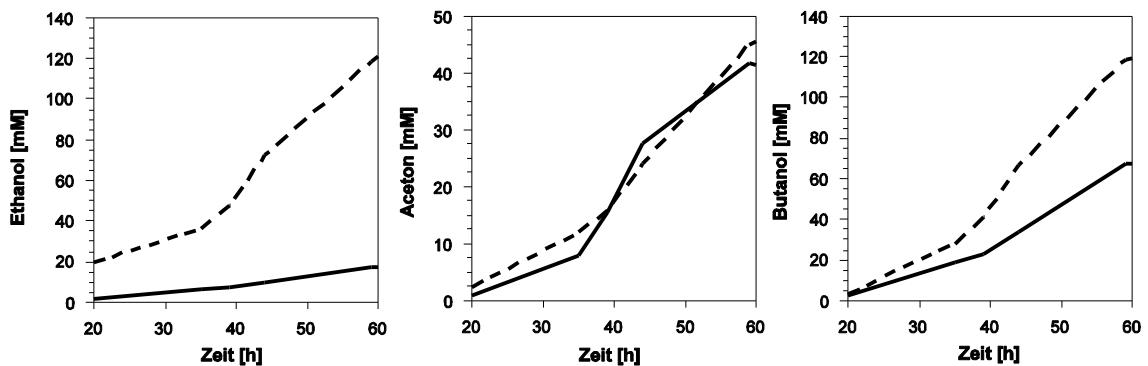
Mutante jedoch nur auf einen Wert von ca. 4,7, wobei der pH-Wert in der Wildtypkultur zum gleichen Zeitpunkt ein Minimum von etwa 4,6 erreichte. Anschließend kam es mit Eintritt in die stationäre Phase zu einem leichten pH-Anstieg in den Kulturen (WT: pH-Wert etwa 4,8 und *rex::int(95)*: pH-Wert etwa 4,9). Am Ende der ‚Batch‘-Fermentation wurde sowohl für den Wildtyp als auch die Mutante eine pH-Wert von 4,7 bestimmt. Die Erklärung hierfür lieferten Analysen der Produktspektren des *rex*-negativen Stamms und des Parentalstamms.

Die Konzentrationen der Gärungsprodukte Acetat, Butyrat, Ethanol, Butanol sowie Aceton wurden gaschromatographisch (2.5.5) ermittelt. Die Produktspektren der Wildtyp- und Mutantenkultur sind exemplarisch in der Abbildung 3.13 (a) dargestellt. Während des exponentiellen Wachstums bildete der WT überwiegend die organischen Säuren Acetat und Butyrat. Die Inaktivierung von Rex führte jedoch zu einer verringerten Butyratsynthese (5,2 mM im Vergleich zu ~ 22 mM beim WT), so dass nur 26 % der Butyratkonzentration der Wildtypkulturen erreicht wurde. Die Reassimilation von Acetat des *rex*-negativen Stamms hingegen wies, abgesehen von einem leichten Anstieg der enthaltenen 40 mM auf etwa 47 mM, keine Unterschiede zum Parentalstamm auf. Aufgrund der mittels EMSA nachgewiesenen Bindung von Rex an den Promotor des *ldh*-Gens wurde zudem die Laktatkonzentrationen im Kulturüberstand von WT und Rex-Defektmutante gemessen (2.5.8). Eine erhöhte Laktatkonzentration konnte nicht beobachtet werden ( $\geq 1,5$  mM), lediglich der Verlauf der Laktatbildung war in *rex::int(95)* verändert. Während der Wildtyp kontinuierlich Laktat bildete, erreichte die Laktatproduktion der *rex*-negativen Mutante in der exponentiellen Phase ein Maximum von etwa 1,5 mM. Anschließend sank die Laktatkonzentration bis zum Ende des Wachstumsexperiments wieder ab. Außerdem wies der Kulturüberstand von *rex::int(95)* im Gegensatz zum Wildtyp (1,3 mM) bereits nach 20 h eine Konzentration von ~ 18 mM Ethanol auf (Abb. 3.13 b). Durch die Säureproduktion im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* und dem daraus resultierenden Abfall des externen pH-Wertes kommt es zur Induktion der Lösungsmittelsynthese. *C. acetobutylicum rex::int(95)* zeigte nach 180 h eine signifikant erhöhte Ethanolproduktion (175 mM im Vergleich zu 45 mM beim Wildtyp), dagegen aber eine um 50 % verringerte Acetonkonzentration (~ 40 mM) im Vergleich zur Wildtypkultur (Abb. 3.13 a). Es wird zudem deutlich, dass die Acetonproduktion von *rex::int(95)* simultan zum Parentalstamm beginnt und mit dem Ende der Acetatabnahme (nach ca. 60 h) stagniert, während der Wildtyp die Produktion von Aceton fortsetzt (Abb. 3.13 a). Zudem setzt die Butanolproduktion im *rex::int(95)* Stamm früher ein als beim WT (Abb. 3.13 b). Unter den gewählten Bedingungen konnte nach 60 h eine um 40 % erhöhte Butanolproduktion im *rex*-negativen Stamm (Abb. 3.13 b; Abb. A.6, Anhang) detektiert werden, obgleich die Endkonzentrationen an Butanol beider Stämme nach 180 h etwa 175 mM betragen (Abb. 3.13 a; A.6, Anhang).

(a)



(b)



**Abb. 3.13:** Wachstum und Stoffwechselendprodukte der Stämme *C. acetobutylicum rex::int(95)* und *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824. Dargestellt ist ein repräsentativer Datensatz der untersuchten Bakterienstämme. (a) Die statische Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES mit Glukose als C-Quelle (333 mM) bei 37 °C. In regelmäßigen Abständen wurden die optische Dichte und der pH-Wert gemessen. Glukose und Laktat wurden enzymatisch bestimmt und die Erfassung der Produktkonzentrationen erfolgte gaschromatographisch. *C. acetobutylicum* ATCC 824 (●), *C. acetobutylicum rex::int(95)* (○), *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* (□). (b) Lösungsmittelproduktion von Wildtyp und Mutante innerhalb eines Zeitraums von 20 h bis 60 h der Fermentation. *C. acetobutylicum* ATCC 824 (—), *C. acetobutylicum* rex::int(95) (---).

Zur Übersicht sind die wichtigsten physiologischen Parameter und durchschnittlichen Produktkonzentrationen der unabhängig durchgeführten Wachstumsexperimente von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)* in der Tabelle 3.3 zusammengefasst. Anhand der gemessenen Konzentrationen der Stoffwechselprodukte zeigte sich eine Verschiebung des Alkohol:Aceton-(BE:A)-Verhältnis von 2,3:1 des Wildtyps zu 8,2:1 der Rex-Defektmutante.

**Tab. 3.3:** Übersicht der Glukose-Fermentation unter statischen Kulturbedingungen von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824. Dargestellt sind die wichtigsten Parameter und die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen der drei unabhängig durchgeführten Wachstumsversuche nach 60 h und 180 h Wachstum.

Parameter	60 h		180 h			
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>	$\alpha^{1)}$	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>	$\alpha^{1)}$
Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]	0,25	0,23		n.d.	n.d.	
Glukose [g/l] (Konsum)	32	41		63	65	
OD <sub>600nm</sub>	6,9	7,7		4,6	5,0	
pH-Wert	4,65	4,85		4,67	4,72	
Butyrat [g/l]	0,9	0,1 ← *		0,1	0,1	
Acetat [g/l]	2,0	1,7		2,3	1,5	
Laktat [g/l]	0,06	0,04		0,10	0,05	
Ethanol [g/l]	0,8	5,98 ← ***		2,09	7,7 ← ***	
Aceton [g/l]	2,8	2,2		6,5	2,5 ← ***	
Butanol [g/l]	5,0	9,2 ← ***		12,6	12,7	
BE:A-Ratio (Butanol,Ethanol:Aceton)	2,0:1	6,9:1		2,3:1	8,2:1	
ABE-Ratio (Aceton:Butanol:Ethanol)	4:7:1	1:4:3		3:6:1	1:6:3	
NrF <sup>2)</sup> (NADH reduziert durch Fd)	-0,33	0,11		-0,22	0,06	
Kohlenstoffbilanz	85	97		89	86	
Redoxbilanz	99	100		100	100	

1) Das Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wird durch den p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) dargestellt, welcher mittels t-Test berechnet wurde. Die Stärke der Signifikanz wird durch die Sterne wie folgt repräsentiert:

\* 0,01 < p ≤ 0,05 knapp signifikant,

\*\* 0,001 < p ≤ 0,01 signifikant,

\*\*\* p ≤ 0,001 hoch signifikant.

2) Der NrF-Gehalt [mM/h/OD<sub>600nm</sub>] wurde nach Girbal und Souaille (1994) berechnet und gibt die Differenz zwischen konsumierten NADH und produzierten NADH an.

Zudem wurde der Gehalt an „NADH reduziert durch Ferredoxin“ (Nrf-Gehalt) errechnet (Tab. 3.3). Der Nrf-Gehalt gibt die Differenz zwischen dem konsumierten NADH und dem während der Glykolyse produzierten NADH an ( $\text{NrF} = \text{NADH}_{\text{kons}} - \text{NADH}_{\text{prod}}$ ), wobei dieser aus den spezifischen Produktraten ( $\text{mM/H/OD}_{600\text{nm}}$ ) errechnet werden kann (Girbal und Soucaille, 1994). Für den Parentalstamm konnte sowohl nach 60 h als auch nach 180 h Wachstum in MS-MES-Medium (2.3.1) ein negativer Wert ermittelt werden. Zu gleichen Zeitpunkten wurde für die Rex-Defektmutante ein positiver Wert berechnet (Tab. 3.3). Das bedeutet, dass die Mutante während der Glukose-Fermentation in statischen Kulturen mehr NADH konsumierte denn in der Glykolyse generiert, wobei im Wildtyp unter den gleichen Wachstumsbedingungen das Gegenteil der Fall war. Die vorrangige Alkoholproduktion und verminderte Acetonbildung von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum Wildtyp konnte auch in MS-MES-Medium ohne Acetatzusatz unter „Batch“-Kulturbedingungen nachgewiesen werden (Abb. A.7, Anhang).

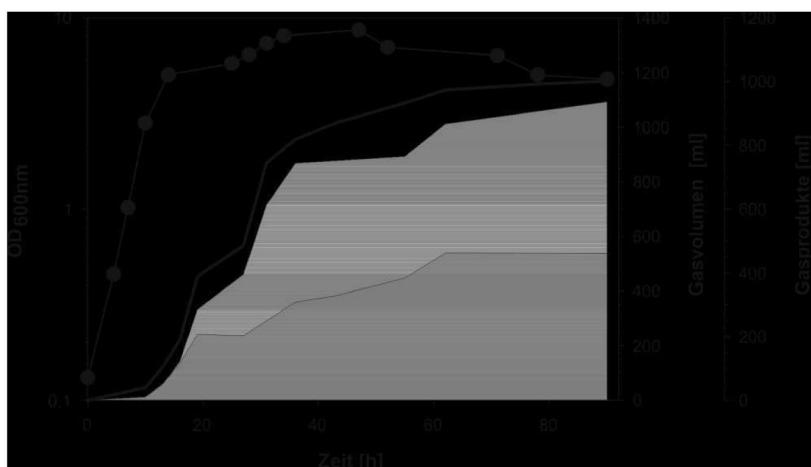
Analog zur bereits erläuterten physiologischen Charakterisierung von Wildtyp und Rex-Insertionsmutante erfolgte die Wachstumsuntersuchung der Komplementante *rex::int(95)\_compl* (Abb. 3.13 a). Ebenso wie die *rex*-negative Mutante zeigte dieser Stamm keinen Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp. Gleichermaßen konnte für den Glukoseverbrauch beobachtet werden. Bei Betrachtung des pH-Verlaufs von *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* wurde deutlich, dass dieser wieder mehr absank (pH-Wert  $\sim 4,6$ ).

Gegensätzlich zur reduzierten Butyratproduktion in der Säurephase der *rex::int(95)*-Kultur konnte für *rex::int(95)\_compl* ein Wildtyp-Wert von ca. 19 mM detektiert werden (Abb. 3.13 a). Die Reassimilation von Acetat hingegen zeigte auch in der Komplementante keinen Unterschied zum Parentalstamm und zur Rex-Defektmutante. Mit Erreichen der stationären Wachstumsphase und dem Wechsel zur Solventogenese wies die komplementierte Mutante *rex::int(95)\_compl* eine um ca. 42 % verminderte Ethanolproduktion ( $\sim 70$  mM) und eine um ca. 40 % gesteigerte Acetonsynthese (ca. 77 mM) im Gegensatz zur Rex-Insertionsmutante nach 180 Stunden auf (Abb. 3.13 a). Die anfängliche Konzentration von  $\sim 20$  mM Ethanol des Komplementationsstamms ist hier auf die Zugabe von Thiamphenicol (2.2.3) zurückzuführen. Zudem trat die Butanolbildung, wie für *C. acetobutylicum rex::int(95)* beschrieben, nicht verfrüht ein und es wurde am Ende der „Batch“-Fermentation eine Konzentration von ca. 179 mM im Kulturüberstand von *rex::int(95)\_compl* gemessen (Abb. 3.13 a). Die gaschromatographisch ermittelten Konzentrationen an Säuren und Lösungsmitteln von *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* zeigten eine fast vollständige Wiederherstellung der WT-Werte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der veränderte Phänotyp von *C. acetobutylicum rex::int(95)* einzig auf der Inaktivierung von Rex beruht.

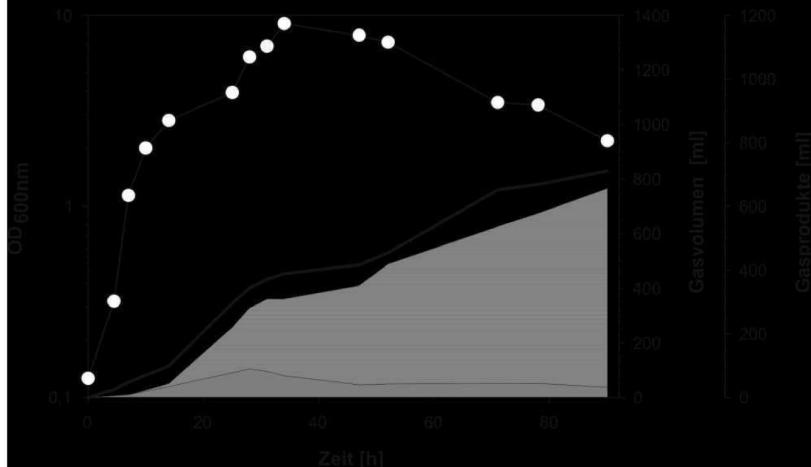
### 3.5.2 Wasserstoff-/Kohlenstoffdioxid-Messung

Das Wachstum von *C. acetobutylicum* ist durch eine intensive Wasserstoffproduktion in der Acidogenese charakterisiert, was die intrazelluläre Redoxbalance aufrechterhält (Jones und Woods, 1986; Girbal *et al.*, 1995). Vor dem Hintergrund, dass durch den Eingriff in den Stoffwechsel nicht nur die Säure- und Lösungsmittelsynthese, sondern auch die Wasserstoff- und Kohlendioxidbildung beeinflusst sein könnte, wurde die Produktion dieser Gase durch Mutante und WT bestimmt. Die Messung des Gasvolumens in statischen 100-ml-MS-MES-Kulturen erfolgte durch Wasserverdrängung in Glaszyllindern und die gebildeten H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Mengen wurde gaschromatographisch bestimmt (2.5.6). Außerdem wurde die optische Dichte und die Konzentration der Stoffwechselendprodukte der Stämme überwacht (2.5). Während der Säurephase wird in *C. acetobutylicum* ATCC 824 ein Überschuss an Elektronen über die Bildung von Wasserstoff (~ 262 ml) recycelt und es besteht ein Verhältnis von etwa 1:1 von H<sub>2</sub> zum ebenfalls produzierten CO<sub>2</sub> (~ 283 ml) (Abb. 3.14 a). Im Gegensatz dazu war in *C. acetobutylicum rex::int(95)* eine drastisch reduzierte Wasserstoffproduktion von etwa 89 ml in der exponentiellen Phase detektierbar, die Kohlenstoffdioxidmenge zu diesem Zeitpunkt betrug jedoch ebenfalls etwa 280 ml. Daraus ergab sich ein H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>-Verhältnis von 1:3 in der Rex-Defektmutante. Mit dem Beginn der stationären Wachstumsphase und der Lösungsmittelbildung geht die Wasserstoffproduktion zurück, wobei die CO<sub>2</sub>-Synthese aufgrund der Acetonbildung ansteigt. Nach etwa 32 h war eine verminderte Kohlenstoffdioxidsynthese in der Kultur der Mutante (308 ml) im Vergleich zur Wildtypkultur (395 ml) detektierbar. In Übereinstimmung mit der vermehrten Bildung der Alkohole sowie einer verringerten Acetonsynthese ließ sich eine um 25 % verminderte Gesamtgasproduktion in der Rex-Insertionsmutante bestimmen (Abb. 3.14 b). Der Wildtyp synthetisierte ein Volumen von ca. 1120 ml Gesamtgas nach 90 h, wohingegen in der Rex-Defektmutante nur ein Gasvolumen von etwa 800 ml nach 90 h messbar war (Abb. 3.14). So betrug das Verhältnis von H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> am Ende der Fermentation 1:20, während der Parentalstamm H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in einem charakteristischen Verhältnis von 1:2 produzierte. Auffallend war auch die Wasserstoffabnahme während der stationären Wachstumsphase in *rex::int(95)*. Nach 90 h waren nur noch 30 ml H<sub>2</sub> detektierbar, während der Wildtyp ~ 460 ml an Wasserstoff bildete (Abb. 3.14). Der verbleibende Anteil des Gesamtgasvolumens beider Stämme zu diesem Zeitpunkt machte Kohlenstoffdioxid aus. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass in *C. acetobutylicum rex::int(95)* eine verringerte Gasproduktion zu beobachten war.

(a)



(b)

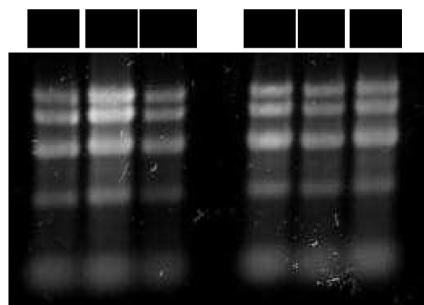


**Abb. 3.14: Wachstumsabhängige Wasserstoff- und Kohlenstoffdioxidsynthese von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* rex::int(95).** Die Kulturführung erfolgte in 100 ml MS-MES-Medium, wobei das Wachstum durch die optische Dichte (600 nm) überwacht wurde. Das Gesamtgasvolumen wurde mittels Wasserverdrängung in Glaszylin dern gemessen und die Gaszusammensetzung wurde gaschromatographisch bestimmt. Es sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. (a) *C. acetobutylicum* ATCC 824 (●), Gasvolumen (—), H<sub>2</sub> (dunkelgraue Fläche), CO<sub>2</sub> (hellgraue Fläche). (b) *C. acetobutylicum* rex::int(95) (○), Gasvolumen (—), H<sub>2</sub> (dunkelgraue Fläche), CO<sub>2</sub> (hellgraue Fläche).

### 3.5.3 Expressionsanalyse von potentiell Rex regulierten Genen

Wie unter 3.1 und 3.2 beschrieben, konnten mittels *in silico*-Analysen und *in vitro* durchgeführten Promotor-Bindungsstudien potentiell Rex regulierte Gene identifiziert werden. Da das Rex-Protein in der Insertionsmutante *rex::int(95)* mittels Gruppe II Intron inaktiviert vorliegt, sollten sich zudem Unterschiede im Expressionsverhalten dieser Gene ergeben. Um dies nachzuweisen, wurde die Transkription der Gene für Crotonase (*crt*), Thiolase (*thl*) und Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 (*adhE2*) von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und

*C. acetobutylicum rex::int(95)* mittels Northern Hybridisierung untersucht. Dazu wurden beide Stämme in MS-MES-Medium kultiviert und Gesamt-RNA aus Zellen der späten exponentiellen Wachstumsphase isoliert (2.6.4). Die Abbildung 3.15 zeigt beispielhaft eine Qualitätsüberprüfung der RNA von Wildtyp und Mutante in einem sterilen Agarosegel.

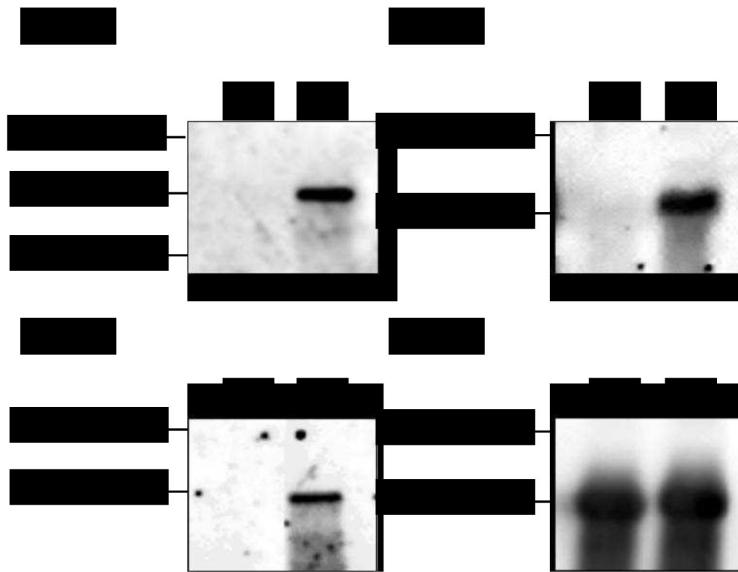


**Abb. 3.15:** Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)*. Nach einer Kultivierung in MS-MES erfolgte die Probennahme in der späten exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600\text{nm}}$  ca. 3,0). Die Qualität der isolierten RNA wurde in einem sterilen 1 %igen [w/v] Agarosegel überprüft. Spur 1 bis 3: Gesamt-RNA *C. acetobutylicum* ATCC 824, Spur 4 bis 6: Gesamt-RNA *C. acetobutylicum rex::int(95)*.

Für Northern Blot-Analysen wurde die RNA nun in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt (2.7.3.2) und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen (2.10.3). Nach der Hybridisierung mit Digoxigenin markierten PCR-Fragmenten für die jeweiligen Gene erfolgte die Detektion der Signale (2.10.3.2). Die verwendeten Oligonukleotide zur Sondenherstellung (2.10.1) sind in der Tabelle A.2 (Anhang) gelistet. Neben den untersuchten Genen wurde die 16SrRNA als Positivkontrolle eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen, zeigten die analysierten Gene *crt*, *thl* und *adhE2* ein erhöhtes Transkriptionslevel in *C. acetobutylicum rex::int(95)*. Für den Wildtyp hingegen war für keines der drei Gene ein Signal detektierbar. Die Gene sowohl der Thiolase als auch der Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 sind jeweils monocistronisch kodiert, was sich in den Signalgrößen von ~ 1,5 kBp (*thl*) und ~ 2,5 kBp (*adhE2*) widerspiegelt (Abb. 3.16 b, c). Die Gene *crt*, *bcd*, *etfA*, *etfB* und *hbd* jedoch formen das Butyryl-CoA-Synthes-(*bcs*)-Operon (Boynton *et al.*, 1996). So zeigte die Northern Hybridisierung der Crotonase ein Signal von etwa 4,7 kBp, was mit der theoretischen Größe des *bcs*-Operons übereinstimmt (Abb. 3.16 a). Da Rex die Genexpression des *bcs*-Operons zu regulieren vermag, untermauert dieses Resultat ebenfalls die Abwesenheit einer Rex-Box vor dem ORF *CAC2708* (*hbd*).

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Rex an der Regulation von Butyrat- bzw. Butanol-Synthesegenen beteiligt ist, da deren Expression im *rex*-negativen Stamm deutlich dereprimiert war.



**Abb. 3.16:** Transkriptionsanalysen von Rex-regulierten Genen in *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)*. Für Northern Hybridisierung von *rex::int(95)* (Spur 2) im Vergleich zum Wildtyp (Spur 1) wurden 10 µg an Gesamt-RNA pro Spur verwendet und mit genspezifischen Sonden hybridisiert. Es wurden die Transkriptlevel der Gene *crt* (a), *thl* (b) und *adhE2* (c) analysiert. Als Positivkontrolle für gleichmäßige Nukleinsäurebeladung diente die Untersuchung der 16SrRNA (d), dazu wurden 1µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und ebenfalls spezifisch hybridisiert.

### 3.5.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Zusätzlich zu den Analysen der Genexpression erfolgte die Bestimmung der Aktivitäten verschiedener Enzyme in *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824. Hierzu wurden zellfreie Lysate (2.13.1) hergestellt und die spezifischen Aktivitäten detektiert (2.13.6). Die gemessenen Enzymaktivitäten sind in der Tabelle 3.4 aufgelistet.

Zunächst sollte geklärt werden, welche der Alkohol-Dehydrogenasen (BdhA, BdhB, AdhE1 und AdhE2) für die erhöhte Alkoholproduktion der Rex-Defektmutante verantwortlich ist. Die Differenzierung zwischen den verschiedenen Enzymen erfolgte über die Verwendung der spezifischen Substrate sowie der Coenzyme NADH bzw. NADPH. Die Bestimmung der Alkohol- und Butanol-Dehydrogenase-Aktivität sowie die Herstellung der dafür vorgesehenen Rohextrakte mussten anaerob erfolgen (Dürre *et al.*, 1987; Hartmanis und Gatenbeck, 1984). Die Ethanol- bzw. Butanol-Dehydrogenase-Aktivitäten mit Acetaldehyd und Butyraldehyd als Substrat und NADPH als Cofaktor waren in Wildtyp und Mutante annähernd gleich (Tab. 3.4). Allerdings wies *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Gegensatz zum Wildtypstamm unter Verwendung von Acetaldehyd eine etwa achtfach höhere NADH-abhängige Adh-Aktivität und mit Butyraldehyd eine ca. 25-fach (0,199 U/mg) höhere NADH-abhängige Bdh-Aktivität (2,37 U/mg) auf. Die erhöhte

Produktion von Ethanol und Butanol in der Mutante ist also auf die Aktivität der NADH-abhängigen Dehydrogenasen zurückzuführen.

**Tab. 3.4:** Enzymaktivitäten von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)*. Die Zellernte erfolgte nach Anzucht in MS-MES in der späten exponentiellen Phase. Anschließend wurde die spezifische Aktivität (U/mg) spektrophotometrisch aerob bzw. anaerob in zellfreiem Extrakt gemessen. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten in jeweils drei Parallelen dargestellt.

Enzym	spezifische Aktivität [U/mg Protein]		$\alpha$ <sup>1)</sup>
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>	
Ethanol-Dehydrogenase NADPH-abhängig [EC 1.1.1.2]	0,025 ± 0,008	0,026 ± 0,003	
Ethanol-Dehydrogenase NADH-abhängig [EC 1.1.1.1]	0,026 ± 0,005	0,199 ± 0,057	**
Butanol-Dehydrogenase NADPH-abhängig [EC 1.1.1.2]	0,082 ± 0,009	0,075 ± 0,010	
Butanol-Dehydrogenase NADH-abhängig [EC 1.1.1.1]	0,093 ± 0,004	2,37 ± 0,49	***
Hydrogenase [EC 1.12.7.1]	4,77 ± 0,18	4,11 ± 0,42	
Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase NADP <sup>+</sup> -abhängig [EC 1.2.1.9]	0,0067 ± 0,001	0,0133 ± 0,002	*
Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase NAD <sup>+</sup> -abhängig [EC 1.2.1.9]	0,009 ± 0,002	0,0141 ± 0,004	
Pyruvat:Ferrodoxin-Oxidoreduktase [EC 1.2.7.1]	0,074 ± 0,006	0,24 ± 0,02	**
Crotonase (3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase) [EC 4.2.1.17]	61,21 ± 7,25	170,76 ± 25,27	**
Thiolase (Acetyl-CoA Acetyltransferase) [EC 2.3.1.9]	16,36 ± 1,99	51,19 ± 6,57	**
Butyrylkinase [EC 2.7.2.7]	41,83 ± 6,16	37,54 ± 4,71	
Acetatkinase [EC 2.7.2.1]	20,38 ± 2,37	19,44 ± 4,18	
Phosphotransbutyrylase [EC 2.3.1.19]	2,51 ± 0,16	2,25 ± 0,33	
Laktat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.27]	0,021 ± 0,002	0,020 ± 0,003	

1) Das Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wird durch den p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) dargestellt, welcher mittels t-Test berechnet wurde. Die Stärke der Signifikanz wird durch die Sterne wie folgt repräsentiert:

\* 0,01 < p ≤ 0,05 knapp signifikant,

\*\* 0,001 < p ≤ 0,01 signifikant,

\*\*\* p ≤ 0,001 hoch signifikant.

Ein weiteres Charakteristikum des *rex*-negativen Stamms ist die stark reduzierte H<sub>2</sub>-Bildung. Aus diesem Grund sollte zudem die enzymatische Aktivität der Hydrogenase (Hyd) in der Defektmutter im Vergleich zum WT bestimmt werden. Die enzymatische Untersuchung ergab eine Hyd-Aktivität von 4,77 U/mg im WT und eine nur geringfügig verminderte Aktivität der Hydrogenase auf 4,11 U/mg in der Mutante (Tab. 3.4).

Weiterhin erfolgten enzymatische Aktivitätsbestimmungen von zentralen Stoffwechselenzymen. Zunächst wurde die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Sowohl mit dem Coenzym NADP<sup>+</sup> als auch NAD<sup>+</sup> konnte jeweils eine zweifach gestiegene GAPDH-Aktivität in der Rex-Insertionsmutante detektiert werden (Tab. 3.4). Auch für die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor) wurde eine erhöhte Enzymaktivität (dreifach) ermittelt. So betrug die spezifische Aktivität der Pfor im WT 0,074 U/mg, während in der Mutante ein Wert von 0,24 U/mg ermittelt wurde. Zudem wurden die Aktivitäten der Thiolase (Thl) und Crotonase (Crt) gemessen. Wie in Tabelle 3.4 ersichtlich, konnte eine Divergenz zwischen dem WT und der Rex-Defektmutter detektiert werden. Die Crotonase-Aktivität war mit 61,21 U/mg im WT deutlich geringer als in der Rex-Insertionsmutante mit 170,76 U/mg. Dies traf auch für die Aktivität der Thiolase zu (51,19 U/mg im Vergleich zu 16,36 U/mg des Parentalstamms). Vergleichend zum Wildtyp waren sowohl die Crt- als auch die Thl-Aktivität in der *rex*-negativen Mutante etwa dreifach höher.

Für die Aktivitäten der Acetat- und Butyrylkinase sowie der Phosphotransbutyrylase zeigten sich keine großen Differenzen zwischen den Stämmen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)* (Tab. 3.4).

### 3.5.5 Bestimmung der intrazellulären Nukleotide

In *C. acetobutylicum* ist der Wechsel von Acidogenese zu Solventogenese mit der Anreicherung der Säuren und dem Absinken des pH-Werts assoziiert (Dürre, 2008). Es wurde zudem postuliert, dass die Lösungsmittelbiosynthese durch Veränderungen des intrazellulären Redoxstatus charakterisiert ist (Grupe und Gottschalk, 1992). Weiterhin zeigten frühere Untersuchungen in *B. subtilis* und *S. aureus*, dass das Rex-Protein an der Erfassung des zellinternen NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Gehalts beteiligt ist (Wang *et al.*, 2008; Pagels *et al.*, 2010). Wie bereits erläutert (3.5.1), führt die Inaktivierung von *rex* (*CAC2713*) in *C. acetobutylicum rex::int(95)* zu einer frühzeitig einsetzenden sowie erhöhten Produktion der Alkohole Ethanol und Butanol. Es sollte nun geklärt werden, ob dies mit Veränderungen der intrazellulären Nukleotidkonzentrationen in der Rex-Defektmutter im Vergleich zum WT verbunden ist. Dazu wurden aus ‚Batch‘-Kulturen von Wildtyp und Mutante jeweils in der exponentiellen (nach 10 h, Säurephase) und der stationären Wachstumsphase (nach 48 h, Lösungsmittelphase) Proben

entnommen. ATP und ADP sowie NAD(P)H und NAD(P)<sup>+</sup> wurden dann sofort aus den Zellen, wie unter 2.12.1.1 und 2.12.2.1 beschrieben, extrahiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Nukleotidkonzentrationen mit Hilfe von optisch-enzymatischen Tests (2.12.1.2, 2.12.2.2). In der Tabelle 3.5 sind die gemessenen Werte zusammengefasst.

**Tab. 3.5:** Konzentrationen der intrazellulären Nukleotide von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824. Nach einer „Batch“-Kultivierung in MS-MES erfolgten die Probenahme in der exponentiellen (Säurephase) sowie stationären Phase (Lösungsmittelphase) und eine sofortige Extraktion der Nukleotide mit anschließender enzymatischer Bestimmung der Konzentrationen. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten in jeweils drei Parallelen dargestellt.

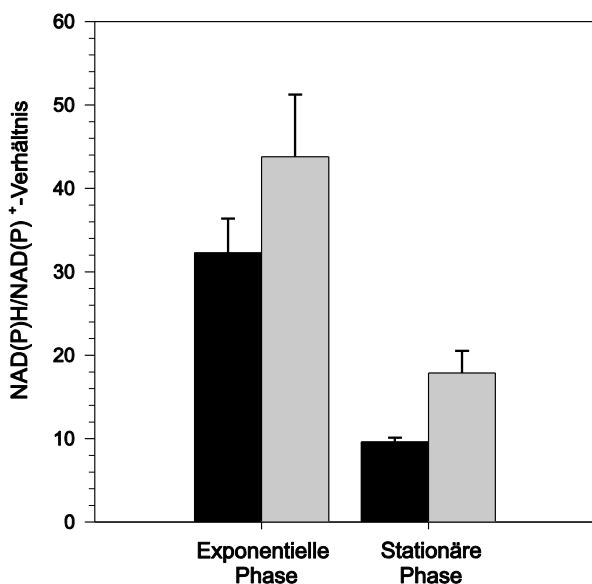
Nukleotid	Konzentration [μmol/g Trockengewicht]			
	Säurephase		Lösungsmittelphase	
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>
ADP	1,41 ± 0,07	1,50 ± 0,23	1,27 ± 0,10	0,90 ± 0,10
ATP	2,81 ± 0,43	3,34 ± 0,45	1,78 ± 0,55	1,54 ± 0,24
NAD(P) <sup>+</sup>	0,80 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,67 ± 0,09	1,12 ± 0,30
NAD(P)H	25,74 ± 0,28	33,03 ± 3,70	6,47 ± 0,13	22,59 ± 5,94

Die intrazellulären ADP-Konzentrationen von Wildtyp und Mutante zeigten keine deutlichen Unterschiede. In beiden Stämmen war die ADP-Konzentration in der Lösungsmittelphase im Gegensatz zur Säurephase etwas geringer (Tab. 3.5). Der ATP-Spiegel hingegen war während der Acidogenese in der Mutante mit 3,34 μmol/g etwa 18 % höher als im WT mit 2,81 μmol/g. In der Lösungsmittelphase (nach 48 h) waren die Konzentrationen an ATP in WT und Mutante nicht signifikant unterschiedlich. Insgesamt waren die ATP-Spiegel der untersuchten Kulturen in der Säurephase höher als in der Lösungsmittelphase.

Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen der Coenzyme NAD(P)<sup>+</sup> und NAD(P)H. Wie der Tabelle 3.5 zu entnehmen ist, konnte prinzipiell mehr NAD(P)H als NAD(P)<sup>+</sup> in beiden Kulturen in den Wachstumsphasen ermittelt werden. In der Acidogenese wurde mit 33,03 μmol/g eine etwa 1,5-fach erhöhte NAD(P)H-Menge in *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum WT bestimmt. Während der Solventogenese war in beiden Stämmen ein gesunkener NAD(P)H-Spiegel detektierbar. Jedoch zeigte sich hier eine etwa dreifach erhöhte Konzentration von NAD(P)H in der Rex-Insertionsmutante (22,59 μmol/g) im Vergleich zum WT (6,47 μmol/g). Der NAD(P)<sup>+</sup>-Gehalt der Defektmutante *rex::int(95)* und dem Wildtyp zeigte keine deutlichen

wachstumsbedingten Unterschiede. Es war einzig eine etwa zweifach gestiegene Konzentration von NAD(P)<sup>+</sup> nach 48 h in der Mutante erkennbar (Tab. 3.5).

Aus den enzymatisch bestimmten Daten ließ sich das intrazelluläre NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis von WT und Mutante berechnen (Abb. 3.17). Für *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnte in der exponentiellen Wachstumsphase ein NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis von 1:32 und in der stationären Wachstumsphase ein Verhältnis von 1:8 ermittelt werden. Für den Stamm *rex::int(95)* zeigte sich ebenfalls ein gesteigertes Verhältnis der Dinukleotide in der Säurephase im Vergleich zur Lösungsmittelphase. Allerdings lagen die NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnisse des *rex*-negativen Stamms deutlich über denen des Wildtyps. So ließ sich in der Säurephase ein NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnisse von 1:43 und in der Lösungsmittelphase ein Verhältnis von 1:20 ermitteln (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnisse von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* *rex::int(95)* während Säure- und Lösungsmittelphase. Die Verhältnisse wurden aus den gemessenen NAD(P)H- und NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentrationen zu den Probennahmezeitpunkten der exponentiellen (Säurephase, schwarze Balken) und stationären Wachstumsphase (Lösungsmittelphase, graue Balken) berechnet (Tab. 3.5). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der drei unabhängig durchgeführten Experimente dargestellt.

### 3.6 Beeinflussung der Elektronenübertragung

Während einer typischen Fermentation von *C. acetobutylicum* ist die Solventogenese von der NAD(P)H-Verfügbarkeit abhängig. Durch eine verringerte Wasserstoffbildung kann mehr Reduktionskraft für die Alkoholbildung bereitgestellt werden (Girbal *et al.*, 1995). Da die Mutante *C. acetobutylicum* *rex::int(95)* eine signifikant gestiegene Produktion der Alkohole sowie eine deutlich reduzierte H<sub>2</sub>-Synthese aufwies, sollte nun untersucht werden, ob die Elektronenübertragung in der Rex-Insertionsmutante beeinflusst werden kann. Dazu wurden

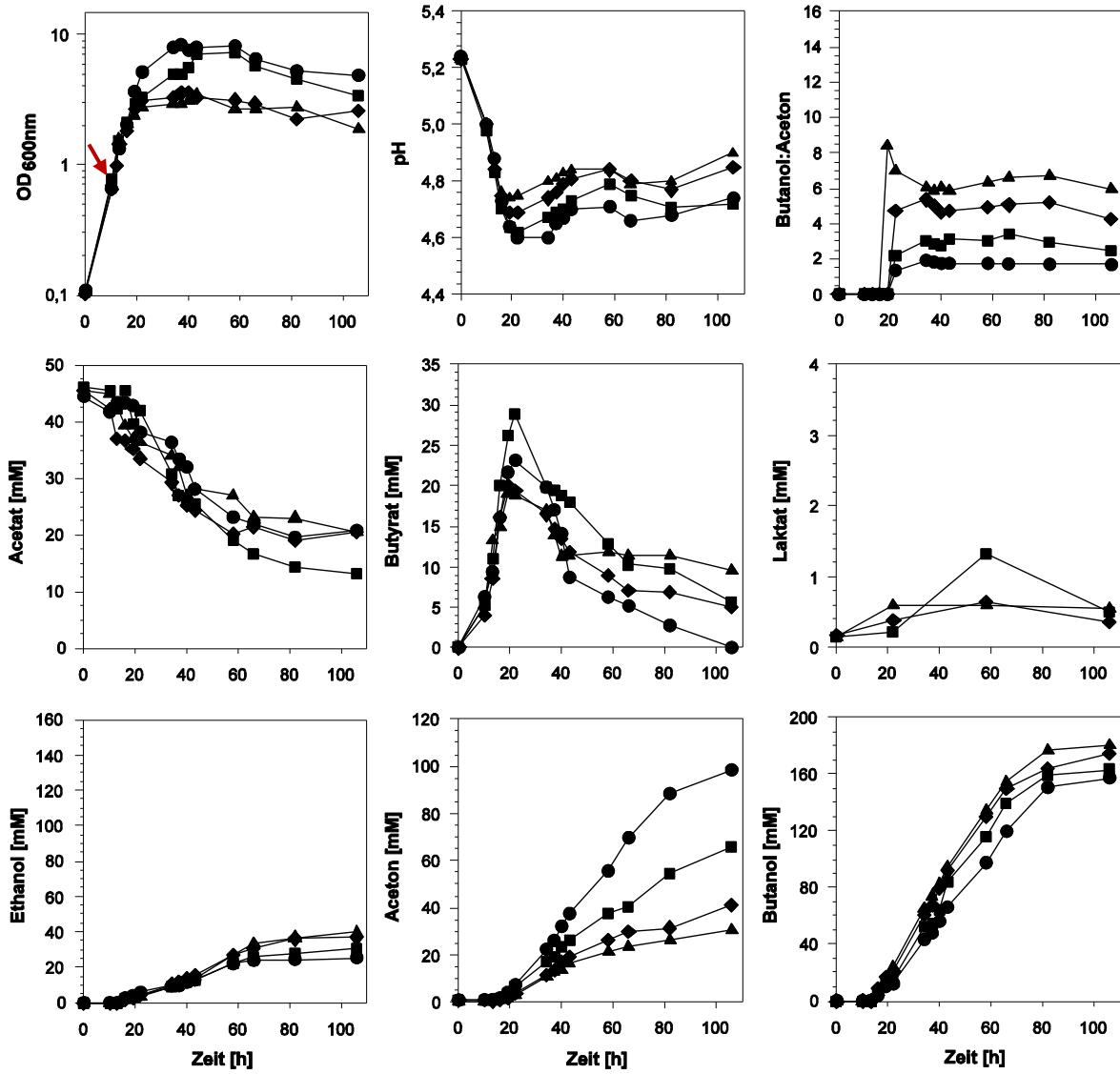
Wachstumsexperimente unter Zugabe von Methylviologen (MV) durchgeführt. Denn durch die Zugabe von künstlichen Elektronencarriern wie Methylviologen kann eine Hemmung der *in vivo*-Hydrogenaseaktivität erreicht werden.

### 3.6.1 Kultivierung in Gegenwart von Methylviologen

Die Anzucht *C. acetobutylicum rex::int(95)* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 in Gegenwart von Methylviologen erfolgte in 200 ml MS-MES-Medium (2.2.1) unter statischen Kulturbedingungen. Die ‚Batch‘-Hauptkulturen wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, inkuliert und die physiologischen Parameter wie die optische Dichte (2.5.1) und der pH-Wert (2.5.3) über 110 h überwacht. Für die Quantifizierung der Gärungsprodukte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und diese gaschromatographisch analysiert (2.5.5). Repräsentativen Datensätze von zwei unabhängig durchgeführten Wachstumsexperimenten sind in den Abbildungen 3.18 und 3.19 dargestellt.

Zehn Stunden nach dem Animpfen der Kulturen erfolgte die Injektion von 0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM bzw. 1 mM MV. Mit zunehmender Konzentration von MV verringerten sich nicht nur die Wachstumsraten in der exponentiellen Phase sondern auch die maximalen optischen Dichten ( $OD_{max}$ ) sowohl im WT als auch in der Rex-Insertionsmutante (Tab. 3.6, Abb. 3.18, Abb. 3.19). Während für die WT-Kontrollkultur ohne MV eine Wachstumsrate ( $\mu$ ) von  $0,10\text{ h}^{-1}$  und eine  $OD_{max}$  von 8,3 ermittelt werden konnte, war nach der Zugabe von 1 mM MV die Wachstumsrate auf  $0,03\text{ h}^{-1}$  und die  $OD_{max}$  auf 2,9 gesunken (Tab. 3.6 a). Bei *C. acetobutylicum rex::int(95)* sank nach Zugabe von 1 mM Methylviologen die Wachstumsrate von 0,09 auf 0,05 (Tab. 3.6 b). Die maximale  $OD_{600nm}$  der Kontrolle betrug hier 7,0, während in Gegenwart von 1 mM MV nur eine  $OD_{max}$  von 4,8 erreicht wurde (Abb. 3.19). Die Wachstumsbeeinträchtigung der Mutante durch MV war demzufolge deutlich geringer als für den WT. Das durch den MV-Zusatz beeinträchtigte Wachstum spiegelte sich entsprechend auch in der verzögerten und weniger starken Ansäuerung des Kulturmediums bei beiden Stämmen wider (Abb. 3.18, Abb. 3.19).

Nach der Zugabe von unterschiedlichen MV-Konzentrationen war über den gesamten Versuchszeitraum eine Steigerung der produzierten Alkoholmengen von *C. acetobutylicum* sowie *rex::int(95)* erkennbar (Abb. 3.18, 3.19a, Tab. 3.6). Die Zugabe von 1 mM MV hatte zur Folge, dass der *rex*-negative Stamm nach 110 h etwa 15 mM mehr Ethanol im Vergleich zur Kontrolle produzierte und so die bereits gesteigerte Ethanolbiosynthese weiter induziert wurde (Abb. 3.19). Auch der Wildtyp zeigte einen Anstieg von etwa 24 mM auf 42 mM Ethanol am Ende des Wachstumsexperiments (Abb. 3.18). Hinsichtlich der Ausbeute von Butanol war in der Gegenwart von 1 mM MV eine Steigerung von ~ 12 % in der WT- (180 mM) und ~ 10 % der Mutantenkultur (176 mM) zu erkennen.

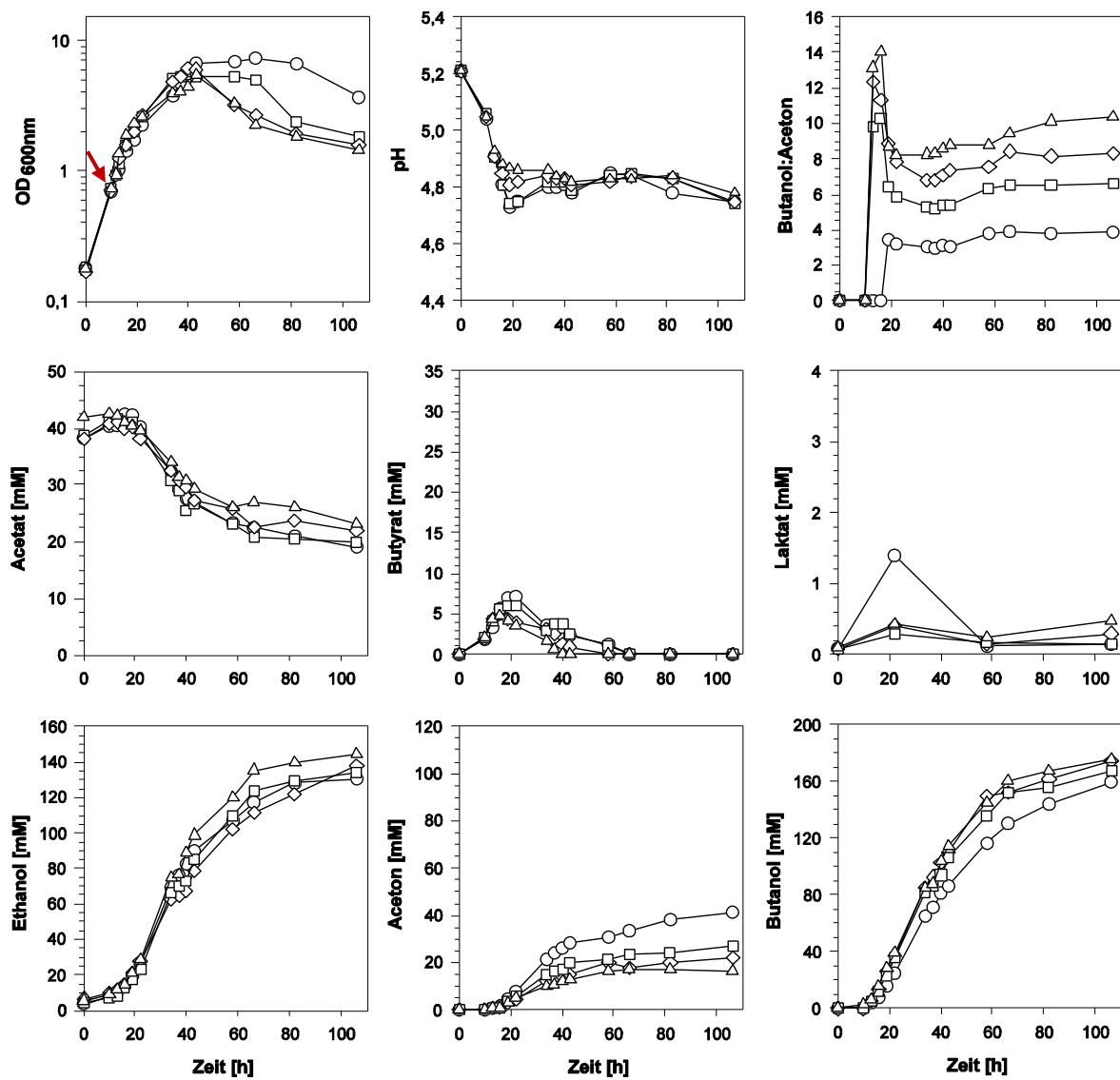


**Abb. 3.18:** Kultivierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 in Gegenwart von Methylviologen (MV). Dargestellt ist ein repräsentativer Datensatz. Die Wachstumsexperimente wurden in 200 ml MS-MES mit Glukose als Kohlenstoffquelle bei 37 °C durchgeführt. Nach 10 h (→) wurden je 0,1 mM (■), 0,5 mM (◆) und 1 mM MV (▲) im Vergleich zu einer Kontrolle ohne MV (●) zugesetzt. Während der Kultivierung wurden die optische Dichte und der pH-Wert gemessen. Laktat wurden enzymatisch gemessen und die Produktbestimmung erfolgte gaschromatographisch.

Weiterhin konnte durch die Applikation von MV eine schneller einsetzende Butanolbiosynthese in einem Zeitraum von 30 bis 50 h sowohl in der Insertionsmutante als auch im WT beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde umso weniger Aceton produziert, je mehr MV den Kulturen zugesetzt wurde. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen produzierte der Parentalstamm ca. 68 mM und die Defektmutter etwa 25 mM weniger Aceton (Abb. 3.18, 3.19)

Die gaschromatographisch detektierten Konzentrationen von Butanol, Ethanol und Aceton der untersuchten Stämme sind in der Tabelle 3.6 zusammengefasst. Dass mit zunehmender

MV-Konzentration mehr Ethanol und Butanol jedoch weniger Aceton gebildet wurde, wird weiterhin durch das Alkohol:Aceton-Verhältnis veranschaulicht. War in der WT-Kontrolle ein Verhältnis von 2,4:1 detektierbar, konnte dieses durch den Zusatz von 1 mM auf 11,1:1 gesteigert werden (Tab. 3.6 a). Dieser Effekt wurde im *rex*-negativen Stamm noch deutlicher. Es konnte ein Anstieg des Alkohol:Aceton-Verhältnis auf 16,2:1 im Vergleich zur *rex:int(95)*-Kontrolle (7,0:1) ermittelt werden (Tab. 3.6 b)



**Abb. 3.19:** Kultivierung von *C. acetobutylicum rex:int(95)* in Gegenwart von Methylviologen (MV). Dargestellt ist ein repräsentativer Datensatz. Die Wachstumsexperimente wurden in 200 ml MS-MES mit Glukose als Kohlenstoffquelle bei 37 °C durchgeführt. Nach 10 h (→) wurden je 0,1 mM (□), 0,5 mM (◇) und 1 mM MV (△) im Vergleich zu einer Kontrolle ohne MV (○) zugesetzt. Während der Kultivierung wurden die optische Dichte und der pH-Wert gemessen. Laktat wurden enzymatisch gemessen und die Produktbestimmung erfolgte gaschromatographisch.

**Tab. 3.6: Wachstum und Produktbildung in Gegenwart von Methylviologen.** Die Tabelle umfasst die wichtigsten physiologischen Parameter von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (a) und *C. acetobutylicum rex::int(95)* (b). Neben den Wachstumsraten ( $\mu$ ) der untersuchten Stämme sind die Mittelwerte der Lösungsmittelkonzentrationen und die daraus resultierenden Alkohol:Aceton-Verhältnisse aus zwei unabhängig durchgeföhrten Experimenten angegeben.

(a)

Methylviologen [mM]	Wachstumsrate <sup>1)</sup> [h <sup>-1</sup> ]	Lösungsmittel [g/l]			Verhältnis Alkohol:Aceton
		Ethanol	Aceton	Butanol	
0	0,10	1,0	5,4	11,8	2,4:1
0,1	0,07	1,5	3,6	12,3	3,8:1
0,5	0,05	1,6	2,1	12,8	6,8:1
1,0	0,03	1,9	1,4	13,2	11,1:1

(b)

Methylviologen [mM]	Wachstumsrate <sup>1)</sup> [h <sup>-1</sup> ]	Lösungsmittel [g/l]			Verhältnis Alkohol:Aceton
		Ethanol	Aceton	Butanol	
0	0,09	5,9	2,5	11,9	7,0:1
0,1	0,08	6,2	1,7	12,2	11,0:1
0,5	0,06	6,4	1,3	12,4	14,3:1
1,0	0,05	6,8	1,2	13,1	16,2:1

1) Die Wachstumsraten ( $\mu$ ) der Bakterienkulturen wurden in einem Zeitraum von 30 h nach MV-Zugabe ermittelt.

### 3.7 Kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum rex::int(95)*

Eine wichtige Methode zur Untersuchung des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum rex::int(95)* unter definierten Wachstumsbedingungen und ohne wechselnde Umweltparameter stellte die Kultivierung in einem Chemostat dar. Es können so reproduzierbare Qualitäten von Proben in der Säure- und Lösungsmittelphase erreicht werden, da alle Wachstumsparameter konstant gehalten werden können (Bahl *et al.*, 1982b; Janssen *et al.*, 2010). Die Charakterisierung des Wachstums und der Produktbildung von *C. acetobutylicum rex::int(95)* unter kontinuierlichen Kulturbedingungen erfolgte in einem Kulturvolumen von 1,5 l bei Phosphatlimitierung (2.2.1).

### 3.7.1 Glukose-Fermentation in kontinuierlichen Kulturen

Die Zellanzucht in Vorkulturen und das Beimpfen des Fermenters erfolgten wie unter 2.4.2 beschrieben. Nach dem Beimpfen folgte eine Anwachphasen von 16 bis 24 h, in der die Kultur mit 50 Upm gerührt, mit Stickstoff durchgast und konstant auf 37 °C gehalten wurde. Der pH-Wert und die Temperatur wurden während der gesamten Kulturführung permanent durch die Steuereinheit BiostatB (Melsungen, Göttingen) mit entsprechenden Sonden überwacht.

Nach dem Beimpfen lag der pH-Wert der Kulturen bei etwa 6,5. Durch die automatische Zufuhr von 2 M KOH konnte ein Absinken des pH-Wertes verhindert und je nach gewünschtem Produktspektrum der Zellen die Säurephase (pH 6,5) oder die Lösungsmittelphase (pH 4,5) erreicht werden. Im Anschluss an die Anwachphasen wurde die Rührung der Kultur auf 200 Upm erhöht und die Zufuhr des phosphatlimitierten Minimalmediums (2.2.1) mit einer Durchflussrate von 0,075 h<sup>-1</sup> angeschaltet. Die Abbildung 3.20 zeigt den Verlauf der optischen Dichte und das Produktspektrum einer kontinuierlichen Kultur von *C. acetobutylicum rex::int(95)* beim Wechsel zwischen Säure- und Lösungsmittelphase.

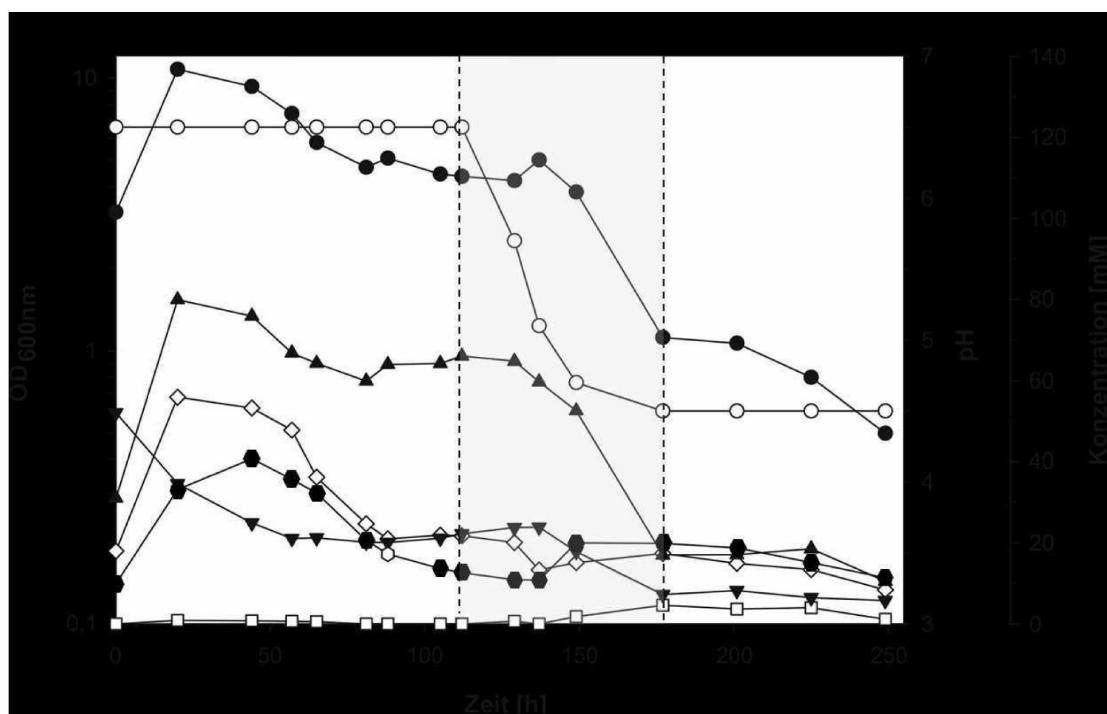


Abb. 3.20: Wachstum und Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum rex::int(95)* unter kontinuierlichen Kulturbedingungen. Die anaerobe Kultivierung im Chemostat erfolgte in 1,5 l phosphatlimitiertem Minimalmedium bei 37 °C unter Rührung (200 Upm). In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte gemessen. Die Temperatur und der pH-Wert wurden mittels entsprechenden Sonden überwacht. Die Produktanalyse erfolgte gaschromatographisch. Optische Dichte (●), pH-Wert (○), Acetat (▼), Butyrat (▲), Ethanol (●), Aceton (□), Butanol (◇).

Die Medienzufuhr ermöglicht den Übergang der Zellen von einer anwachsenden ‚Batch‘-Kultur in die kontinuierliche pH-kontrollierte Chemostat-Kultur bei einem pH von 6,5. Während dieser Phase war die höchste Zelldichte ( $OD_{max}$  etwa 10) und daraus resultierend auch die höchsten Produktkonzentrationen in der Rex-Insertionsmutante detektierbar (Abb. 3.20). Nach 72 h erreichte die kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum rex::int(95)* das sogenannte Fließgleichgewicht („Steady state“) in der Säurephase. Das Fließgleichgewicht beschreibt den stationären Zustand in einem offenen biologischen System (Chemostat), wenn fortlaufend Medium zugeführt und Bakterienkultur abgeführt wird und ihre Menge zeitlich konstant bleibt (Cypionka, 1999; Lengeler *et al.*, 1999). Im „Steady state“-Wachstum wies die Mutantenkultur eine stabile optische Dichte von ca. 4,4 auf. Die gaschromatographische Analyse ergab zudem, dass neben den Säuren Acetat und Butyrat ebenfalls die Alkohole Ethanol und Butanol gebildet wurden. So wurden im Kulturüberstand von *rex::int(95)* 23,7 mM Acetat und 64,7 mM Butyrat gemessen (Abb. 3.20).

**Tab. 3.7:** Physiologische Parameter unter „Steady state“-Bedingungen kontinuierlicher Kulturen von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 in Säure- bzw. Lösungsmittelphase. Gezeigt sind die Durchflussrate, die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) und die Konzentrationen der Fermentationsprodukte sowie der Glukosekonsum.

Parameter	Säurephase		Lösungsmittelphase	
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <sup>1)</sup>	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <sup>1)</sup>	<i>C. acetobutylicum</i> <i>rex::int(95)</i>
Durchflussrate [ $h^{-1}$ ]	0,075	0,075	0,075	0,075
pH	5,7	6,5	4,5	4,5
max. $OD_{600nm}$	4,9	4,4	4,8	$\leq 1,0$
Butyrat [mM]	68	64,7	6,2	10,5
Acetat [mM]	42	23,7	13	7,2
Ethanol [mM]	3,9	15,1	5,9	8,4
Aceton [mM]	3,4	0,0	31	1,1
Butanol [mM]	0,4	19,9	40	11,3
Glukose [mM] (Vorratsmedium)	222 <sup>2)</sup>	234	222 <sup>2)</sup>	219
Glukose [mM] (Konsum)	n.d.	139	n.d.	33

1) Es sind Daten zur Kultivierung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 im Chemostat dargestellt (Janssen, 2010).

2) Die Glukose-Konzentration in mM wurde basierend auf der im phosphatlimitierten Minimalmedium verwendeten 4 % Kohlenstoffquelle (40 g/l) und dem Molekulargewicht von Glukose (180,1 g/mol) berechnet.

Die Produktkonzentration von Ethanol zu diesem Zeitpunkt betrug 15,1 mM und für Butanol konnte eine Konzentration von 19,9 mM bestimmt werden (Tab. 3.7). Aceton hingegen war nicht detektierbar. Anschließend sollte die Lösungsmittelbildung durch das schrittweise Absenken des pH-Wertes auf 4,5 induziert werden. Dies führte zu einem starken Einbruch der optischen Dichte auf 1,2 (Abb. 3.20). Nachfolgend sollte sich erneut ein ‚Steady state‘ der Kultur bei einem pH von 4,5 einstellen. Die Kultur zeigte nach dem ‚Shift‘ jedoch keinen erneuten Anstieg der optischen Dichte, sondern die OD<sub>600nm</sub> fiel weiter ab und lag nach 250 h bei etwa 0,5.

Nichtsdestotrotz war nach Absenken des pH-Wertes (ca. 170 h) ein Abfall der Acetat- (~ 7 mM) und Butyratkonzentration (~ 17 mM) zu erkennen (Abb. 3.20). Zu diesem Zeitpunkt ließ sich weiterhin ein leichter Anstieg der Lösungsmittelkonzentrationen verzeichnen, welche jedoch mit zunehmender Kultivierung von rex::int(95) im Chemostat wieder absank. Am Ende der kontinuierlichen Kultivierung wies die Rex-Insertionsmutante etwa 8,4 mM Ethanol, 11,3 mM Butanol und etwa 1,1 mM Aceton auf. Demnach ist festzuhalten, dass *C. acetobutylicum* rex::int(95) kein Fließgleichgewicht bei einem pH-Wert von 4,5 erreichte.

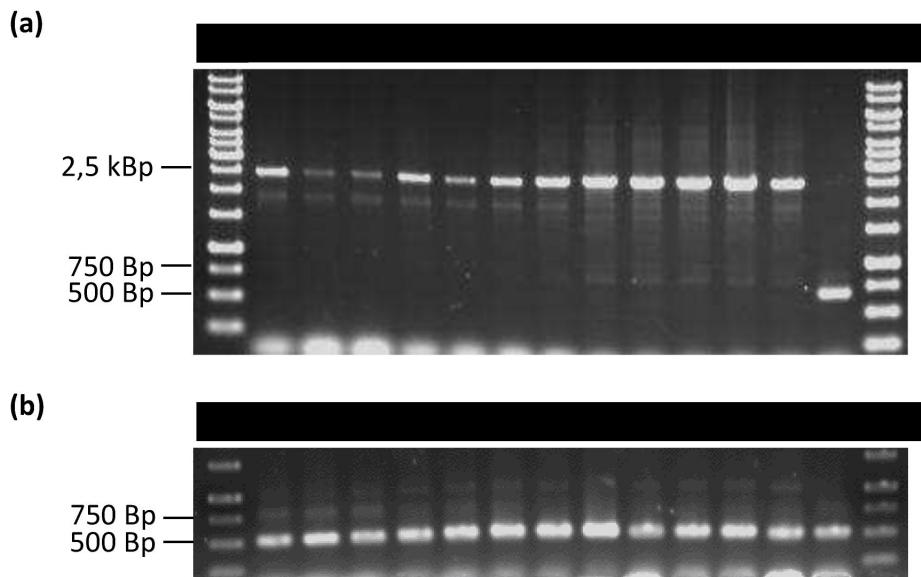
### 3.7.2 Verifikation der Mutation während kontinuierlicher Kulturführung

Abschließend sollte mittels PCR-Analysen die Insertionsmutagenese in *C. acetobutylicum* rex::int(95) während kontinuierlicher Kulturbedingungen überprüft und bestätigt werden. Neben der Stabilität der Mutation wurde außerdem die Existenz des Megaplasmids pSOL1 während der Versuchsdauer von 11 Tagen untersucht. Dieser Zeitraum umfasst ebenfalls die Kontrolle der Vorkultur (Tag 0) und die Anwachsphase (Tag 1) vor dem Anschalten der Medienzufuhr. Dazu wurden während der Fermentation regelmäßig Zellproben entnommen und die chromosomal DNA isoliert (2.6.3).

Zur Kontrolle der ClosTron-Insertion erfolgte eine Gen-Gen PCR unter Verwendung der Primer Rex\_BamHI\_fw und Rex\_Cfr9I\_rev (Tab. A.2, Anhang) (3.3.2.1). Weiterhin wurde eine 500 Bp lange Teilsequenz des *adhE2*-Gens amplifiziert, da dieser Leserahmen auf dem Megaplasmid pSOL1 kodiert ist. Dafür wurden die Oligonukleotide, NB\_adhE2\_fw und NB\_adhE2\_rev (Tab. A.2, Anhang), die Reaktionsansätze und die Temperaturprofile, wie unter 2.8.2 erläutert, verwendet. Die Fragmentsynthesen wurden mittels Agarosegelektrophorese (2.7.3.1) überprüft und sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

Hinsichtlich der Gen-Gen PCR war zu erkennen, dass zu jedem Probennahmezeitpunkt ein PCR-Fragment von ca. 2,5 kBp im Vergleich zu einer WT-Kontrolle (650 Bp, Spur 14) amplifiziert werden konnte (Abb. 3.21 a, Spur 2 bis 13). Ebenso waren positive Signale für die Amplifikation des *adhE2*-Gens zu erkennen. Es konnte in jeder Spur ein Fragment von ca. 500 Bp detektiert werden (Abb. 3.21 b). So war nicht nur die Mutation im rex-negativen Stamm über 11 Tage

hinweg stabil vorhanden, sondern auch das Megaplasmid pSOL1 lag während der gesamten Kultivierung im Chemostat in den Zellen von *C. acetobutylicum rex::int(95)* vor. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten, dass weder eine Rückmutation noch ein Verlust von pSOL1 auf die Instabilität der Rex-Insertionsmutante im Chemostat bei einem pH-Wert von 4,5 zurück zu führen ist.



**Abb. 3.21:** **Verifikation der Intronmutagenese und Nachweis von pSOL1 über den Wachstumsverlauf in einer kontinuierlichen Kultur von *C. acetobutylicum rex::int(95)*.** Der Nachweis von pSOL1 und die Verifikation der Mutation erfolgten mittels PCR-Analysen. Die DNA-Fragmente der Gen-Gen PCR (a) und der pSOL1-PCR (b) wurden in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die isolierte chromosomale DNA, aus regelmäßig entnommenen Zellproben, der Rex-Insertionsmutante wurde als Matrize verwendet. (a) Spur 1 und 15: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2: Tag 0, Spur 3: Tag 1; Spur 4: Tag 2; Spur 5: Tag 3, Spur 6: Tag 4, Spur 7: Tag 5, Spur 8: Tag 6, Spur 9: Tag 7, Spur 10: Tag 8, Spur 11: Tag 9, Spur 12: Tag 10, Spur 13: Tag 11; Spur 2 bis 13: *rex::int(95)* (2,5 kBp), Spur 14: WT-Kontrolle (650 Bp). (b) siehe (a); Spur 2 bis 13: *rex::int(95)* (500 Bp), Spur 14: WT-Kontrolle (500 Bp).

## 4 Diskussion

Vor dem Hintergrund steigender Ölpreise aber auch einer bewussteren Umweltpolitik steigt das Interesse an der Gewinnung von alternativen Treibstoffen durch biotechnologische Prozesse. Der biphasische Gärungsstoffwechsel von Lösungsmittel bildenden Clostridien wie *C. acetobutylicum* ATCC 824 wurde und wird in diesem Zusammenhang intensiv untersucht. Besonders im Fokus steht dabei die Aufklärung des Mechanismus, der dem ‚Shift‘ von Acidogenese zur Solventogenese zu Grunde liegt. Es konnte gezeigt werden, dass Parameter wie niedrige pH-Werte in Zusammenhang mit dem Übersteigen von Schwellenkonzentrationen undissoziierter Säuren einen noch ungeklärten Mechanismus auslösen, durch den die Lösungsmittelbildung induziert wird (Bahl *et al.*, 1982; Bahl und Gottschalk, 1984; Gottschal und Morris, 1981; Desai *et al.*, 1999; Desai und Papoutsakis, 1999; Hüsemann und Papoutsakis, 1986). Zudem wurde ein steigender NADH-Gehalt in der Zelle als ein Lösungsmittel induzierender Faktor beschrieben (Girbal und Soucaille, 1998; Grupe und Gottschalk, 1992). Das heißt, eine Verschiebung der intrazellulären Redoxverhältnisse führt zur Veränderung der Produktbildung, um die Redoxhomöostase zu gewährleisten. Basierend auf diesen Arbeiten stellte sich die Frage nach der Wahrnehmung der NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentrationen in der Zelle und der damit verbundenen Regulation der Produktion der Lösungsmittel.

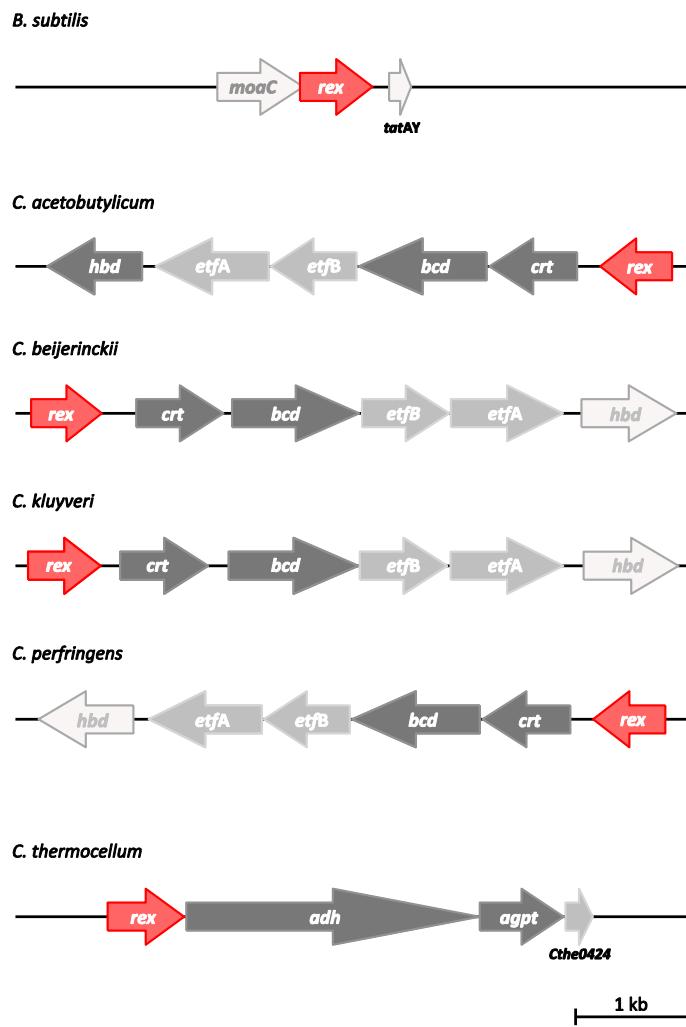
In aeroben Bakterien wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Rex in der Lage ist, die intrazellulären NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnisse sensorisch zu erfassen und als Konsequenz daraus die Genexpression zu regulieren (Gyan *et al.*, 2006; Pagels *et al.*, 2010). In Folge dessen kommt es zu Veränderungen des Stoffwechselflusses, um sich den Umweltbedingungen anzupassen und die Redoxhomöostase zu erhalten. Rex-Proteine sind in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet (Ravcheev *et al.*, 2012). Auch in *Clostridium perfringens* wurde bereits die Existenz eines Rex ähnlichen Proteins beschrieben (Brekasis und Paget, 2003). Zudem konnte ein ‚Redox sensing protein‘ (RSP) im strikt anaeroben Mikroorganismus *Thermoanaerobacter ethanolicus* identifiziert werden (Pei *et al.*, 2011). Dieses RSP ist ein Schlüsselregulator eines Repressor/Operator-Systems, welches für die redox-abhängige Regulation der Ethanolproduktion verantwortlich ist. Auch im Genom von *C. acetobutylicum* ATCC 824 existiert ein als ‚Redox sensing transcriptional repressor Rex‘ annotierter Leserahmen CAC2713 (Nölling *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Rex in der Wahrnehmung des Redoxstatus in *C. acetobutylicum* und dessen Einfluss auf den Kohlenstoff- und Elektronenfluss untersucht. Zunächst wird die funktionelle Charakterisierung des Rex-Proteins von *C. acetobutylicum* erläutert, bevor die beobachteten Auswirkungen der Inaktivierung des *rex*-Gens (CAC2713) diskutiert werden.

## 4.1 Identifizierung von Rex als Transkriptionsregulator in *C. acetobutylicum*

### 4.1.1 Lokalisation, Proteinstruktur und Funktion von Rex

Transkriptionsfaktoren der Rex-Repressor-Familie wurden in der Vergangenheit in einer Vielzahl aerober Bakterien identifiziert und in ihrer Funktion untersucht. Die Konserviertheit von Rex homologen Proteinen konnte zudem kürzlich durch *in silico*-Analysen nicht nur in aeroben sondern auch in anaeroben Gram-positiven Bakterien gezeigt werden und lässt auf eine zentrale Funktion schließen (Ravcheev *et al.*, 2012).

Der innerhalb dieser Arbeit untersuchte ORF *CAC2713* (*rex*) aus *C. acetobutylicum*, dessen Genprodukt eine Funktion als Repressor der Rex-Familie zugeordnet wird (Nölling *et al.*, 2001), befindet sich interesseranterweise nur 176 Bp stromaufwärts vom Butyryl-CoA-Synthetase- (*bcs*)-Operon (Abb. 1.4). Das *bcs*-Operon beinhaltet dabei die Gene der Crotonase (*crt*), Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*), der Elektronentransfer-Flavoproteine A/B (*etfA/etfB*) sowie der 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*) (Bennett und Rudolph, 1995; Berezina *et al.*, 2008; Boynton *et al.*, 1996). Diese Proteine nehmen eine zentrale Rolle im Metabolismus von Clostridien ein. Sie sind während des Gärungsstoffwechsels für die Umwandlung von Acetyl-CoA zu dem C<sub>4</sub>-Intermediat Butyryl-CoA, welches den Vorläufer von Butyrat und Butanol darstellt, verantwortlich. Ähnlich genetische Anordnungen konnten auch bei verwandten solventogenen und pathogenen Clostridien gefunden werden (Abb. 4.1). In *Clostridium beijerinckii* und *Clostridium kluyveri* ist ein als ‚Redox sensing transcriptional repressor Rex‘ annotiertes Gen ebenfalls stromaufwärts der Crotonase lokalisiert und im cellulolytischen Bakterium *Clostridium thermocellum* befindet sich der offene Leserahmen *rex* vor der bifunktionalen Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase. Der hohe Grad der Konserviertheit von Rex (84 bis 91 % Ähnlichkeit) und die Nähe zum *bcs*-Operon in vielen Clostridien unterstützt die Annahme eines funktionalen Zusammenhangs zwischen dem NAD(P)H verbrauchenden Butanol-Syntheseweg und dem Potenzial eines Redoxsensors. „BLAST“-Analysen zeigten zudem, dass das abgeleitete Polypeptid von *CAC2713* aus *C. acetobutylicum* bis zu 56 % Sequenzhomologien zu bereits beschriebenen Redoxregulatoren aus *B. subtilis* (Wang *et al.*, 2008), *S. coelicolor* (Brekasis und Paget, 2003) und *S. aureus* (Pagels *et al.*, 2010) aufweist (Tab. 3.1). Weiterhin zeigten Arbeiten zur Röntgenkristallstruktur von Rex aus *T. aquaticus* und *B. subtilis*, dass der Repressor als Homodimer vorliegt und durch eine Interaktion von α-Helices am C-Terminus stabilisiert wird (Sickmier *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; 2011).



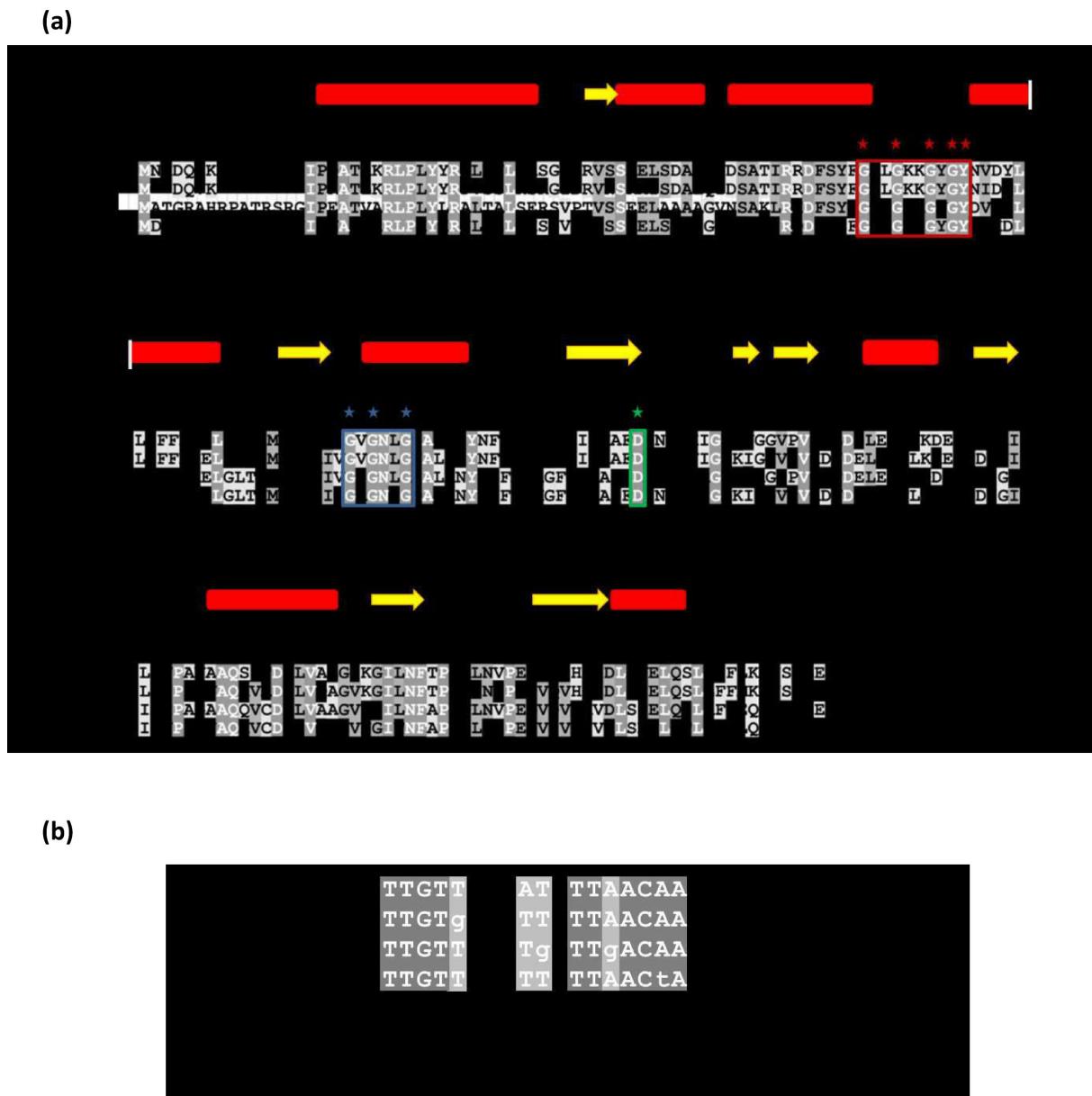
**Abb. 4.1:** Schematische Organisation von *rex* und dazugehörige Orthologe aus verschiedenen Organismen. Zueinander gehörende Orthologe sind farblich (rot [Orthologe von *rex*]) hinterlegt. Weitere Gene in putativen Operonstrukturen sind grau und Gene außerhalb der Operonstruktur weiß hinterlegt.

Jedes Monomer besteht dabei aus zwei funktionellen Regionen, der N-terminalen DNA-Bindedomäne (Lesk, 1995) und der C-terminalen NAD(H)-Bindedomäne mit charakteristischer Rossmannfaltung (Gajiwala und Burley, 2000). Die DNA-Bindedomäne ist ein klassisches ‚Helix turn helix‘-(HTH)-Motiv (‘Wing segment’) aus vier gebündelten Helices und umfasst die Aminosäuren 1 bis 85 (Brekasis und Paget, 2003; Sickmier et al., 2005; Wang et al., 2008). Anhand computergestützter Analysen der Sekundärstruktur (McGuffin et al., 2000) des Rex-Proteins aus *C. acetobutylicum* konnte auch hier am N-Terminus (As 1 bis 79) ein HTH-Motiv gefunden werden (Abb. 4.2 a). Der C-terminale Bereich von Rex-Proteinen weist eine typische ‚Rossmann fold‘-Struktur auf, wie sie häufig in Dinukleotid-abhängigen Dehydrogenasen, wie der Alkohol- und Laktat-Dehydrogenase, zu finden sind (Lesk, 1995; Rossmann et al., 1975). Eine entscheidende Rolle in der Rossmannfaltung kommt einem Glycin reichen Motiv (GXGXXG) zu.

Das erste und das dritte Glycin des GXGXXG-Motivs sind dabei an der Strukturgebung beteiligt und das zentrale Glycin ist für den Kontakt zwischen der Hauptkette und dem Pyrophosphat der Dinukleotide verantwortlich (Brekasis und Paget, 2003; Lesk, 1995). Auch dieses konservierte Motiv (GXGXXG) konnte durch ‚Blast‘-Analysen in der Rex-Aminosäuresequenz (As 93 bis 97) aus *C. acetobutylicum* identifiziert werden (Abb. 4.2 a). Zudem untermauert die Existenz der hoch konservierten Aminosäure Aspartat (Asp117) in der C-terminalen Region die Bindung von NAD(H) durch die ‚Rossmann fold‘-Domäne (Abb. 4.2 a). Das Aspartat tritt 20 Aminosäurereste nach dem GXGXXG-Motiv auf und bildet Wasserstoffbrücken zu der Ribose im Adenosin von NAD(P)H aus (Lesk, 1995). Außerdem ist das Aspartat während der Dinukleotid-Protein-Bindung vermutlich für die Unterscheidung zwischen NAD(H) und NADP(H) verantwortlich (Brekasis und Paget, 2003; Lesk, 1995; Sickmier et al., 2005).

Die Bindung von Rex an DNA erfolgt an sogenannte Rex-Boxen. Dies sind relativ konservierte ‚Inverted repeat‘-(IR)-Sequenzen, die zuerst in der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) des *cydABCD*-Operons in *S. coelicolor* identifiziert wurden (Brekasis und Paget, 2003). Homologe Rex-Boxen wurden auch in anderen fakultativ anaeroben Bakterien wie *B. subtilis* und *S. aureus* gefunden (Pagels et al., 2010; Wang et al., 2008). Die Bindung zwischen Rex und Rex-Boxen ist hoch spezifisch. Einzelne Basenpaarsubstitutionen in den distalen Regionen des IRs oder Basenpaardeletionen bzw. -insertionen in der Region zwischen den IRs führen zu einer stark verminderten Bindung bis zum vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit von Rex an die DNA (Pagels et al., 2010; Pei et al., 2011). In *B. subtilis* reprimiert Rex die Transkription von Genen, welche an der Fermentation unter anaeroben Bedingungen beteiligt sind, durch die Bindung an 20 Bp lange Sequenzen in deren Promotorregionen (Wang et al., 2008). Basierend auf der Konsensus-Sequenz der Rex-Boxen aus *B. subtilis* und *S. aureus* konnte auch während dieser Arbeit ein Rex-Bindemotiv in der 5'UTR des *bcs*-Operons in *C. acetobutylicum* aufgedeckt werden. Eine genomweite Suche (Münch et al., 2003) nach weiteren Rex-Sequenzmotiven in Promotorregionen von *C. acetobutylicum* ergab, dass putative Rex-Boxen vor 72 Genen in einem Bereich von 350 Bp stromaufwärts des jeweiligen Startcodons liegen. Ein Sequenzvergleich der vorhergesagten Rex-Boxen ergibt eine 18 Bp lange putative Rex-Konsensus-Sequenz (5'-TTGTTwwwTTwTTAACAA-3') in *C. acetobutylicum* (Abb. 4.2 b).

Zu den Genen mit potentiellen Rex-Boxen im Promotorbereich gehörten neben dem Crotonase-Gen auch die Leserahmen der Acetyl-CoA Acetyltransferase (Thiolase), der L-Laktat-Dehydrogenase sowie der auf dem Megaplasmid pSOL1 befindlichen Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2. Diese Gene sind von besonderem Interesse, da sie zum einen an der Bildung von Stoffwechselprodukten beteiligt sind und zum anderen über ihre Regulation auf genetischer Ebene wenig bekannt ist.



**Abb. 4.2:** Alignment der Rex-Aminosäuresequenz verschiedener Gram-positiver Organismen und Rex-Boxen vor verschiedenen Genen aus *C. acetobutylicum*. (a) Identische Aminosäuresequenzen sind hellgrau hinterlegt. Dunkelgraue Boxen zeigen drei Sequenzhomologien zwischen den Organismen. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren im Protein an. Die Alignments wurden mittels CLUSTEL W (Cummings et al., 2002) durchgeführt. Das putative HTH-Motiv ist durch gestrichelte Pfeile dargestellt und die wichtigen As sind rot hinterlegt. Das konservierte GXGXXG-Motiv ist blau und die konservierte Aminosäure Aspartat grün eingeklammert. Die putative Sekundärstrukturvorhersage von Rex erfolgte mittels PSIPRED-Software (McGuffin et al., 2000) und ist durch rote Boxen (Helices) und gelbe Pfeile ( $\beta$ -Faltblatt) dargestellt. Rex\_Bsu, *B. subtilis*; Rex\_Sau, *S. aureus*; Rex\_Sco, *S. coelicolor*; Rex\_Cac, *C. acetobutylicum*. (b) Alignment putativer Rex-Boxen ausgewählter Gene aus *C. acetobutylicum* und Ableitung eines allgemeinen Rex-Bindemotivs. Variierende Basen sind durch kleine Buchstaben dargestellt. Die 18 Bp palindromische Konsensus-Sequenz wird durch Pfeile angegeben. crt, Crotonase; thl, Thiolase (CAC2873); adhE2, Alkohol-Dehydrogenase 2 (CAP0035); ldh, L-Laktat-Dehydrogenase (CAC0267).

#### 4.1.2 Promotor-Bindungsstudien *in vitro*

Um einen direkten Einfluss des Repressors Rex auf die Genexpression der oben erwähnten Gene näher zu beleuchten, war zunächst der Nachweis einer möglichen DNA-Bindeaktivität an die putativen Rex-Boxen notwendig. Für die *in vitro* durchgeführten Promotor-Bindungsstudien wurde ein heterolog exprimiertes Rex-Protein verwendet. Da die heterologe Expression von Rex aus *T. aquaticus* auf eine Ko-Aufreinigung von NAD(P)H hinwies (Sickmier *et al.*, 2005), sollte anschließend eine Bestimmung des Absorptionsspektrums eine mögliche Bindung von NAD(P)H an das aufgereinigte Rex-Protein ausschließen. Es konnte kein Peak bei 340 nm, welcher charakteristisch für NAD(P)H ist, detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die ‚Electrophoretic mobility shift assays‘ (EMSA) wurden PCR-generierte DNA-Fragmente, die das putative Sequenzmotiv 5'-TTGTTwwwTTwTTAACAA-3' der Rex-Box enthielten, erzeugt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine spezifische Bindung von Rex an die 5'UTR der Gene der Crotonase, der Thiolase, der Laktat-Dehydrogenase und der Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 nachgewiesen werden. Hier führte die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Rex-Proteins spezifisch zu einem verlangsamten elektrophoretischen Laufverhalten der entsprechenden Promotorfragmente. Diese Daten unterstützen die theoretischen Befunde auf experimenteller Ebene. Da spekuliert wurde, dass die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd) eventuell nicht Teil des *bcs*-Operons sondern monocistronisch kodiert ist (Boynton *et al.*, 1996; Lehmann und Lütke-Eversloh, 2011), wurde zudem die Bindung von Rex an die 5'UTR des *hbd*-Gens untersucht. Es konnte kein ‚Gelshift‘ gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass eine Bindung des Repressors an den Promotorbereich stromaufwärts der Crotonase die Transkription aller im *bcs*-Operon enthaltenen Gene, inklusive *hdb*, reguliert.

In *S. coelicolor* konnte zudem gezeigt werden, dass Rex in der Lage ist, die eigene Transkription durch Bindung an den Promotor des *rex*-Gens zu regulieren (Brekasis und Paget, 2003). Dies konnte für Rex von *C. acetobutylicum* nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass vor dem Rex kodierenden Gen (CAC2713) kein Bindemotiv gefunden wurde und EMSAs unter Verwendung der Rex-Promotorsequenz (264 Bp stromaufwärts vom ATG) keinen detektierbaren ‚Gelshift‘ zeigten, lässt vermuten, dass die Rex-Expression in *C. acetobutylicum* nicht autoreguliert ist. Dies wurde auch für das Rex-Protein aus *S. aureus* gezeigt. Auch hier ist Rex nicht in der Lage, an die eigene Promotorregion zu binden (Pagels *et al.*, 2010).

In vielen aeroben Gram-positiven Bakterien inhibiert der Repressor Rex Gene, die eine entscheidende Rolle während des fermentativen Metabolismus und des Wachstums unter O<sub>2</sub>-limitierten Bedingungen spielen. In *B. subtilis* ist Rex unter anderem an der Induktion des *cydABCD*-Operons, der NADH-Dehydrogenase und der NADH-abhängigen Laktat-Dehydrogenase

beteiligt (Gyan *et al.*, 2006). Die Gene des *cydABCD*-Operons kodieren neben einem ABC-Transporter (*cydCD*) für Untereinheiten eines alternativen Cytochrom-*bd*-Oxidase-Komplexes (*cydAB*), welcher eine höhere Affinität zu Sauerstoff besitzt (Bentley *et al.*, 2002). Unter mikroaeroben Bedingungen kann Sauerstoff so effizienter genutzt und das überschüssige NADH durch die Bildung von Laktat recycelt werden. Dabei wird die Bindung von Rex an die DNA spezifisch durch den Elektronenfluss der Atmungskette und der damit verbundenen intrazellulären NADH- und NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen reguliert (Brekasis und Paget, 2003). Ist das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis gering, reprimiert Rex durch die DNA-Bindung die Genexpression. Steigt jedoch der intrazelluläre NADH/NAD<sup>+</sup>-Ratio aufgrund von veränderten Umweltbedingungen oder Stoffwechselaktivitäten, führt dies zu einer Dissoziation des Repressors von der Rex-Box (Brekasis und Paget, 2003). Die Sensoraktivität von Rex beruht auf der Fähigkeit, NADH oder NAD<sup>+</sup> über die Dinukleotid-Bindetasche zu binden (McLaughlin *et al.*, 2010; Sickmier *et al.*, 2005; Wood und Storz, 2005). Der Mechanismus der DNA-Bindung von Rex und der Einfluss von NADH und NAD<sup>+</sup> wurde bereits in *T. aquaticus* und *B. subtilis* untersucht (Sickmier *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Demnach konkurrieren NADH und NAD<sup>+</sup> um die Bindung an Rex. Rex aus *B. subtilis* besitzt eine deutlich höhere Affinität zu NADH (bis zu 20.000-fach höher) als zum oxidierten Dinukleotid NAD<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2008). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass obwohl die NAD<sup>+</sup>-Bindung von Rex nicht favorisiert wird, diese jedoch einen positiven allosterischen Effekt ausübt und zu einer Konformationsänderung der hydrophoben Nicotinamid-Bindetasche von Rex führt, was die DNA-Bindung begünstigt. Im Gegensatz dazu existiert ein negativ allosterischer Effekt zwischen NADH- und DNA-Bindung (Wang *et al.*, 2008). So führt die Bindung des reduzierten Dinukleotids zu einer sehr stabilen und verschlossenen Rex-Proteinstruktur, in der das Protein unfähig ist, an die DNA zu binden (Sickmier *et al.*, 2005). Zudem wurde spekuliert, dass eine alleinige Rex-DNA-Bindung die Bindung von NADH an die Nicotinamid-Bindetasche beeinflusst. Daraus resultierend stellt die vorherige Bindung von NAD(P)<sup>+</sup> einen entscheidenden Zwischenschritt im Dissoziationsmechanismus von Rex dar (McLaughlin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008).

Wie bereits beschrieben, konnte in der C-terminalen Proteinsequenz von Rex aus *C. acetobutylicum* ebenfalls die konservierte NAD(H)-Bindedomäne gefunden werden. Um nun zu untersuchen, ob Rex zum einen in der Lage ist, die Dinukleotide NADH und NAD<sup>+</sup> zu binden und zum anderen, ob diese Interaktion einen Einfluss auf die DNA-Bindung hat, wurden weitere EMSAs unter Verwendung der *adhE2*- und *crt*-Promotorfragmente durchgeführt. Dazu wurde erneut das heterolog exprimierte Rex-Protein genutzt und den Ansätzen unterschiedliche Konzentrationen an NAD<sup>+</sup> und NADH zugegeben. Die Zugabe steigender NADH-Konzentrationen (1 bis 5 mM) verhinderte die Ausbildung eines Rex-DNA-Komplexes, was für eine Dissoziation des Repressors von der DNA spricht. Demzufolge wird *in vitro* für den Repressor Rex aus

*C. acetobutylicum* kein NAD<sup>+</sup> benötigt, um einen Rex-DNA-Komplex auszubilden. Dennoch führte eine im Vergleich zur NADH-Konzentration fünffach höhere Konzentration an NAD<sup>+</sup> erneut zu einem verlangsamten Laufverhalten und es war ein ‚Gelshift‘ detektierbar. Das oxidierte Dinukleotid NAD<sup>+</sup> besitzt zwar im Vergleich zu NADH eine geringere Bindungsaffinität zu Rex, kann aber bei deutlich höheren Konzentrationen NADH aus der Bindetasche verdrängen (Pagels *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

Diese Ergebnisse weisen auf eine spezifische Kontrolle der Expression der untersuchten Gene durch Rex als Antwort auf Veränderungen der internen Redoxverhältnisse hin. Die beschriebenen *in silico*- und *in vitro*-Analysen deuten darauf hin, dass Rex auch eine Regulator- und Sensorfunktion im Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* zukommt (Abb. 4.4).

## 4.2 Wachstumsphysiologie einer *rex*-negativen Mutante

### 4.2.1 Mutantenerzeugung und Komplementation

Es sollte zudem auch *in vivo* der physiologische Nachweis der Funktion von Rex erbracht werden. Dafür ist es gängig, einen Stamm zu erzeugen, der eine Defektmutation des entsprechenden Gens trägt. Durch die Inaktivierung des Gens für das zu untersuchende Protein können die Auswirkungen auf den Organismus beobachtet werden. Eine geeignete Methodik, um Geninaktivierungen durchzuführen, wird durch das ClosTron® System zur Verfügung gestellt (Heap *et al.*, 2007; 2010). Dabei erfolgt die Inaktivierung des Zielgens durch die Insertion eines spezifisch angepassten Gruppe II Introns (ClosTron) in die kodierende Sequenz. Gleichzeitig wird während dieser Prozedur ein ‚Retrotransposition activated marker (RAM)‘ übertragen und aktiviert, was eine Selektion auf potentielle Integranten ermöglicht (Karberg *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2003). Außerdem ist von Vorteil, dass diese Methode als extrem effizient, schnell und mit geringem Aufwand für den Experimentator beschrieben wurde (Lehmann, 2012; Kühne *et al.*, 2011).

Nach einer genspezifischen Anpassung an den offenen Leserahmen CAC2713 (*rex*) erfolgte die Insertion des ClosTrons in *C. acetobutylicum*. Interessanterweise konnte durch mehrfach unabhängig voneinander durchgeführte Insertionen eine hohe Insertionseffizienz (83 bis 100%) im Vergleich zu der bisher für *C. acetobutylicum* beschriebenen Effizienz (2,5 bis 57,1 %) ermittelt werden (Heap *et al.*, 2010; Lehmann, 2012). Derartig effiziente Insertionen wurden zudem für *Escherichia coli* und *Lactococcus lactis* bestimmt (Zhong *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). So wurde im Rahmen dieser Arbeit der Stamm *C. acetobutylicum rex::int(95)* erzeugt und genotypisch verifiziert. Abschließend sollte eine Komplementation bestätigen, dass einzig die Insertion in *rex* (CAC2713) den veränderten Phänotyp bedingt. Es können so eventuelle polare Effekte auf dem

Chromosom oder Punktmutationen (Brüggemann und Gottschalk, 2009), die möglicherweise durch die ClosTron® Mutagenese auftraten, ausgeschlossen werden. Die Plasmid gestützte Proteinexpression von Rex in *C. acetobutylicum rex::int(95)* konnte fast vollständig den Phänotyp der Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation des Wildtypstamms wiederherstellen. Die Ergebnisse der physiologischen Charakterisierung der Rex-Insertionsmutante hinsichtlich der Transkriptionsregulation und des Einflusses auf den Gärungsstoffwechsel werden in den folgenden Unterpunkten diskutiert.

#### 4.2.2 Wachstum unter statischen Kulturbedingungen

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rex aus *C. acetobutylicum* ein Transkriptionsrepressor von Biosynthesegenen zur Butyryl-CoA-, Laktat- und Alkoholbildung in Abhängigkeit von NAD(P)H darstellt. Daher war zu erwarten, dass die Abwesenheit des Repressors zu einem veränderten Produktspektrum durch eine verstärkte, möglicherweise konstitutive Expression der Zielgene führt. Wachstumsphysiologische Untersuchungen unter statischen Kulturbedingungen ergaben kein verändertes Wachstum der Rex-Defektmutante im Vergleich zum Wildtyp. Rex ist daher offenbar für das Wachstum von *C. acetobutylicum* nicht essentiell. Dennoch konnte tatsächlich ein veränderter Phänotyp der Rex-Defektmutante hinsichtlich der Stoffwechselproduksynthese beobachtet werden. Die Analyse der Gärungsprodukte ergab, dass die Inaktivierung von Rex zu einer verstärkten Ethanol- sowie früher einsetzenden Butanolbiosynthese bei gleichzeitig verringriger Acetonproduktion führte. Dieser Phänotyp ist mit einem in der Literatur als „Alkohogenese“ beschriebenen Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* vergleichbar (Datta und Zeikus, 1985; Girbal und Soucaille, 1994; Hönicke *et al.*, 2012; Peguin *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994). So kommt es beispielsweise in Gegenwart der künstlichen Elektronenakzeptor Methylviologen (MV) oder Neutralrot aber auch unter Verwendung von Substratgemischen aus Glycerin und Glukose zu einer dominanten Alkoholbiosynthese verbunden mit einer deutlich vermindernden Bildung an Aceton.

Während der Säurephase zeigte der *rex*-negative Stamm eine reduzierte Butyratbildung (bis zu 74 %), jedoch keine abweichende Biosynthese und Reassimilation von Acetat sowie keine erhöhte Produktion von Laktat. Die unveränderte Laktatbildung entsprach nicht den Erwartungen, da Rex nachgewiesenermaßen an den Promotorbereich des ORFs der L-Laktat-Dehydrogenase (*CAC0267*) binden kann. Möglicherweise ist dies auf eine Regulation auf enzymatischer Ebene zurückzuführen. Freier und Gottschalk (1987) beschrieben, dass die LDH aus *C. acetobutylicum* pH-sensitiv ist und das pH-Optimum bei 5,8 liegt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Laktat-Dehydrogenase ab einem pH unter 5 inaktiv ist (Freier und Gottschalk,

1987). Unter Einfluss von Methylviologen, bei Begasung der Kulturen von *C. acetobutylicum* mit Kohlenstoffmonoxid oder unter Sulfatlimitierung konnte lediglich bei hohen pH-Werten (> 5) eine Laktatbildung beobachtet werden (Bahl und Gottschalk, 1984; Meyer *et al.*, 1986; Peguin *et al.*, 1994; Peguin und Soucaille, 1996). Bei den in dieser Arbeit durchgeföhrten Wachstumsuntersuchungen lag der pH-Wert stets unter 5.

Interessanterweise zeigt die Rex-Defektmutante bereits mit Beginn des exponentiellen Wachstums eine signifikant erhöhte Ethanolbildung. Verglichen mit den Alkoholkonzentrationen im Kulturüberstand des Wildtypstammes wurde in der frühen stationären Wachstumsphase (etwa 60 h) der Mutante eine um 85 % erhöhte Ethanol- und um 40 % gesteigerte Butanolkonzentration detektiert. Bis zu diesem Zeitpunkt des Wachstums wurde hinsichtlich der Acetonproduktion kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt. Mit weiterem Wachstum stagnierte die Acetonsynthese in der Kultur von *C. acetobutylicum rex::int(95)* und am Ende der ‚Batch‘-Fermentation war eine um 50 % geringere Konzentration von Aceton detektierbar als in Wildtypkulturen. Nach 180 h Kultivierung unter statischen Bedingungen in Minimalmedium zeigte *C. acetobutylicum* ATCC 824 ein Alkohol:Aceton-(BE:A)-Verhältnis von 2,3:1. Für die *rex*-negative Mutante hingegen konnten reproduzierbar gesteigerte Alkoholausbeuten ermittelt werden, was sich auch im BE:A-Verhältnis von 8,2:1 widerspiegelte. Auffällig war dennoch, dass im Gegensatz zum steigenden Gehalt an Ethanol die Butanolbildung in *C. acetobutylicum rex::int(95)* nach einem frühzeitigen Anstieg gleiche Endkonzentrationen (~ 175 mM) wie *C. acetobutylicum* ATCC 824 aufwies. Dies kann darauf zurückzuföhren sein, dass Butanol ab einer gewissen Menge eine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum besitzt. Butanol führt zur Zerstörung der Cytoplasmamembran, was einen negativen Effekt auf den pH-Gradienten und der damit verbundenen Protonenmotorischen Kraft (PMF) ausübt (Ezeji *et al.*, 2010). So werden für Clostridien Konzentrationen von über 14 g/l (etwa 190 mM) an Butanol als hemmend angegeben (Mann *et al.*, 2012; Qunine *et al.*, 1985). Bei Ethanol hingegen führen erst höhere Konzentrationen über 60 g/l (etwa 1200 mM) zu einer vollständigen Wachstumshemmung (Hermann *et al.*, 1985).

Um außerdem zu überprüfen, ob die erhöhten Ethanol- und Butanoltitr. aus redox-stöchiometrischer Sicht mit der Wasserstoffproduktion als konkurrierenden Elektronen verbrauchenden Stoffwechselweg übereinstimmen, wurde eine Messung der wachstumsbedingten Gasbildung ( $H_2$  und  $CO_2$ ) durchgeföhr. Besonders auffällig war die um 66 % verminderte Produktion von  $H_2$  der Rex-Insertionsmutante. Neben der drastisch reduzierten  $H_2$ -Bildung konnte zudem eine um 18 % verringerte  $CO_2$ -Produktion ermittelt werden, welche auf die geringere Biosynthese von Aceton zurückzuföhren ist. Die Korrelation einer hohen Ethanolproduktion mit einer Reduzierung der Wasserstoffbildung wurde auch für eine

Hbd-Defektmutante von *C. acetobutylicum* und dem Stamm *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2 publiziert (Lehmann und Lütke-Eversloh, 2011; Shaw *et al.*, 2008). Außerdem kann erneut eine Verbindung zur Alkohogenese geknüpft werden. Neben der vorrangigen Produktion von Ethanol und Butanol ist eine verminderte Gasproduktion ein weiteres Charakteristikum Alkohol bildender Kulturen von *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 1995; Hönicke *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 1994).

#### 4.2.3 Wachstum unter kontinuierlichen Kulturbedingungen

Die kontinuierliche Kulturführung bietet im Gegensatz zur statischen Kulturführung die Möglichkeit, einzelne Parameter exakt kontrollieren zu können. Aufgrund der hohen Stabilität und Reproduzierbarkeit der zu untersuchenden Zellproben aus Chemostat-Kulturen sowie der Möglichkeit der Änderung eines einzelnen Umweltparameters sind kontinuierliche Kulturen ein adäquates System zur Analyse der Stoffwechselendproduktbiosynthese. Daher wurde das Wachstum der Mutante *C. acetobutylicum rex::int(95)* in kontinuierlichen phosphatlimitierten Kulturen untersucht. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass unter den gewählten Kulturbedingungen über den pH-Wert die Produktbildung von *C. acetobutylicum* gesteuert werden kann. Kulturen mit pH-Werten über 5 befinden sich hierbei in der Säurephase, Kulturen mit pH-Werten unter 5 in der Lösungsmittelphase (Bahl *et al.*, 1982 b; Fiedler, 2006; Girbal *et al.*, 1994; Janssen *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 1994). Da es in Vorversuchen nicht möglich war ein Fließgleichgewicht (‘Steady state’) in Chemostat-Kulturen der Rex-Insertionsmutante bei einem pH 5,7 zu erreichen, wurde zur Etablierung der Säurephase ein pH-Wert von 6,5 genutzt. Nach dem Erreichen des ‘Steady state’-Wachstums bei einem pH von 6,5 zeigte der *rex*-negative Stamm ebenfalls die für den Wildtyp charakteristische Säurebildung (Bahl *et al.*, 1983). Während die Butyratproduktion der des Wildtyps entsprach, erreichte die Rex-Defektmutante geringere Acetatkonzentrationen als der Parentalstamm. Neben den Säuren produzierte die *rex*-negative Mutante auch bei pH 6,5 die Alkohole Ethanol und Butanol (etwa 20 mM). Dies deckte sich mit den bereits in ‘Batch’-Kultur erzielten Ergebnissen. *C. acetobutylicum* ATCC 824 zeigt hingegen erst bei pH-Werten unter 5 eine deutliche Lösungsmittelbildung (Bahl *et al.*, 1981; Janssen *et al.*, 2010).

Im Anschluss an die Acidogenese erfolgte der Wechsel zur Solventogenese durch das schrittweise Absenken des pH-Wertes auf 4,5. Im Chemostat bildet der Wildtyp bei pH 4,5 die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol in einem Verhältnis von 3:6:1. Einhergehend mit der Initiation der Lösungsmittelphase war in *C. acetobutylicum* ATCC 824 stets ein kurzfristiger Einbruch der optischen Dichte erkennbar, welche nach einer Regenerationsphase der Zellen wieder anstieg (Janssen *et al.*, 2010). Die Rex-Insertionsmutante zeigte ebenfalls einen Einbruch der OD<sub>600nm</sub>

während der Senkung des pH-Wertes, jedoch ohne anschließende Regeneration der Kultur. So konnte innerhalb dieser Arbeit kein stabiles Fließgleichgewicht von *C. acetobutylicum rex::int(95)* bei einem pH von 4,5 erreicht werden.

Eine Ursache dafür könnte die Zerstörung des essentiellen Protonengradienten der Membran sein, was zu einer Hemmung des Wachstums und der Nährstoffaufnahme führt (Ezeji *et al.*, 2010). In Säure bildenden Clostridien ist der interne pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ) etwa eine Stufe höher als der externe pH-Wert ( $\text{pH}_e$ ) (Gottwald und Gottschalk, 1985; Huang *et al.*, 1985; Monot *et al.*, 1984). Girbal *et al.* (1994) berichteten, dass Protonen aus dem Cytoplasma während der Acidogenese von *C. acetobutylicum* neben der Protonentranslokation durch die ATPase mit Hilfe der Hydrogenase durch die Synthese von Wasserstoff beseitigt werden und dies den Protonengradienten aufrechterhält. Unter „normalen“ Säurephasebedingungen ergibt sich dadurch ein positiver  $\Delta\text{pH}$  ( $\text{pH}_i - \text{pH}_e$ ). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter alkohologenen Bedingungen, dass der interne pH-Wert absinkt und es wurde somit ein negativer  $\Delta\text{pH}$  bestimmt (Girbal *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994). Zudem übt das Einströmen von undissoziierten Säuren in Folge der pH-Senkung einen negativen Effekt auf den internen pH-Wert aus. Aufgrund von Veränderungen des Dissoziationsgleichgewichts zugunsten der undissoziierten Säuren können diese dann als ungeladene Substanzen frei über die Zellmembran diffundieren. Innerhalb der Zelle werden die einströmenden undissoziierten Säuren sofort wieder in ihre dissozierte Form umgewandelt (Ezeji *et al.*, 2010). Dies führt zu einer Gleichgewichtsverschiebung der Protonenkonzentration und daraus resultierend ebenfalls zu einem sinkenden internen pH und einem veränderten Membranpotential (Terraciano und Kashket, 1986). Eine zu starke Absenkung des intrazellulären pH-Wertes kann zahlreiche Stoffwechselaktivitäten inhibieren (Andersch *et al.*, 1983; Hartmanis und Gatenbeck, 1984). Diese Ergebnisse würden erklären, warum eine Kultivierung von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Chemostat bei einem pH-Wert von unter 5 nicht möglich war. Angenommen, der interne pH ist auch in der Rex-Defektmutante geringer, so könnte der postulierte Schwellenwert des  $\text{pH}_i$  von 5,5 (Gottwald und Gottschalk, 1985) bereits unterschritten sein. Es kommt zum Zelltod, was sich im Einbruch der optischen Dichte widerspiegelt. Allerdings bleibt ungeklärt, ob diese Faktoren das Wachstum der Rex-Defektmutante unter den hier gewählten Wachstumsbedingungen beeinflussen. Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass die Kulturführung unter phosphatlimitierten Bedingungen nicht optimal für *C. acetobutylicum rex::int(95)* ist und so weitere regulatorische Prozesse nicht ablaufen können.

Da sich die kontinuierliche Kultivierung aufgrund der stabilen Proben-Reproduzierbarkeit jedoch sehr gut zur Untersuchung des Transkriptoms und Proteoms eignet, sollte zukünftig das Wachstum von *C. acetobutylicum rex::int(95)* in Chemostat-Kulturen weiter verfolgt werden.

#### 4.2.4 Rex-regulierte Gene und Enzyme

Wie bereits dargelegt, wird das Rex-Protein aus aeroben Bakterien als Transkriptionsregulator beschrieben, der in Abhängigkeit der internen Redoxverhältnisse die Genexpression reprimiert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des *rex*-Gens eine Induktion des sogenannten Rex-Regulons in *S. aureus* vermittelte (Hecker *et al.*, 2009; Pagels *et al.*, 2010). Um zu erklären, wie die Inaktivierung von *rex* den veränderten Phänotyp in *C. acetobutylicum* bedingt, wurden Charakterisierungen auf molekularer Ebene durchgeführt. Während dieser Arbeit erfolgten Transkriptionsanalysen sowie Messungen der Enzymaktivitäten der Thiolase (*thlA*) und Crotonase (*crt*) aber auch der Alkohol-Dehydrogenase 2 (*adhE2*) in Wildtyp und Mutante, da diese Gene wahrscheinlich durch den Repressor Rex reguliert werden und für den Stoffwechsel relevante Enzyme kodieren.

Die Thiolase katalysiert die Kondensation von zwei Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA und stellt ein Schlüsselenzym vom C<sub>2</sub>- zum C<sub>4</sub>-Stoffwechsel dar. *C. acetobutylicum* besitzt zwei für Thiolasen kodierende Gene, *thlA* (CAC2873) und *thlB* (CAP0078), wobei nur *thlA* eine physiologisch bedeutende Funktion in der Säurephase und Lösungsmittelphase zugeordnet wurde (Grimmler *et al.*, 2011; Winzer *et al.*, 2000). Neben dem *thlA*-Gen kodieren die Gene des *bcs*-Operons (*crt*, *bcd*, *etfA*, *etfB*, *hbd*) auch für Enzyme des zentralen Metabolismus. Durch ihre katalytische Aktivität wird das gebildete Acetacetyl-CoA über 3-Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA umgesetzt und steht für die Biosynthese von Butyrat bzw. Butanol zur Verfügung (Abb. 1.2, 4.4). Für die untersuchten Gene CAC2873 (*thlA*) und CAC2712 (*crt*) wurde eine hohe Transkriptmenge in der Mutante *rex::int(95)* nachgewiesen, während für den Parentalstamm keine Expressionssignale detektiert werden konnten. Außerdem entsprach die Signalgröße des innerhalb dieser Arbeit untersuchten ORFs der Crotonase der theoretischen Größe des *bcs*-Operons. Es kann somit angenommen werden, dass auch die Transkription der weiteren Gene (*bcd*, *etfA*, *etfB*, *hbd*) des Operons in *C. acetobutylicum rex::int(95)* induziert ist. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Resultaten alkohologener Kulturen (Girbal *et al.*, 1995). Unter Einfluss von Methylviologen wiesen sowohl das *thlA*-Gen als auch die Gene des *bcs*-Operons ein signifikant induziertes Expressionsverhalten auf (Hönigke *et al.*, 2012). Unter der Annahme, dass die beschriebene Genexpression gleichbleibend induziert im *rex*-negativen Stamm vorliegt, sollten auch auf Enzymebene Veränderungen zu beobachten sein. In *C. acetobutylicum rex::int(95)* konnte eine dreifach höhere Aktivität der Thiolase und Crotonase verglichen mit *C. acetobutylicum* ATCC 824 bestimmt werden. Eine zweifach gesteigerte Crt-Aktivität konnte ebenfalls gezeigt werden, wenn die Gene des *bcs*-Operons Plasmid basiert in *C. acetobutylicum* exprimiert wurden (Boynton *et al.*, 1996). Die Autoren beschrieben erwartungsgemäß ähnlich gestiegene enzymatische Aktivitäten der Hbd und Bcd. Diese

Beobachtungen lassen vermuten, dass aufgrund der Induktion der Genexpression des *bcs*-Operons auch die Aktivitäten der Hbd und Bcd in der Rex-Insertionsmutante erhöht sind. Offenbar wird so verstärkt Butyryl-CoA ausgehend von Acetyl-CoA gebildet, welches dann zu Butanol umgesetzt werden kann.

Der Stoffwechselfluss wird neben der Regulation auf Expressionsebene auch auf enzymatischer Ebene reguliert (Hartmanis und Gatenbeck, 1984; Wiesenborn *et al.*, 1988). So können Veränderungen der optimalen Reaktionsbedingungen und der intrazellulären Metabolite (Edukte wie Produkte) einen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzen. Obwohl die biochemische Reaktion der Thiolase thermodynamisch nicht favorisiert wird (Wiesenborn *et al.*, 1988), nimmt dieses Enzym eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel ein. Dennoch führte eine Überexpression der ThlA in *C. acetobutylicum* nicht zur Biosynthese von gesteigerten Alkoholtitern (Sillers *et al.*, 2008; 2009). Die Ursache dafür liegt in der Sensitivität der Thiolase gegenüber freiem Coenzym A. Denn bereits mikromolare Konzentrationen an CoA-SH können die *in vivo*-Aktivität der Thiolase maßgeblich hemmen (Gheshlaghi *et al.*, 2009; Hartmanis und Gatenbeck, 1984; Mann *et al.*, 2013; Wiesenborn *et al.*, 1988). Da zudem während der Lösungsmittelbildung die Thiolase und die Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase um die Verfügbarkeit von Acetyl-CoA konkurrieren, könnte bei verminderter Thl-Aktivität der Kohlenstofffluss auf die Ethanolproduktion ausgerichtet sein (Wiesenborn *et al.*, 1988).

Ethanol und Butanol werden durch die Umwandlung von Acetyl-CoA bzw. Butyryl-CoA in zwei reduktiven Schritten mittels Aldehyd- und Alkohol-Dehydrogenasen produziert. Unter „normalen“ Butanolsynthese-Bedingungen in *C. acetobutylicum* stellen die Gene der bifunktionalen Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 1 (*adhE1*) und der Butanol-Dehydrogenase B (*bdhB*) die hauptsächlichen Transkripte dar (Fischer *et al.*, 1993; Fontaine *et al.*, 2002; Gerischer und Dürre, 1992; Grimmer *et al.*, 2011; Sauer *et al.* 1995a/b; Walter *et al.* 1994). Dabei ist das *adhE1*-Gen gemeinsam mit den Untereinheiten der Acyl-CoA Transferase (*ctfA* und *ctfB*) im polycistronischen *sol*-Operon auf dem Megaplasmid pSOL1 lokalisiert (Fischer *et al.*, 1993). *C. acetobutylicum* besitzt außerdem eine zweite NADH-abhängige bifunktionale Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase, deren Gen (*adhE2*) ebenfalls auf dem Megaplasmid lokalisiert ist und monocistronisch transkribiert wird (Fontaine *et al.*, 2002; Nölling *et al.*, 2001). Analysen der Genexpression in Säure- und Lösungsmittelphase in kontinuierlichen Kulturen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 deckten auf, dass *adhE2* antagonistisch zum *sol*-Operon exprimiert wird (Fontaine *et al.*, 2002; Grimmer *et al.*, 2011; Janssen, 2010). So war in der acidogenen Wachstumsphase eine Transkription von *adhE2* detektierbar, während in der solventogenen Phase die Expression des *sol*-Operons induziert vorlag. Interessanterweise wurde in alkohologenen Kulturen nicht die Expression der Gene der Butanolbildung (*bdhA*, *bdhB*, *adhE1*) induziert (Girbal *et al.*, 1995),

sondern eine 100-fach gesteigerte Expression von *adhE2* beschrieben (Hönicke *et al.*, 2012). Auch in der Rex-Defektmutante konnte ein Anstieg der Expression des *adhE2*-Gens im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Da sich die Mutante *rex::int(95)* physiologisch durch eine hohe Ethanolbildung auszeichnet, wurden zudem Aktivitätsmessungen der Ethanol- und Butanol-Dehydrogenasen mit den Coenzymen NADH und NADPH durchgeführt. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)* detektiert werden. Während bei der Verwendung von NADPH weder bei der Ethanol- noch bei der Butanol-Dehydrogenase bedeutende Abweichungen detektierbar waren, konnte mit NADH eine 8-fache Aktivitätszunahme der Ethanol-Dehydrogenase und sogar eine 25-fache Steigerung der Butanol-Dehydrogenase-Aktivität in der Rex-Defektmutante festgestellt werden. Bereits in früheren Untersuchungen wurden AdhE1 und AdhE2 als Alkohol-Dehydrogenasen mit Aktivität für Butanol und Ethanol beschrieben (Dürre *et al.*, 1987; Fontaine *et al.*, 2002). Girbal *et al.* (1995) zeigten außerdem, dass während der Alkohologenese NADH und während der Solventogenese NADPH als Coenzym dient. Die Tatsache, dass die *rex*-negative Mutante eine stärkere Adh-Aktivität mit NADH als Cofaktor besitzt, untermauert demzufolge, dass nicht die NADPH-abhängige AdhE1, sondern die NADH-abhängige Dehydrogenase AdhE2 für die Alkoholbildung in *C. acetobutylicum rex::int(95)* verantwortlich ist. Dennoch scheint die AdhE1 für die Solventogenese essentiell zu sein, denn Inaktivierungen des *adhE1*-Gens führten zu einem Lösungsmittel-negativen Phänotyp in *C. acetobutylicum* (Cooksley *et al.*, 2012; Lehmann, 2012). Aber auch die Ethanolproduktion wird nicht nur auf genetischer Ebene via höherer Genexpressionen (Vasconcelos *et al.*, 1994), sondern ebenso auf Enzymebene reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die AdhE aus *T. ethanolicus* die höchste enzymatische Aktivität bei geringen pH-Werten (< 6,0) aufwies (Pei *et al.*, 2010). Es wurde festgestellt, dass die AdhE-Aktivität um 80 % verringert auftrat, wenn die biochemische Reaktion bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt wurde.

So zeichnet sich fast vollständig das Bild eines „klassischen“ Transkriptionsrepressors, der in Abhängigkeit der intrazellulären Redoxverhältnisse die Genexpression reguliert und so die Produktbildung, speziell die Alkoholbiosynthese, kontrolliert (Abb. 4.4). Gleichzeitig werden die erzielten Ergebnisse der Promotor-Bindungsstudien (*in vitro*) verifiziert. Um weitere Gene eines putativen Rex-Regulons zu identifizieren, sollten zukünftig globale Expressionsanalysen von *C. acetobutylicum rex::int(95)* im Vergleich zum Parentalstamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 durchgeführt werden. Weiterhin könnte zudem eine putative Funktion als Transkriptionsaktivator, der in Gegenwart von NAD(P)H die Genexpression induziert, untersucht werden.

### 4.3 Einfluss von Rex auf die Redoxhomöostase

Die Regulation des Kohlenstoff- und Elektronenflusses ist neben der Genexpression und Enzymaktivität außerdem von der Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase abhängig. Dabei wird der Redoxstatus der Zelle durch das NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis reflektiert, welcher durch die verfügbaren Elektronenakzeptoren beeinflusst wird (DeGraef *et al.*, 1999).

In Anbetracht der Tatsache, dass sich *C. acetobutylicum rex::int(95)* physiologisch neben der signifikant erhöhten Ethanol- sowie Butanol-Dehydrogenase-Aktivität auch durch eine verminderte Aceton-, Säure- und Wasserstoffproduktion auszeichnet, lässt vermuten, dass die Inaktivierung von Rex zu Veränderungen der intrazellulären Redoxbedingungen geführt hat. Zudem konnte in Kultivierungsexperimenten gezeigt werden, dass ein Anstieg der Alkoholkonzentrationen mit steigenden NADH-Konzentrationen in der Zelle assoziiert war (Girbal *et al.*, 1994, 1995; Grupe und Gottschalk, 1992; Meyer und Papoutsakis, 1989; Vasconcelos *et al.*, 1994). Um zu überprüfen, ob die Alkoholbildung der Rex-Insertionsmutante tatsächlich veränderte NAD(P)H- und NAD(P)<sup>+</sup>-Level bedingt, wurden die intrazellulären Nukleotidkonzentrationen bestimmt. In *C. acetobutylicum rex::int(95)* und *C. acetobutylicum* ATCC 824 wurde eine höhere NADH-Konzentration in der Säurephase im Vergleich zur Lösungsmittelphase gemessen. Gleichermaßen konnte für die Konzentrationen von ATP detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Daten überein (Amador-Noguez *et al.*, 2011; Girbal und Soucaille, 1994; Grupe und Gottschalk, 1992; Rao und Mutharasan, 1989). Darüber hinaus konnte in der Rex-Insertionsmutante ein um 25 % erhöhtes NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis in der Säurephase und sogar ein um 50 % gestiegenes NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis in der Lösungsmittelphase bestimmt werden.

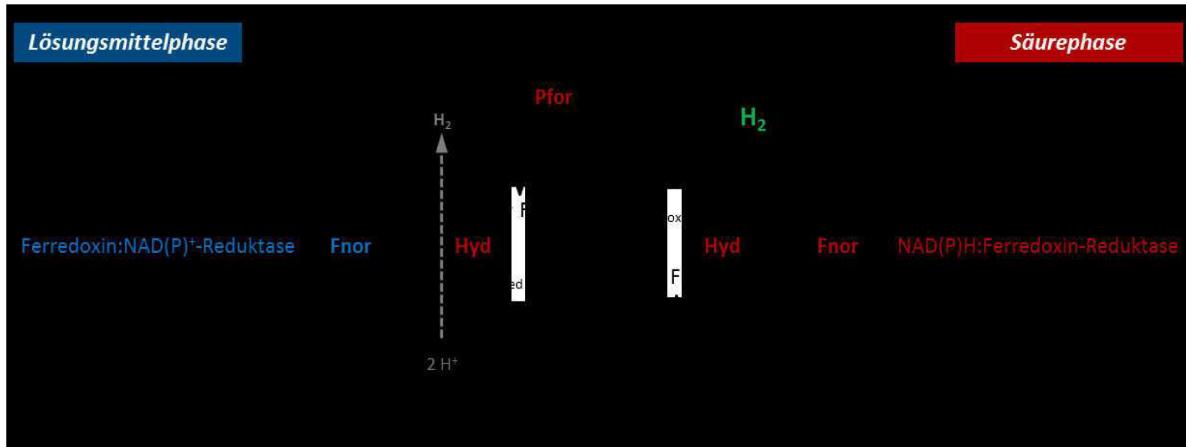
Ein Anstieg der NAD(P)H-Verfügbarkeit bei dominanter Alkoholbildung kann auf einer erhöhten enzymatischen Aktivität der Glykolyse beruhen. Kultivierungen bei kontrolliertem Redoxpotential (-290 mV, Begasung mit Luft) zeigten einerseits eine früh einsetzende Butanolsynthese und andererseits einen höheren glykolytischen Fluss in der exponentiellen Wachstumsphase (Wang *et al.*, 2012). Zudem konnte während der Alkohologenese eine Erhöhung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Aktivität ermittelt werden (Vasconcelos *et al.*, 1994; Saint-Amans *et al.*, 2001). Auch in der Rex-Insertionsmutante zeigte sich ein signifikant induziertes Expressionsverhalten einer NAD(P)-abhängigen GAPDH (CAC3657) (Hönische, persönliche Mitteilung) und es konnte zudem ein Anstieg der Enzymaktivität sowohl mit NADP<sup>+</sup> als auch mit NAD<sup>+</sup> als Coenzym experimentell bestätigt werden. Im Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* ATCC 824 wird neben dem in der Glykolyse hergestellten ATP zudem Energie über die Substratkettenphosphorylierung während der Acetat- und Butyratsynthese generiert.

*C. acetobutylicum rex::int(95)* zeigte eine deutlich verminderte Butyratbildung in der exponentiellen Wachstumsphase. Zunächst wurde vermutet, dass dies auf reduzierten enzymatischen Aktivitäten der säurebildenden Enzyme (Buk, Ack, PtB) beruht. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Rex-Insertionsmutante nachgewiesen werden. Dass trotz verminderter Butyratsynthese dennoch ein leichter Konzentrationsanstieg von ATP im *rex*-negativen Stamm im Vergleich zum WT in der Säurephase detektiert wurde, könnte durch eine erhöhte glykolytische Aktivität erklärt werden.

In der Glykolyse gebildetes Pyruvat wird durch eine oxidative Decarboxylierung mittels Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor) zum Schlüsselintermediat Acetyl-CoA umgesetzt und dabei der Elektronenakzeptor Ferredoxin (Fd) reduziert. Unter acidogenen Wachstumsbedingungen überträgt Ferredoxin die Elektronen größtenteils auf die Hydrogenase, die die Umwandlung zu molekularem Wasserstoff katalysiert (Abb. 4.3). Zusätzlicher Wasserstoff kann durch den Verbrauch von Reduktionsäquivalenten erzeugt werden, was ebenfalls das Redoxgleichgewicht während der Säurephase aufrechterhält. Dazu wird Fd durch eine NADH-Oxidation mit Hilfe einer Ferredoxin:NAD(P)H-Oxidoreduktase (Fnor) reduziert. Obwohl diese Reaktion thermodynamisch ungünstig ist ( $\Delta G^\circ = 21,2 \text{ kJ/mol}$ ), kann sie durch die sogenannte NAD(P)H:Ferredoxin-Reduktase-Aktivität der Fnör katalysiert werden (Petitdemange *et al.*, 1976; 1977). Die Hydrogenase nutzt anschließend die Elektronen des reduzierten Ferredoxins zusammen mit den Protonen zur Synthese von Wasserstoff. Im Gegensatz dazu besteht während der Lösungsmittelbildung ein zunehmender Bedarf an NAD(P)H. Für die Produktion von einem mol Ethanol aus einem mol Acetyl-CoA werden zwei mol NAD(P)H benötigt. Da nur ein Molekül NAD(P)H aus der Glykolyse bereitgestellt wird, kann das zweite NAD(P)H durch die Rückreaktion der Fnör generiert werden. Dabei wird das reduzierte Ferredoxin reoxidiert und die Protonen auf NAD(P)<sup>+</sup> übertragen, sodass diese Elektronenübertragung die Wasserstoffbildung ausschließt (Abb. 4.3). In diesem Fall spricht man von einer Ferredoxin:NAD(P)<sup>+</sup>-Reduktase-Aktivität. Verschiedene biochemische Untersuchungen zur Fnör-Aktivität konnten nachweisen, dass die Ferredoxin:NAD(P)H-Oxidoreduktase auch im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ein wichtiges Enzym darstellt (Jungermann *et al.*, 1973; Petitdemange *et al.*, 1976; 1977; Vasconcelos *et al.*, 1994).

Es kann angenommen werden, dass der NAD(P)H-Pool neben der Induktion der Glukoseoxidation außerdem durch einen Anstieg der Fnör-Aktivität in *C. acetobutylicum rex::int(95)* aufgestockt wird. Obwohl die Fnör-Aktivität nicht bestimmt wurde, wird diese Hypothese durch zwei Resultate gestützt: (1) Die theoretische Kalkulation des NrF-Gehalts (NADH reduziert durch Ferredoxin) der Rex-Defektmutante ergab einen positiven Wert. Dies bedeutet, dass mehr NAD(P)H konsumiert als während der Glykolyse produziert wurde. (2) Es konnte eine erhöhte

Pfor-Aktivität in der Mutante ermittelt werden, wodurch verstärkt Acetyl-CoA bereitgestellt wird. In der Literatur wurde beschrieben, dass das Intermediat Acetyl-CoA einen obligatorischen Aktivator der Fnor darstellt (Petitdemange *et al.*, 1976). Da die Fnor vermutlich entsprechend der GAPDH agiert (Petitdemange *et al.*, 1976), lässt sich spekulieren, dass auch die Expression durch Rex reguliert sein könnte. Es konnte jedoch bis heute trotz nachgewiesener Enzymaktivität kein entsprechendes Gen in *C. acetobutylicum* identifiziert werden.



**Abb. 4.3:** Elektronenübertragung durch Ferredoxin während Acidogenese und Solventogenese von *C. acetobutylicum* (Girbal und Soucaille, 1995; Vasconcelos *et al.*, 1994; mod.). Dargestellt ist ein Reaktionsabschnitt des Gärungsstoffwechsels sowie die unterschiedlichen Funktionsweisen der Fnor. Die roten und blauen Buchstaben geben die entsprechend involvierten Enzyme an. Pfor; Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Fd, Ferredoxin; Hyd, Hydrogenase; Fnor, Ferredoxin:NAD(P)H-Oxidoreduktase.

Sowohl die Aktivität der Fnor als auch die der GAPDH wird durch NAD(P)H inhibiert (Girbal und Soucaille, 1994; Petitdemange *et al.*, 1976; 1977). Es wurde spekuliert, dass ein sehr hoher Umsatz der Reduktionskraft in der Zelle vorliegen muss, um dem entgegenzuwirken (Peptitdemange *et al.*, 1976; Rao und Mutharasan, 1989), was sich in einer gesteigerten Bildung von Ethanol und Butanol widerspiegelt. Dem gegenüber beinhaltet die Biosynthese von Aceton keine Reduktionsschritte und führt zusätzlich zum Verlust des Elektronenakzeptors Acetacetyl-CoA. Schlussfolgernd kann die Acetonbildung als eine Art Nebeneffekt der Säure-Reassimilation mittels Acyl-CoA-Transferasen (CtfA/B) und anschließender Reaktion der Acetacetat-Decarboxylase (Adc) angesehen werden (Abb. 4.4).

Möglicherweise ist die gesteigerte NAD(P)H-Verfügbarkeit der Rex-Insertionsmutante an eine Elektronenübertragung durch den cytoplasmatischen Bcd/EtfAB-Komplex gekoppelt. Die Gene für diesen Komplex liegen im durch Rex regulierten *bcs*-Operon. Dieser Bcd/EtfAB-Komplex ist an der NADH-abhängigen Umwandlung von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA beteiligt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass EtfA und EtfB für die Aktivität der Butyryl-CoA-Dehydrogenase

essentiell sind (Inui *et al.*, 2008). So übertragen die Flavoproteine EtfA/B Elektronen von NADH auf die Bcd, wodurch anschließend Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA reduziert wird (Herrmann *et al.*, 2008).

In *Clostridium kluyveri* bilden Bcd und EtfA/B einen festen Komplex. Dieser Enzymkomplex katalysiert die exogene NADH-abhängige Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA, welche zudem an eine endogene Ferredoxinoxidation und Reduktion von NAD<sup>+</sup> gekoppelt ist (Li *et al.*, 2008; Seedorf *et al.*, 2008). Diese Reaktion ist mit einer energiegewinnenden Elektronenbifurkation verbunden. Zunächst werden die beiden Elektronen von NADH über die Elektronen-Flavoproteine aufgeteilt. Ein Elektron wird auf den positiveren Akzeptor Bcd und schließlich auf Crotonyl-CoA und das andere Elektron auf den negativeren Akzeptor Ferredoxin ( $\text{Fd} \rightarrow \text{Fd}^-$ ) übertragen. Das nächste NADH stellt das jeweils zweite Elektron für die Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA bzw. Ferredoxin ( $\text{Fd}^- \rightarrow \text{Fd}^{2-}$ ) zur Verfügung. Reduziertes Ferredoxin kann dann über einen Rnf-Komplex (*Rhodobacter nitrogen fixation*) reoxidiert werden. Die entstehende Elektronenübertragung erzeugt einen Ionengradienten, durch den über die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase Energie konserviert werden kann (Biegel *et al.*, 2009; 2011; Biegel und Müller, 2010; Li *et al.*, 2008; Seedorf *et al.*, 2008). Da *C. acetobutylicum* jedoch keinen Rnf-Komplex besitzt, kann die Oxidation von reduzierten Ferredoxin nicht an einen energiegewinnenden Elektronentransfer gekoppelt sein (Brüggemann und Gottschalk, 2009). Dennoch könnte das reduzierte Ferredoxin für die Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H mittels Fnor genutzt werden. Die Existenz eines derartigen Mechanismus in *C. acetobutylicum* konnte während dieser Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden.

Weiterhin könnte durch die Alkoholbildung aufgrund deutlich induzierter AdhE2-Aktivität in *C. acetobutylicum rex::int(95)* der Bedarf an NAD(P)H so groß sein, dass über eine Wiederaufnahme von Wasserstoff spekuliert werden kann. Dies wurde in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* untersucht und ein Modell zur Funktion der Hydrogenase im Elektronenfluss unter Einbeziehung der Fnor-Aktivität beschrieben (Nakayama *et al.*, 2007). Da die Reaktion der Hydrogenase reversibel ist, würden die Elektronen ausgehend von der Hydrogenase durch eine thermodynamisch günstige Fnor-Rückreaktion ( $\Delta G^\circ = -15,44 \text{ kJ/mol}$ ) auf NAD(P)<sup>+</sup> übertragen werden, wobei NAD(P)H gebildet wird. Die benötigten Elektronen werden durch eine gekoppelte Oxidation von reduziertem Ferredoxin ( $\Delta G^\circ = -21,23 \text{ kJ/mol}$ ) bereitgestellt. Für die Oxidation von H<sub>2</sub> könnte wahrscheinlich die putative [NiFe]-Hydrogenase HupSL (HupS, CAP0141; HupL, CAP0142) (Nölling *et al.*, 2001) verantwortlich sein (Guerrini, 2007). Eine Reassimilation von H<sub>2</sub> ist bis heute in *C. acetobutylicum* nicht dokumentiert, könnte aber dennoch auf *C. acetobutylicum rex::int(95)* zutreffen.

Im Gegensatz dazu stellt die [FeFe]-Hydrogenase HydA (CAC0028) das zentrale Enzym zur Erhaltung der Redoxbalance in *C. acetobutylicum* dar. Da die Lösungsmittelbildung in enger Konkurrenz mit der Wasserstoffproduktion steht, konzentrieren sich aktuelle Studien auf die Manipulation der Hydrogenase-Aktivität und die Aufklärung der Regulation von HydA (Grimmler *et al.*, 2011; Hönicke *et al.*, 2012). Bis heute konnte keine Regulation auf Transkriptionsebene aufdeckt werden. Gorwa *et al.* (1996) postulierten zudem, dass die Hydrogenase auf enzymatischer Ebene reguliert werden muss. Da bereits die Inaktivierung des Rex kodierenden ORFs (CAC2713) in *C. acetobutylicum* zu einem alkohologenen Phänotyp mit stark verminderter Wasserstoffproduktion führte, stellte sich die Frage, ob der Repressor Rex einen direkten Einfluss auf die HydA-Aktivität hat. Um diesen Ansatz experimentell zu verfolgen, wurden Untersuchungen zur Hemmung der *in vivo*-Aktivität der Hydrogenase mittels Methylviologen (MV) in statischen Kulturen durchgeführt. Methylviologen ist ein künstlicher Elektronenakzeptor, welcher Ferredoxin in zahlreichen Stoffwechselreaktionen und Elektronentransportketten ersetzen kann (Girbal *et al.*, 1994; Grupe und Gottschalk, 1992; Meinecke *et al.*, 1989). Dies konnte für die Pfor katalysierte Reaktion in *C. acetobutylicum* gezeigt werden (Meinecke *et al.*, 1989). Es wurde zudem publiziert, dass die Applikation von MV zu steigenden NAD(P)H-Konzentrationen in der Zelle führt, da es im Gegensatz zu Ferredoxin ein besseres Substrat für die Fnor darstellt und deren enzymatische Aktivität 60-fach gesteigert werden konnte (Peguin und Soucaille, 1995). Die erhöhte Fnor-Aktivität zieht eine verstärkte Alkoholbildung nach sich, was demzufolge die verminderte Wasserstoffsynthese erklärt (Girbal *et al.*, 1995; Girbal und Soucaille, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994).

Die gaschromatographische Analyse der Gärungsprodukte von *C. acetobutylicum rex::int(95)* ergab, dass die Applikation von MV zu einer weiteren Erhöhung der Ethanol- und Butanolbildung und Verringerung der Acetonproduktion führte. Dabei konnte das Alkohol:Aceton-Verhältnis der Mutante durch den Zusatz von 1 mM MV von bereits 7:1 (Wildtyp 2,4:1) auf insgesamt 16,2:1 (Wildtyp 11,1:1) verschoben werden. Da gezeigt werden konnte, dass der Zusatz von MV die Alkoholbildung in *C. acetobutylicum rex::int(95)* zusätzlich induzierte, kann geschlussfolgert werden, dass die Inaktivierung von Rex in *C. acetobutylicum* keinen Effekt auf die Hydrogenase-Aktivität unter den gewählten Bedingungen ausübt. Dies wurde durch die Bestimmung der Enzymaktivität der Hydrogenase von Wildtyp und Mutante untermauert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Unterschied zwischen der Hyd-Aktivität des *rex*-negativen Stamms verglichen mit dem Parentalstamm detektiert werden.

Da die Rex-Insertionsmutante neben einer drastisch verminderten H<sub>2</sub>-Bildung auch einen Anstieg der Alkoholproduktion aufweist, deutet darauf hin, dass ein Überschuss an Elektronen und somit

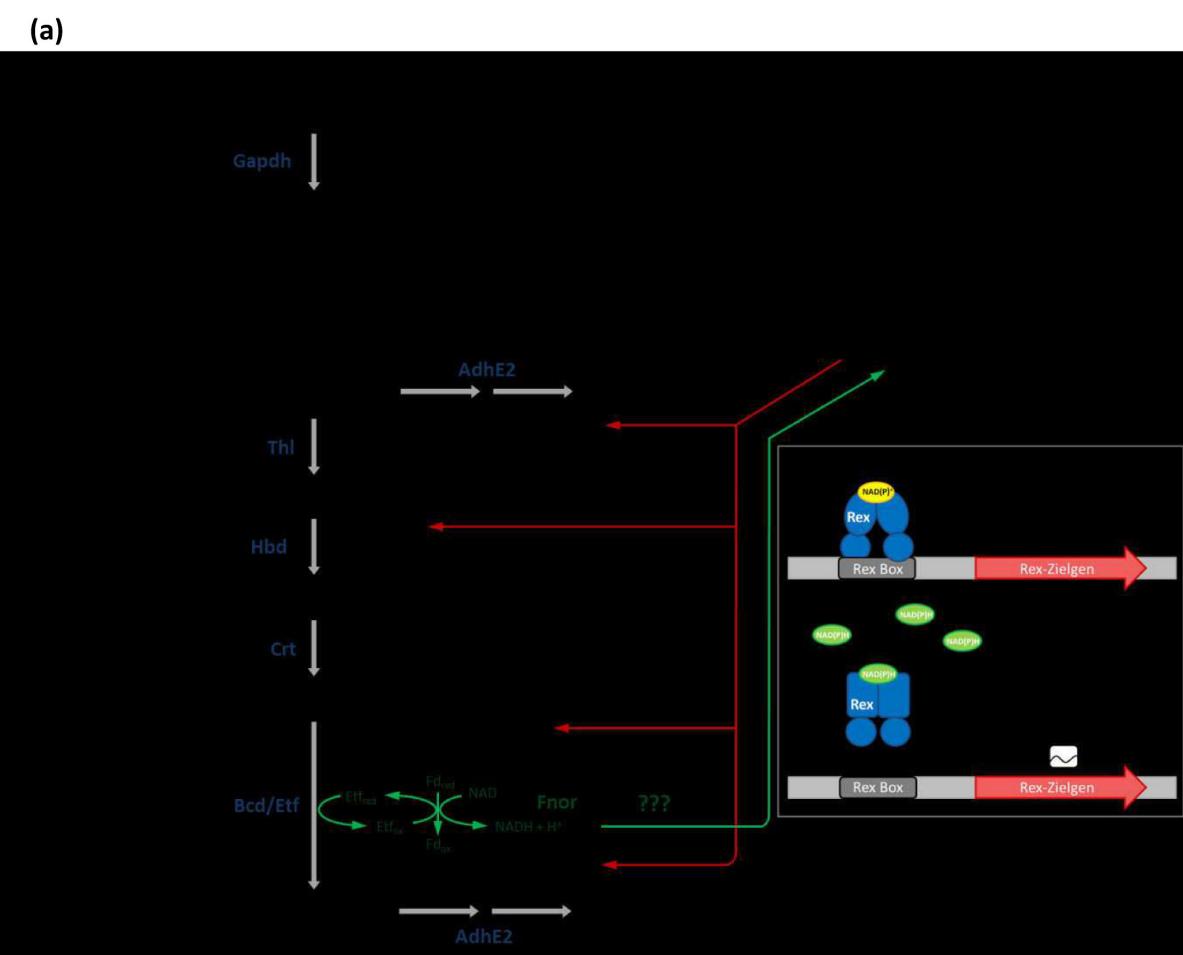
Reduktionskraft während der Synthese von Ethanol und Butanol Hydrogenase unabhängig recycelt wird und dies die Redoxhomöostase aufrecht erhält.

#### 4.4 Rex als Regulator der Solventogenese

Die Erhaltung der Redoxhomöostase stellt eine essentielle Grundlage für das Wachstum und den Stoffwechsel von Bakterien dar. Um dieses Gleichgewicht aufrecht zu erhalten, haben Bakterien im Laufe der Zeit Mechanismen entwickelt, um Veränderungen des internen Redoxstatus wahrzunehmen und sich gegebenenfalls daran anzupassen. Das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis und die Redoxstöchiometrie nehmen ebenfalls eine essentielle Rolle während der Bildung der Gärungsprodukte in Clostridien ein (Lütke-Eversloh und Bahl, 2010). So führen steigende NAD(P)H-Konzentrationen in der Zelle zur Initiation der Alkoholbildung (Grupe und Gottschalk, 1992). In der Vergangenheit konnten zudem der pH-Wert und die Akkumulation der Säuren als „Shift“-induzierende Parameter identifiziert werden (Gottschalk und Morris, 1981; Girbal und Soucaille, 1998; Terracciano und Kashket, 1986; Desai *et al.*, 1999; Desai und Papoutsakis 1999). Außerdem ist die Verfügbarkeit von ATP von Bedeutung (Hüsemann und Papoutsakis, 1989; Grupe und Gottschalk, 1992; Meyer *et al.*, 1986). So führt ein niedriger ATP-Level zum Säuremetabolismus während hohe ATP-Konzentrationen die Lösungsmittelbildung hervorrufen. In der Lösungsmittelphase hingegen findet keine Substratkettenphosphorylierung außerhalb der Glykolyse statt.

Es ließ sich also feststellen, dass sowohl die Energiegewinnung als auch das Redoxgleichgewicht den Stoffwechsel und die Produktbildung in *C. acetobutylicum* bestimmen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein „Zwei-Signal-Model“ (Gruppe und Gottschalk, 1992) abgeleitet: (1) Der pH-Wert und die Säureakkumulation beeinflussen das ATP/ADP-Verhältnis und leiten das erste Signal ein. (2) Die beginnende Acetonproduktion führt zum Anstieg des NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnisses, was dann das zweite Signal aktiviert und die Alkoholbildung auslöst. Der Mechanismus der Signalvermittlung war jedoch unbekannt, wurde aber als „Common regulatory factor γ“ bezeichnet (Grupe und Gottschalk, 1992). Untersuchungen zur Expression von Genen, die an der Lösungsmittelbildung beteiligt sind, zeigten zudem eine Induktion der Transkription beim Wechsel zur Solventogenese (Fischer *et al.*, 1993; Gerischer und Dürre, 1992; Sauer *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 1994). In der jüngeren Vergangenheit durchgeföhrte Transkriptomanalysen lieferten weitere Erkenntnisse über veränderte Expressionsmuster in Säure- und Lösungsmittelphase (Grimmler *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2008). Dennoch konnte auch anhand dieser Ergebnisse kein spezieller Regulator abgeleitet werden. Es wurde postuliert, dass der Transkriptionsregulator SolR/Orf5, dessen Gen sich stromaufwärts des

*sol*-Operons befindet, die Lösungsmittelbildung reguliert (Nair *et al.*, 1999; Harris *et al.* 2001). Nachfolgende Experimente konnten dies jedoch nicht bestätigen (Thormann und Dürre, 2001; Thormann *et al.* 2002). Weiterhin wurde ein Gen *so/B* identifiziert, welches für eine ‚small noncoding RNA‘ (sRNA) kodiert und sich ebenfalls stromaufwärts des *sol*-Operons befindet. Untersuchungen der putativen Repressor-RNA führten zu der Annahme, dass diese die Produktion der Lösungsmittel beeinflusst (Schiel *et al.*, 2010). Obwohl die Erkenntnis gewonnen wurde, dass die internen Nukleotidkonzentrationen einen Einfluss auf die Induktion der Solventogenese besitzen, blieb jedoch die Frage offen, in welcher Weise dieses Signal wahrgenommen wird und welche Transkriptionsregulatoren anschließend agieren.



**Abb. 4.4:** Modell zur stoffwechselphysiologischen Funktion von Rex in *C. acetobutylicum* ATCC 824. (a) Dargestellt ist ein Überblick des Kohlenstoff- (dicke Pfeile) und Elektronenflusses (dünne Pfeile) ohne Berücksichtigung der Redoxstöchiometrie. Dabei symbolisieren graue Pfeile die Rex-regulierten Enzyme (mit Ausnahme der Ldh). Verminderte Stoffwechselwege aufgrund geringerer Produktkonzentrationen sind durch gestrichelte Pfeile illustriert. Eine alternative Elektronenübertragung ist grün dargestellt. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (CAC3657); Ldh, L-Laktat-Dehydrogenase (CAC0267); AdhE2, Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 (CAP0035); Thl, Thiolase (CAC2873); Hbd, 3-hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (CAC2708); Crt, Crotonase (CAC2712); Bcd/Etf, Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Komplex (CAC2709 bis 2711); Fnor, Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase.(b) Modell zur Rex vermittelten Genregulation als Antwort auf steigende NAD(P)H-Konzentrationen. Rex (blau), NAD(P)<sup>+</sup> (gelb), NAD(P)H (grün), Rex-Box (grau), Zielgen (rot).

Während dieser Arbeit wurde die Funktion des Rex-Proteins aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt Rex *in vitro* fähig ist, die Dinukleotide NADH und NAD<sup>+</sup> zu binden. Vermutlich werden Veränderungen der Redoxbalance der Zelle so sensorisch erfasst. Weiterhin konnte eine Bindung von Rex an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz in den Promotorbereichen von beispielsweise Stoffwechsel relevanten Enzymen nachgewiesen werden, wobei deren Transkription reprimiert wird. Steigende NAD(P)H-Konzentrationen führen zur Dissoziation des Repressors von der DNA und zur Dereprimierung von Genen Lösungsmittel produzierender Enzyme (Abb. 4.4 a, b). Dies konnte durch eine Inaktivierung von Rex mittels ClosTron® System bekräftigt werden. Die erzeugte Rex-Defektmutante zeigte eine signifikant verstärkte Ethanolproduktion, eine frühzeitig einsetzende Bildung von Butanol sowie eine verminderte Acetonkonzentration. Dies beruht sehr wahrscheinlich auf der erhöhten Expression und den signifikant gesteigerten Aktivitäten der zentralen Enzyme Thl, Hbd, Crt, Bcd sowie der AdhE2 in *C. acetobutylicum rex::int(95)*. Ein Modell zum Kohlenstoff- und Elektronenfluss in *C. acetobutylicum* ist in der Abbildung 4.4 dargestellt. Rex kann demnach eine Schlüsselfunktion als Regulator des Metabolismus insbesondere während der Induktion der Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum* zugesprochen werden.

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wäre zudem ein alternativer Mechanismus zur Induktion der Alkoholbildung denkbar. Die Alkohogenese ist eine Art der Lösungsmittelbildung, die unter „normalen Bedingungen“ nicht von Bedeutung ist. Dennoch kann sie durch die Hemmung der *in vivo* Hydrogenase-Aktivität mittels verschiedener Kultivierungsmethoden hervorgerufen werden (Datta und Zeikus 1985; Hüsemann und Papoutsakis 1989; Junelles *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1984; Peguin *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2012). Interessanterweise zeigte auch die hier untersuchte Rex-Insertionsmutante einen vergleichbaren alkohogenen Phänotyp, d. h. vermehrte Alkoholbildung bei gleichzeitiger reduzierter Aceton- und Wasserstoffproduktion, die mit erhöhten NADH- und ATP-Konzentrationen assoziiert ist. So kann ein sprunghafter Anstieg von NAD(P)H in der Zelle von Rex wahrgenommen und speziell die Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 exprimiert werden, um die Redoxverhältnisse zügig und effizient auszugleichen. Auch die Regulation anderer Gene, die wichtige Stoffwechselenzyme kodieren, kann durch Rex vermittelt werden und somit zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase beitragen. Trotz zahlreicher experimenteller Nachweise zur physiologischen Funktion von Rex, die innerhalb dieser Arbeit erbracht wurden, kann Rex schließlich nicht als alleiniger „Schalter“ für den metabolischen Wechsel in *C. acetobutylicum* betrachtet werden. Welche und wie viele weitere Faktoren an diesem „Trigger-Mechanismus“ beteiligt sind, bleibt an dieser Stelle jedoch ungeklärt.

## 5 Zusammenfassung

1. Im Genom von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnte durch *in silico* Analysen der offene Leserahmen CAC2713 (*rex*) identifiziert werden, welcher sich stromaufwärts vor dem Butyryl-CoA-Synthese-(*bcs*)-Operon befindet. Ein Abgleich der Aminosäuresequenz des putativen Rex-Proteins aus *C. acetobutylicum* ergab strukturelle Ähnlichkeiten zu bereits bekannten NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Redoxregulatoren aus anderen Bakterien.
2. Durch eine Analyse der Promotorregion des *bcs*-Operons konnte in der 5`UTR ein Sequenzpalindrom, die sogenannte Rex-Box, identifiziert werden. Eine genomweite Suche nach Rex-Boxen in *C. acetobutylicum* offenbarte zudem 72 putative DNA-Bindemotive stromaufwärts vor Genen, welche insbesondere für die L-Laktat-Dehydrogenase (*ldh*), Crotonase (*crt*), Thiolase (*thl*) und Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 (*adhE2*) kodieren. Basierend auf diesen putativen Rex-Boxen wurde eine Konsensus-Sequenz (5`-TTGTTwwwTTwTTAACAA-3') für *C. acetobutylicum* abgeleitet.
3. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass heterolog exprimierte Rex-Protein an die Promotorregionen (Rex-Box) von *crt*, *thl*, *adhE2* und *ldh* in Abhängigkeit von NAD<sup>+</sup> und NADH bindet und somit die Beteiligung von Rex an der redox-abhängigen Genregulation untermauert.
4. Mit Hilfe des ClosTron® Systems wurde erfolgreich die spezifische Defektmutante *C. acetobutylicum rex::int(95)* generiert und diese sowohl durch PCR-Analysen als auch Southern Hybridisierungen verifiziert.
5. In statischen Kulturen bewirkte die Inaktivierung von Rex in *C. acetobutylicum* eine signifikant gestiegene Ethanolproduktion sowie eine früher einsetzende Butanolbildung, wobei die Synthese von Aceton und Wasserstoff drastisch vermindert vorlag. Außerdem zeigte sich eine deutlich reduzierte Produktion an Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Der Phänotyp von *C. acetobutylicum rex::int(95)* konnte darüber hinaus durch Expression von homologem Rex-Protein komplementiert werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Rex eine Funktion als Regulator im Fermentationsmetabolismus von *C. acetobutylicum* zukommt.
6. Vergleichende Transkriptionsanalysen ergaben eine erhöhte Expression der Gene *crt*, *thl* und *adhE2* in der *rex*-negativen Mutante, was wiederum einen Anstieg der enzymatischen Aktivität nach sich zog. Demzufolge wurde geschlussfolgert, dass Rex als direkter Repressor dieser Gene fungiert. Außerdem kann angenommen werden, dass die vorrangige Alkoholbiosynthese auf der

signifikant erhöhten NADH-abhängigen Aktivität der Acetaldehyd/Alkohol-Dehydrogenase 2 (AdhE2) beruht.

7. Zusätzlich wurden die intrazellulären Nukleotidkonzentrationen bestimmt. Für *C. acetobutylicum rex::int(95)* konnte ein erhöhter NADH-Gehalt in der Säure- sowie Lösungsmittelphase dokumentiert werden. Demgegenüber zeigte die Rex-Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp keine deutlichen Konzentrationsunterschiede von ATP, ADP und NAD<sup>+</sup> in beiden Wachstumsphasen.

8. „Batch“-Fermentationen in Gegenwart von Methylviologen ergaben, dass die Alkoholbiosynthese von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)* weiter gesteigert werden konnte. Demzufolge besitzt der Repressor Rex keinen direkten Einfluss auf die *in vivo*-Hydrogenaseaktivität in *C. acetobutylicum*, was sich zudem in unveränderten Enzymaktivitäten der Hydrogenase von WT und Mutante widerspiegelt.

9. Abschließend erfolgten Kultivierungen des *rex*-negativen Stamms im Chemostat. Unter Phosphatlimitierung zeigte die kontinuierliche Kultur der Rex-Defektmutante in der Säurephase (pH 6,5) eine leichte Induktion der Ethanol- und Butanolproduktion. Im Gegensatz dazu konnte während dieser Arbeit kein Fließgleichgewicht („Steady state“) der *rex*-negativen Mutante in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) etabliert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

**Amador-Nougez D, Brasg I, Feng XJ, Roquet N, Rabinowitz JD** (2012) Metabolome Remodeling during the Acidogenic-Solventogenic Transition in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 77:7984–7997.

**Andersch W, Bahl H, Gottschalk G** (1983) Levels of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 18:327-332.

**Bahl H, Gottschalk G** (1988) Microbial production of butanol/acetone. In: Rehm H J, Reed G (eds) Biotechnology Vol. 6b. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim:1-30.

**Bahl H, Gottschalk G** (1984) Parameters effecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol Bioeng Symp* 11:215-223.

**Bahl H** (1983) Kontinuierliche Aceton-Butanol-Gärung durch *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.

**Bahl H, Andersch W, Braun K, Gottschalk G** (1982a) Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 14:17-20.

**Bahl H, Andersch W, Gottschalk G** (1982b) Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 15:201-205.

**Bennet G, Rudolph FB** (1995) The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Reviews* 17:241-249.

**Bentley SD et al.** (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Nature*, 417:141-147.

**Berezina OV, Sineokii SP, Velikodvorskaia GA, Schwarz WH, Zverlov VV** (2008) Extracellular glycosyl hydrolase activity of the clostridia producing acetone, butanol, and ethanol. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 44:49–55.

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

**Bernofsky C, Swan M** (1973) An Improved Cycling Assay for Nicotinamid Adenine Dinucleotide. *Analyl Biochem* 53:452-458.

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

- Biegel E, Schmidt S, González JM, Müller V** (2011) Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cell Mol Life Sci* 68:613–634.
- Biegel E, Müller V** (2010) Bacterial Na<sup>+</sup>-translocating ferredoxin:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18138–18142.
- Biegel E, Schmidt S, Müller V** (2009) Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Environ Microbiol* 11:1438–1443.
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Boynton ZL, Bennett GN, Rudolph FB** (1996) Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* 178:3015-3024.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brekasis D, Paget MS** (2003) A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J* 22: 4856–4865.
- Breznak JA, Costilow RN** (1994) Physicochemical factors in growth. In: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg (Herausgeber.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
- Brüggemann H, Gottschalk G** (2009) *Clostridia - Molecular Biology in the Post-genomic Era*- Norfolk, UK : Caister Academic Press. 16.
- Chen Y, McClane BA, Fisher DJ, Rood JI, Gupta P** (2005) Construction of an alpha toxin gene knockout mutant of *Clostridium perfringens* type A by use of a mobile group II Intron. *Appl Environ Microbiol* 71: 7542-7547.
- Clark SW, Bennett GN, Rudolph FB** (1989) Isolation and Characterization of Mutants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Deficient in Acetoacetyl-Coenzyme A:Acetate/Butyrate:Coenzyme A-Transferase and in Other Solvent Pathway Enzymes. *Appl Environ Microbiol* X:970-976.
- Cohn F** (1876) Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 2: 249-276.
- Cole HA, Wimpenny JWT, Hughes DE** (1967) The ATP Pool in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 143:445-453.

**Coolskey CM, Zhang Y, Wang H, Redl S, Winzer K, Minton NP** (2012) Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone–butanol–ethanol fermentation pathway. *Metab Eng* 14: 630–641.

**Cummings L, Riley K, Black L, Souvorov A, Resenchuk S, Dondoshansky I, Tatusova T** (2002) Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol Lett* 216:133-138.

**Datta R, Zeikus JG** (1985) Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids. *Appl Environ Microbiol* 49:522-529.

**DeGraef MR, Alexeeva S, Snoep JL, DeMattos MJT** (1999) The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD<sup>+</sup>) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in *Escherichia coli*. *J Bac* 181:2351–2357.

**Desai RP, Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET** (1999) Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metab Eng* 1:206-213.

**Desai RP, Papoutsakis ET** (1999) Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 65:936-945.

**Doremus MG, Linden JC, Moreira AR** (1985) Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* 27(6):852-860.

**Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW** (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16: 6127-6145.

**Dürre P, Kuhn A, Gottwald M, Gottschalk G** (1987) Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:268–272.

**Dürre P** (2008) Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann NY Acad Sci* 1125:353–362.

**Dürre P, Bahl H** (1996) Microbial production of acetone/butanol/isopropanol. *Biotechnology* Vol. 6, 2nd ed. M. Roehr, Ed.: 229–268. Weinheim Germany : VCH Verlagsgesellschaft.

**Ezeji T, Milne C, Price ND, Blaschek HP** (2010) Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1697-1712.

**Fiedler T** (2006) Proteomanalyse von *Clostridium acetobutylicum* unter Phosphatlimitierung und Charakterisierung des phosphatspezifischen Zwei-Komponenten-Systems PhoP/R. Dissertation. Universität Rostock.

**Fischer RJ, Helms J, Dürre P** (1993) Cloning, sequencing, and molecular analysis of the sol operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J Bacteriol* 175: 6959–6969.

**Fischer RJ, Oehmcke S, Meyer U, Mix M, Schwarz K, Fiedler T, Bahl H** (2006) Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J Bacteriol* 188:5469-5478.

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

**Gajiwala KS, Burley SK** (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10:110–116.

**Gerischer U, Dürre P** (1992) mRNA analysis of the *adc* gene region of *Clostridium acetobutylicum* during the shift to solventogenesis. *J Bacteriol* 174(2):426-433.

**Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, Chou CP** (2009) Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol Adv* 27:764-81.

**Girbal L, Von Abendroth G, Winkler M, Benton PM, Meynial-Salles I, Croux I, Peters JW, Happe T, Soucaille P** (2005) Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol* 71:2777–2781.

**Girbal L, Soucaille P** (1998) Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Trends Biotechnol* 16:11-16.

**Girbal L, Croux C, Vasconcelos I, Soucaille P** (1995) Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol Rev* 17:287-297.

**Girbal L, Vasconcelos I, Soucaille P** (1994) Transmembrane pH of *Clostridium acetobutylicum* is inverted (more acidic inside) when the *in vivo* activity of hydrogenase is decreased. *J Bacteriol* 176:6146-6147.

**Gorwa MF, Croux C, Soucaille P** (1996) Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* 178: 2668-2675.

**Gottwald M, Gottschalk G** (1985) The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch Microbiol* 143:41-46.

**Gottschal JC, Morris JG** (1981) Non-production of acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* during glucose- and ammoniumlimitation in continuous culture. *Biotech Lett* 3:525–530.

**Grimmler C, Janssen H, Krausse D, Fischer RJ, Bahl H, Dürre P, Liebl W, Ehrenreich A** (2011) Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20:1-15.

**Grupe H, Gottschalk G** (1992) Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl Environ Microbiol* 58:3896-3902

**Guerrini O, Burlat B, Léger C, Guigliarelli B, Soucaille P, Girbal L** (2007) Characterization of two 2[4Fe4S] Ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*. *Curr Microbiol* 56:261–267.

**Gyan S, Shiohira Y, Sato I, Takeuchi M, Sato T** (2006) Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD<sup>(+)</sup> ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 7062–7071.

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

**Harris LM, Blank L, Desai RP, Welker NE, Papoutsakis ET** (2001) Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated *solR* gene. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27(5):322–328.

**Hartmanis MGN, Gatenbeck S** (1984) Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Appl Environ Microbiol* 47:1277-1283.

**Haus S, Jabbari S, Millat T, Janssen H, Fischer RJ, Bahl H, King JR, Wolkenhauer O** (2011) A systems biology approach to investigate the effect of pH-induced gene regulation on solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *BMC Systems Biology* 5:10.

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

**Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP** (2007) The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* 70:452-464

**Hecker M, Reder A, Fuchs S, Pagels M, Engelmann S** (2009) Physiological proteomics and stress/starvation responses in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Res in Microbiology* 160:245-258.

**Hermann M, Fayolle F, Marchal R, Podvin L, SEBALD M, Vandecasteele JP** (1985) Isolation and Characterization of Butanol-Resistant Mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 50:1238-1243.

**Herrmann G, Jayamani E, Mai G, Buckel W** (2008) Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *J Bacteriol* 190:784-791.

**Hermann M, Fayolle F, Marchal R, Podvin L, Sebald M, Vandecasteele JP** (1985) Isolation and characterization of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 50(5):1238-1243.

**Hillmann F** (2009) Von obligater Anaerobiose zur Aerotoleranz – Die oxidative Stressantwort von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.

**Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR** (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51–59.

**Hönicke D, Janssen H, Grimmeler C, Ehrenreich A, Lütke-Eversloh T** (2012) Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. *N Biotechnol* 29:485–493. 1043.

**Huang L, Gibbins LN, Forsberg CW** (1985) Transmembrane pH Gradient and Membrane Potential in *Clostridium acetobutylicum* during Growth under Acetogenic and Solventogenic Conditions. *Appl Env Microbiol.* 50(4):1043-1047.

**Hüsemann MHW, Papoutsakis ET** (1989) Comparison between *in vivo* and *in vitro* enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:585–595.

**Hüsemann MHW, Papoutsakis ET** (1986) Effect of acetoacetate, butyrate, and uncoupling ionophores on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Letters* 8:37-42.

**Inui M, Suda M, Kimura S, Yasuda K, Suzuki H, Toda H, Yamamoto S, Okino S, Suzuki N, Yukawa H** (2008) Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1305-1316.

**Janssen H, Döring C, Ehrenreich A, Voigt B, Hecker M, Bahl H, Fischer RJ** (2010) A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of *Clostridium acetobutylicum* in a chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:2209-2226.

**Janssen H** (2010) Das Proteom und Transkriptom von *Clostridium acetobutylicum* bei unterschiedlichen pH-Werten im Chemostaten. Dissertation. Universität Rostock.

**Jiang Y, Xu C, Dong F, Yang Y, Jiang W, Yang S** (2009) Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metab Eng* 11:284-291.

**Jones SW, Paredes CJ, Tracy B, Cheng N, Sillers R, Senger RS, Papoutsakis ET** (2008) The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol* 9:R114.

**Jones DT** (2001) Applied acetone-butanol fermentation, In: Bahl H., Dürre P. (ed.) *Clostridia. Biotechnological and Medical Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 125–168.

- Jones DT, Woods DR** (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev* 50:484-524.
- Jones DT, van der Westhuizen A, Long S, Allcock ER, Reid SJ, Woods DR** (1982) Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1434-1439. 44.
- Junelles MA, Idrissi-Janati R, Petitdemange H, Gay R** (1988) Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Current Microbiol* 17:299-303.
- Jungermann K, Thauer KR, Leimenstabl G, Decker K** (1973) Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochem Biophys Acta* 305: 268-280.
- Karberg M, Guo H, Zhong J, Coon R, Perutka J and Lambowitz AM** (2001) Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *Nat Biotechnol* 19(12): 1162-1167.
- Kim BH, Bellows P, Datta R, Zeikus JG** (1984) Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: Utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. *Appl Environ Microbiol* 48:764-770.
- Koch R** (1876) Untersuchungen über Bakterien. V. Die Aetiologie der Milzbrand Krankheit, begründet auf Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 2: 277-308.
- Kuit W, Minton NP, Lopez-Contreras AM, Eggink G** (2012) Disruption of the acetate kinase (*ack*) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:729–741.
- Kühne SA et al.** (2012) ClosTron-Mediated Engineering of *Clostridium* - Strain Engineering Methods and Protocols / WILLIAMS J. A. - New York : Springer.
- Lee JY, Jang YS, Lee J, Papoutsakis ET, Lee SY** (2009) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. *Biotechnol J* 4:1432-1440.
- Lee J, Yun H, Feist AM, Palsson BO, Lee SY** (2008a). Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:849-862.
- Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS** (2008b) Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol Bioeng* 101:209-228.
- Lehmann D, Lütke-Eversloh T** (2011) Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metab Eng* 13:464-473.
- Lehmann D, Hönicke D, Ehrenreich A, Schmidt M, Weuster-Botz D, Bahl H, Lütke-Eversloh T** (2012a) Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 743-754.

**Lehmann D, Lütke-Eversloh T** (2012b) New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol and Biotechnol* doi 10.1007/s00253-012-4109-x.

**Lehmann D** (2012) Neue Einblicke in den Gärungsstoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. Universität Rostock.

**Lesk AM** (1995) NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* 5:775-783.

**Li F, Hinderberger J, Seedorf H, Zhang J, Buckel W, Thauer KR** (2008) Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme a (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol* 190:843-850.

**Long S, Jones DT, Woods DR** (1984b) Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 256-261.

**Lütke-Eversloh T, Bahl H** (2011) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Biotechnol* 22:634-647

**Madigan MT, Martinko JM, Parker J** (2000) Brock: biology of microorganism, dt. Übersetzung Goebel, W. (Hrsg.), Berlin Spektrum, Akademischer Verlag.

**Mann MS, Lütke-Eversloh T** (2013) Thiolase Engineering for Enhanced Butanol Production in *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Bioeng*. 110:887-897.

**Martínez, I, Zhu J, Lin H, Bennett GN, San KY** (2008) Replacing *Escherichia coli* NADdependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metab Eng* 10:352-359.

**Mann MS, Dragovic Z, Schirrmacher G, Lütke-Eversloh T** (2012) Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnol Lett* 34:1643–1649.

**McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT** (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16:404-405.

**McLaughlin KJ, Strain-Damerell CM, Xie CK, Brekasis D, Soares AS, Paget MSB, Kielkopf CL** (2010) Structural Basis for NADH/NAD<sup>+</sup> Redox Sensing by a Rex Family Repressor. *Molecular Cell* doi 10.1016/j.molcel.2010.05.006.

**Meinecke B, Bertram J, Gottschalk G** (1989) Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol* 152: 244-250.

**Mermelstein LD, Papoutsakis ET** (1993) *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* 59:1077-1081.

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

**Meyer CL, Roos JW, Papoutsakis ET** (1986) Carbon monoxide gassing leads to alcohol production and butyrate uptake without acetone formation in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24:159-167 61.

**Michel F, Ferat JL** (1995) Structure and activities of group II Introns. *Annu Rev Biochem* 64:435-461.

**Millat T, Janssen H, Bahl H, Fischer RJ, Wolkenhauer O** (2013) Integrative modelling of pH-dependent enzyme activity and transcriptomic regulation of the acetone–butanol–ethanol fermentation of *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Micobiol Biotechnol* doi: 10.1111/1751-7915.12033.

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

**Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R** (1982) Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl Environ Microbiol* 44:1318-1324.

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

**Nair RV, Green EM, Watson DE, Bennett GN, Papoutsakis ET** (1999) Regulation of the *sol* locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *J Bacteriol* 179(17):5442–5447.

**Nakayama S, Kosaka T, Hirakawa H, Matsuura K, Yoshino S, Furukawa K** (2007) Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster *hupCBA* in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:483-493.

**Nölling J et al.** (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* 183:4823-4838.

**Pagels M, Fuchs S, Pané-Farré J, Kohler C, Menschner L, Hecker M, McNamarra PJ, Bauer MC, Von Wachenfeldt C, Liebeke M, Lalk M, Sander G, Von Eiff C, Proctor RA, Engelmann S** (2010) Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 76:1142-1161.

**Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET** (2005) A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Rev Microbiol* 3: 969-978.

**Pasteur L** (1862). Quelques résultats nouveaux relatifs aux fermentations acétique et butyrique. *Bull Soc Chim* 1862: 52–53.

**Peguin S, Goma G, Delorme P, Soucaille P** (1994) Metabolic flexibility of *Clostridium acetobutylicum* in response to methyl viologen addition. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:611–616.

**Peguin S, Soucaille P** (1996) Modulation of metabolism of *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture in a three-electrode potentiostatic system with methyl viologen as electron carrier. *Biotechnol and Bioeng* 51:342-348.

**Pei J, Zhou Q, Jiang Y, Le Y, Li H, Shao W, Wiegel J** (2010) *Thermoanaerobacter* spp. control ethanol pathway via transcriptional regulation and versatility of key enzymes. *Metab Eng* 12: 420-428.

**Pei J, Zhou Q, Jing Q, Li L, Dai C, Li H, Wiegel J, Shao W** (2011) The mechanism for regulating ethanol fermentation by redox levels in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Metab Eng* 13:186-193

**Petitdemange H, Cherrier C, Raval G, Gay R** (1976) Regulation of the NADH and NADPH-Ferredoxin Oxidoreductases in clostridia of the butyric group. *Biochem Biophys Acta* 421: 334-347.

**Petitdemange H, Cherrier C, Bengone JM, Gay R** (1977) Study of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductase activities in *Clostridium acetobutylicum*. *Can J Microbiol.* 23: 152-160:

**Ounine K, Petitdemange H, Raval G, Gay R** (1985) Regulation and Butanol Inhibition of D-Xylose and D-Glucose Uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol.* 49(4): 874-878.

**Ravcheev DA, Li X, Latif H, Zengler K, Leyn SA, Korostelev YD, Kazakov AE, Novichkov PS, Osterman AL, Rodionov DA** (2012) Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J Bacteriol* 194(5):1145-57.

**Rao G, Mutharasan R** (1989) NADH levels and solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*: new insights through culture fluorescence. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:59-66.

**Rice P, Longden I, Bleasby A** (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16:276-277.

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

**Riebe O** (2005). Heterologe Expression und Analyse reverser Rubrerythrine und Untersuchung des oxidativen Stress-Proteoms von *Clostridium acetobutylicum*. Diplomarbeit. Universität Rostock.

**Roos JW, McLaughlin JK, Papoutsakis ET** (1985) The effect of pH on nitrogen supply, cell lysis, and solvent production in fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol Bioeng 27: 681-694.

**Rose IA** (1955) Acetate Kinase of Bacteria (Acetokinase). Method Enzymol X:591-595.

**Rossmann MG, Moras D, Olsen KW** (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. Nature 250:194-199.

**Saint-Amans, Girbal L, Andrade J, Ahrens K, Soucaille P** (2001) Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures. J Bac 183: 1748-1754.

**Sambrock J, Russell DW** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

**Sauer U, Dürre P** (1995) Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiol Letters. 125:115-120.

**Schlegel HG** (1992) Allgemeine Mikrobiologie: Thieme Verlag. Stuttgart. 7. Auflage.

**Schiel B, Nold N, Dürre P** (2010) Identification of a small noncoding RNA in *Clostridium acetobutylicum*. Vortrag Jahrestagung der VAAM 2010 in Hannover.

**Shaw AJ, Podkaminer KK, Desai GS, Bardsley JS, Rogers SR, Thorne PG, Hogsett DA, Lee RL** (2008) Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. PNAS 105(37):13769-13774.

**Seedorf H, Fricke FW, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberger J, Li F, Hagemeier C, Thauer KR, Gottschalk G** (2008) The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. PNAS 105:2128-2133.

**Sickmier EA, Brekasis D, Paranawithana S, Bonanno JB, Paget MS, Burley SK, Kielkopf CL** (2005) X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. Structure 13: 43-54.

**Sillers R, Al-Hinai MA, Papoutsakis ET** (2009) Aldehyde-Alcohol Dehydrogenase and/or Thiolase Overexpression Coupled With CoA Transferase Downregulation Lead to Higher Alcohol Titers and Selectivity in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations. Biotechnol Bioeng 102:38-42.

**Sillers R, Chowb A, Tracy B, Papoutsakis ET** (2008) Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce Butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metab Eng* 10:321–332.

**Singh A, Lynch MD, Gill RT** (2009) Genes restoring Redoxbalance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. *Metab Eng* 11:347–354.

**Soucaille P, Figge R, Croux C** (2006) Process for chromosomal integration and DNA sequence replacement in Clostridia. Dépôt PCT n° PCT/EP2006/066997.

**Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among fragments separated by gelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

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

**Thormann K, Dürre P** (2001) Orf5/SolR: a transcriptional repressor of the sol operon of *Clostridium acetobutylicum*? *J Ind Microbiol Biotechnol* 27(5):307–313.

**Thormann K, Feustel L, Lorenz K, Nakotte S, Dürre P** (2002) Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *J Bacteriol* 184(7):1966–1973.

**Tummala SB, Welker NE, Papoutsakis ET** (2003) Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 185:1923-1934.

**Tummala SB, Welker NE, Papoutsakis ET** (1999). Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* 65:3793-3799.

**Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P.** (1994) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J Bacteriol* 176(5):1443-1450

**Walter KA, Mermelstein LD, Papoutsakis ET** (1994) Studies of recombinant *Clostridium acetobutylicum* with increased dosages of butyrate formation genes. *Ann NY Acad Sci* 721:69-72.

**Wang S, Zhu Y, Zhang Y, Li Y** (2012) Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1021–1030.

**Wang E, Ikonen TP, Knaapila M, Svergun D, Logan DT, Von Wachenfeldt C** (2011) Small-angle X-ray scattering study of a rex family repressor: Conformational response to NADH and NAD<sup>+</sup> binding in solution. *J Mol Biol* 408:670-683.

**Wang E, Bauer MC, Rogstam A, Linse S, Logan DT, Von Wachenfeldt C** (2008) Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. Mol Microbiol 69: 466–478.

**Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET** (1989) Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. Appl Environ Microbiol 55:317-322.

**Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET** (1988) Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. Appl Environ Microbiol 54(11): 2717-2722.

**Wietzke M, Bahl H** (2012) The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. Appl Microbiol Biotechnol 96:749–761.

**Wimpenny JWT, Firth A** (1972) Levels of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Facultative Bacteria and the Effect of Oxygen. J Bac 111: 24-32.

**Winzer K, Lorenz K, Zickner B, Dürre P** (2000) Differential Regulation of Two Thiolase Genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. J Mol Microbiol Biotechnol 2(4):531-541.

**Wood MJ, Storz G** (2005) Oxygen, Metabolism, and Gene Expression: The T-Rex Connection. Structure, Vol. 13 doi 10.1016/j.str.2004.12.002.

**Young M, Staudenbauer WL, Minton NP** (1989) Genetics of Clostridium. In: N. P. Minton, D. J. Clarke (eds.): Clostridia: Biotechnology Handbooks 3:63-103. Plenum Press, New York. 101.

**Zechlau M** (2007) Granulose-Defektmutanten in *Clostridium acetobutylicum*. Diplomarbeit. Universität Rostock.

**Zhong J, Karberg M, Lambowitz AM** (2003) Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (tragetron) vector containing a retrotransposition-activated-selectable-marker. Nu cleic Acids Res 31(6):1656-1664.

## 7 Anhang

Tab. A.1: Plasmide

Plasmid	Genotyp	Herkunft/Referenz
pMTL007C-E2	<i>ltrA</i> , <i>L1</i> / <i>ltrB</i> -Intron (250 Bp), ColE1 ori, Cam <sup>R</sup>	Laborsammlung Nr. 20/ Heap <i>et al.</i> , 2010
pMTL007-rex	pMTL007C-E2, rex-Intron (350 Bp, angepasst an CAC2713), <i>Hind</i> III, <i>Bsr</i> GI	Laborsammlung Nr. 173/ Diese Arbeit
pMTL007-glgA	pMTL007, rex-Intron (350 Bp, angepasst an <i>glgA</i> ), <i>Hind</i> III, <i>Bsr</i> GI	Laborsammlung Nr. 167/ Zechlau, 2007
pAN2	Φ3T1, p15A ori, Tet <sup>R</sup>	Laborsammlung Nr. 427/ Heap <i>et al.</i> , 2007
pThyda	<i>thIA</i> Promotor, <i>hydA</i> , Strep-Tag II, Amp <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , <i>repL</i> , ColE1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung Nr. 22/ Girbal <i>et al.</i> , 2005
pTrex	<i>thIA</i> Promotor, rex, Strep-Tag II, Amp <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , <i>repL</i> , ColE1 ori	Laborsammlung Nr. 425/ Diese Arbeit
pCons::upp	upp, Cam <sup>R</sup> , <i>repL</i> , ColE1 ori	Laborsammlung Nr. 426/ Soucaille <i>et al.</i> , 2006
pCons::upp-rex	rex (CAC2713 plus 500 Bp upstream), upp, Cam <sup>R</sup> , <i>repL</i> , ColE1 ori	Laborsammlung Nr. 427/ Diese Arbeit

Tab. A.2: Oligonukleotide

Primer	Sequence (5' → 3') <sup>1)</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>2)</sup>	nt
IBS_rex (95/96s)	AAAA <b>AAGCTT</b> ATAATTATCCTTA <b>TTAGGCCTACT</b> GTGC GCCAGATAGGGTG	65,8	53
EBS1d_rex (95/96s)	CAGATT <b>GTACA</b> AATGTGGTGATAACAGATAAGTC <b>CTTA</b> <b>CTAA</b> TAACCTACCTTCTTTGT	64,9	60
EBS2_rex (95/96s)	TGAACGCAAGTTCTAATTCGGTT <b>CCTAA</b> TCGATAGAG GAAAGTGTCT	65,1	49
EBS Universal	CGAAATTAGAAACTTGCCTCAGAAC	55,2	28
Rex_BamHI_fw	CCCC <b>GGATCC</b> GTGGATAAGAAAAAAACATATCAATG	61,7	37
Rex_Cfr9I_rev	GGGG <b>CCCGGG</b> ATCTCGGCTTTATTCACCTC	66,5	31

Tab. A.2: Fortsetzung

ErmRAM_fw	ACGCGTTATATTGATAAAAATAATAATAGTGGG	54,5	33
ErmRAM_rev	ACGCGTGCAGACTCATAGAATTATTCCTCCG	64,1	32
Rex_com_fw	AAAA <b>GGATCC</b> GAGTTAACGGCTGTAGTG	50,2	31
Rex_com_rev	AAAA <b>GGATCC</b> GGGCAAAAATTAGAACATATG	51,1	33
NB_crt_fw	TGAAAGCTGTCATTGCATCC	53,5	20
NB_crt_rev	GCAGCTGTTAACGGTTTG	53,1	20
NB_thl_fw	ATCCCATTATTGCTGGGTCA	53,9	20
NB_thl_rev	TGATCACTGACGGATTGTGG	54,7	20
NB_ahhE2_fw	ATGACGTGTGTCACCTCCA	56,4	20
NB_adhE2_rev	CGGCCTATTCATCTGGAAAA	52,5	20
Eub1	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	52,9	19
Eub2	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	56,7	20
EMSA_crt_fw	GTAATTGTTGAAAATGTACATTAAAGTG	50,4	28
EMSA_crt_rev	AGTTCCATGACTAACCTCC	51,2	20
EMSA_hbd_fw	CCCCAATAATGAAGGTAGC	50,3	19
EMSA_hbd_rev	TAAACAGACCTCCCTAAATTAAAG	50,9	25
EMSA_thl_fw	AACATGATTTAACGGGGTTAG	50,6	22
EMSA_thl_rev	TAACAGATAAACCAATTCAATCTATTTC	50,5	28
EMSA_adhE2_fw	GCCTTTGCTATAGGTAAAAATAC	50,7	25
EMSA_adhE2_rev	TAATGTGATAAACCGTTGATATGTAC	51,3	26
EMSA_Idh_fw	TAGTATAGTATTAGTTCAATTACCTTGTCA	50,7	29
EMSA_Idh_rev	GAACCTCAATAGATGGGCTC	50,5	20
EMSA_16S_fw	TTCGCTGCACTAGACAGCTT	56,6	20
EMSA_16S_rev	GCAAAATAAACTACCCGTGA	53,1	21

1) Die roten Buchstaben verdeutlichen die veränderten Basen zur Anpassung an das Gen der Insertionsmutagenese. Die grünen Buchstaben zeigen die verwendeten Restriktionsschnittstellen.

2) Schmelzpunkt-(T<sub>m</sub>)-Berechnung mittels OligoAnalyzer 3.1 ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com))

**Tab. A.3:** Ergebnisse der „Virtual footprint“-Analyse zur Identifikation von potentiellen Rex-Boxen in *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Resultate in Englisch).

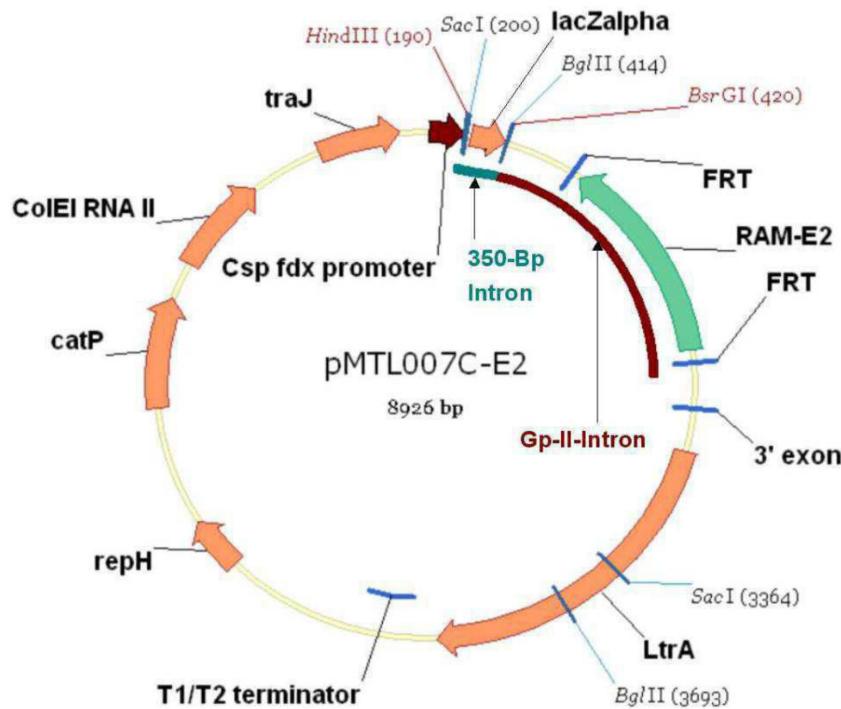
ORF	Gen	Proteinfunktion	ATG-Abstand	Lokation
<i>CAC0011</i>		hypothetical protein	18	intergenic
<i>CAC0068</i>		ABC transporter permease	44	coding region
<i>CAC0072</i>		hypothetical protein	221	Intergenic
<i>CAC0073</i>		hypothetical protein	30	intergenic
<i>CAC0090</i>		xylanase/chitin deacetylase	320	intergenic
<i>CAC0267</i>	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	81	intergenic
<i>CAC0322</i>		sensor protein	117	intergenic
<i>CAC0487</i>		hypothetical protein	16	intergenic
<i>CAC0488</i>		hypothetical protein	309	intergenic
<i>CAC0500</i>		C-terminal PDZ domain-containing protein	280	coding region
<i>CAC0532</i>		PTS system, arbutin-like IIBC component	35	intergenic
<i>CAC0741</i>		methyl-accepting chemotaxis protein	109	intergenic
<i>CAC0835</i>		integral membrane protein	260	coding region
<i>CAC0862</i>		transmembrane protein	291	coding region
<i>CAC0862</i>		transmembrane protein	22	coding region
<i>CAC0894</i>	<i>aroB</i>	prephenate dehydrogenase	350	coding region
<i>CAC1009</i>		cell wall biogenesis enzyme	57	intergenic
<i>CAC1017</i>		SpoVB related membrane protein	100	intergenic
<i>CAC1018</i>		hypothetical protein	30	intergenic
<i>CAC1213</i>		hypothetical protein	109	intergenic
<i>CAC1261</i>		predicted RNA-binding protein	117	coding region
<i>CAC1288</i>		ribosomal protein S21	102	intergenic
<i>CAC1385</i>	<i>cobC</i>	alpha-ribazole-5'-phosphate phosphatase	109	coding region
<i>CAC1388</i>		mannose-6-phosphate isomerase	314	intergenic

**Tab. A.3:** Fortsetzung

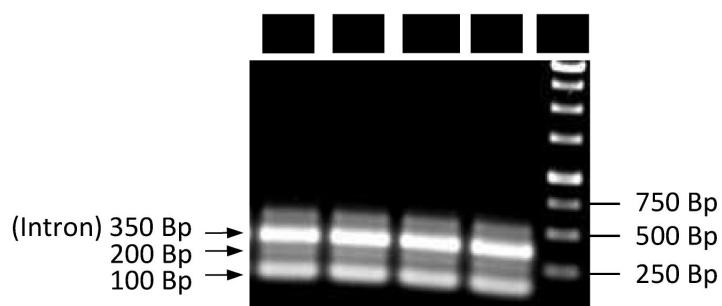
<i>CAC1400</i>	ABC transporter, periplasmic binding component	320	coding region
<i>CAC1487</i>	small acid-soluble spore protein	28	intergenic
<i>CAC1512</i>	<i>nirC</i> formate/nitrate transporter	25	intergenic
<i>CAC1515</i>	<i>asrC</i> anaerobic sulfite reduction protein C	35	coding region
<i>CAC1522</i>	small acid-soluble spore protein	172	intergenic
<i>CAC1523</i>	fructokinase	25	intergenic
<i>CAC1591</i>	Uncharacterised membrane protein, YCGQ B. subtilis homolog	183	coding region
<i>CAC1671</i>	recombination factor protein RarA	136	coding region
<i>CAC1856</i>	ribonuclease HI	260	coding region
<i>CAC1871</i>	FtsK-like DNA segregation ATPase	161	coding region
<i>CAC1942</i>	hypothetical protein	47	intergenic
<i>CAC1943</i>	hypothetical protein	20	intergenic
<i>CAC1978</i>	hypothetical protein	52	coding region
<i>CAC2012</i>	<i>fadB</i> enoyl-CoA hydratase	315	coding region
<i>CAC2023</i>	hypothetical protein	249	coding region
<i>CAC2068</i>	sporulation factor SpollM	177	coding region
<i>CAC2101</i>	hypothetical protein	183	coding region
<i>CAC2117</i>	nucleoside phosphorylase	21	intergenic
<i>CAC2214</i>	regulator of flagellin synthesis	106	Intergenic
<i>CAC2253</i>	membrane-associated sensory histidine kinase-like ATPase	93	intergenic
<i>CAC2271</i>	FeS oxidoreductases	34	coding region
<i>CAC2276</i>	SS-DNA-specific exonuclease domain-containing prot	45	intergenic
<i>CAC2451</i>	SoxR family transcriptional regulator	173	coding region
<i>CAC2565</i>	NifU-like domain-containing protein	163	intergenic
<i>CAC2619</i>	Acyl-CoA thioesterase family protein	20	intergenic
<i>CAC2620</i>	HD-GYP hydrolase domain containing protein	300	intergenic

**Tab. A.3** Fortsetzung

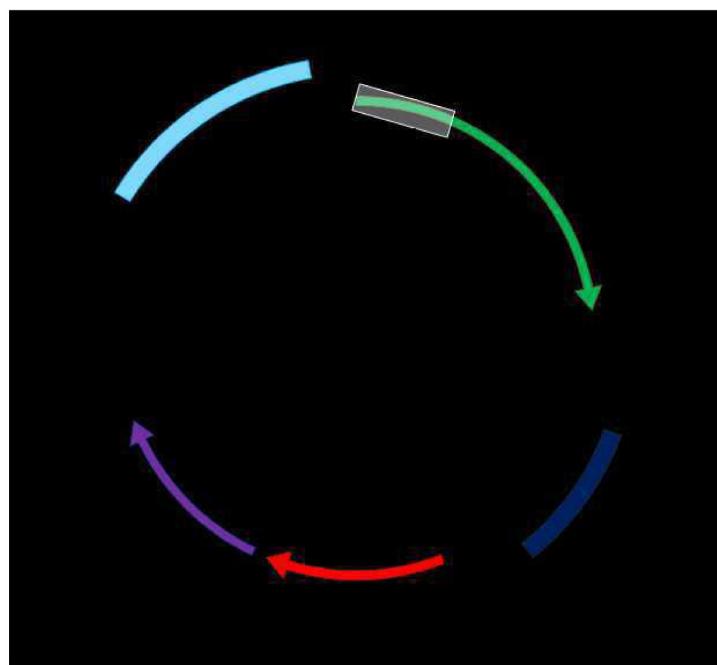
CAC2633		hypothetical protein	94	intergenic
CAC2634	<i>perR</i>	ferric uptake regulator	124	intergenic
CAC2647		arginase family hydrolase	132	intergenic
CAC2658	<i>glnA</i>	glutamine synthetase type III	187	intergenic
CAC2680		glucose-6-phosphate isomerase	260	intergenic
CAC2681		hypothetical protein	73	intergenic
CAC2712	<i>crt</i>	3-hydroxybutyryl-COA dehydratase	28	intergenic
CAC2773		AcrR family transcriptional regulator	337	intergenic
CAC2838		nucleotide-binding protein	15	intergenic
CAC2873	<i>thl</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	144	intergenic
CAC3311		TPR-repeat domain fused to glycosyltransferase	263	coding region
CAC3355		polyketide synthase PksE	232	intergenic
CAC3356		lactoylglutathione lyase	112	intergenic
CAC3370		predicted transcriptional regulator	211	intergenic
CAC3371		2-enoate reductase	21	intergenic
CAC3423		acetyltransferase	81	intergenic
CAC3660		hypothetical protein	137	coding region
CAC3671	<i>amyD</i>	ABC-type sugar transport system	296	coding region
CAC3674		CBS domain-containing protein	51	intergenic
CAP0035	<i>adhE2</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	245	intergenic
CAP0139		D-alanyl carrier protein	118	intergenic
CAP0140		membrane protein, transporter	270	intergenic



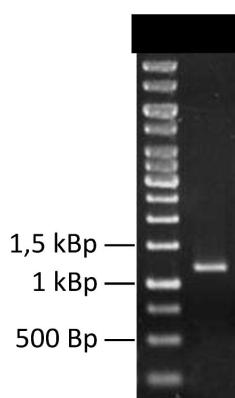
**Abb. A.1: Vektor-Karte von pMTL007C-E2 (zur Verfügung gestellt von Daniela Wetzel).** Das ClosTron-Plasmid der zweiten Generation besitzt den starken konstitutiven *fdx*-Promotor (*C. sporogenes*), um die Expression des ClosTrons (Gruppe II Introns) zu steuern. Farblich hervorgehoben ist das ClosTron (dunkelrot) und die zwischen den Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bsr*GI (Bsp1407I) befindliche *lacZα*-Sequenz (orange) sowie das angepasste 350-Bp-Intron (dunkelgrün). Weiterhin ist der selektive Marker (RAM-E2), das LtrA-Protein, die Chloramphenicol-Resistenz (catP-Gen) dargestellt. Ebenso besitzt das Plasmid einen „Origin of replication“ (ori) für Gram-positive (repH) und Gram-negative Bakterien (CoIE1).



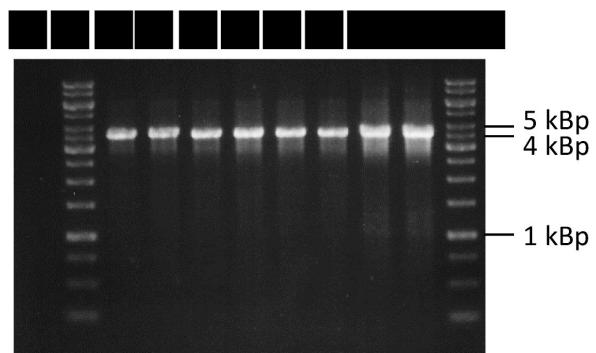
**Abb. A.2: Intron-Amplifikate.** Dargestellt sind mittels SOE-PCR amplifizierte *rex*-Intronfragmente, welche spezifisch an *rex* (CAC2713) angepasst wurden. Die Amplifikate wurden in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt und Spur 1 bis 4: *rex*-Intronfragmente, Spur 5: Größenstandard (1-kBp-Marker).



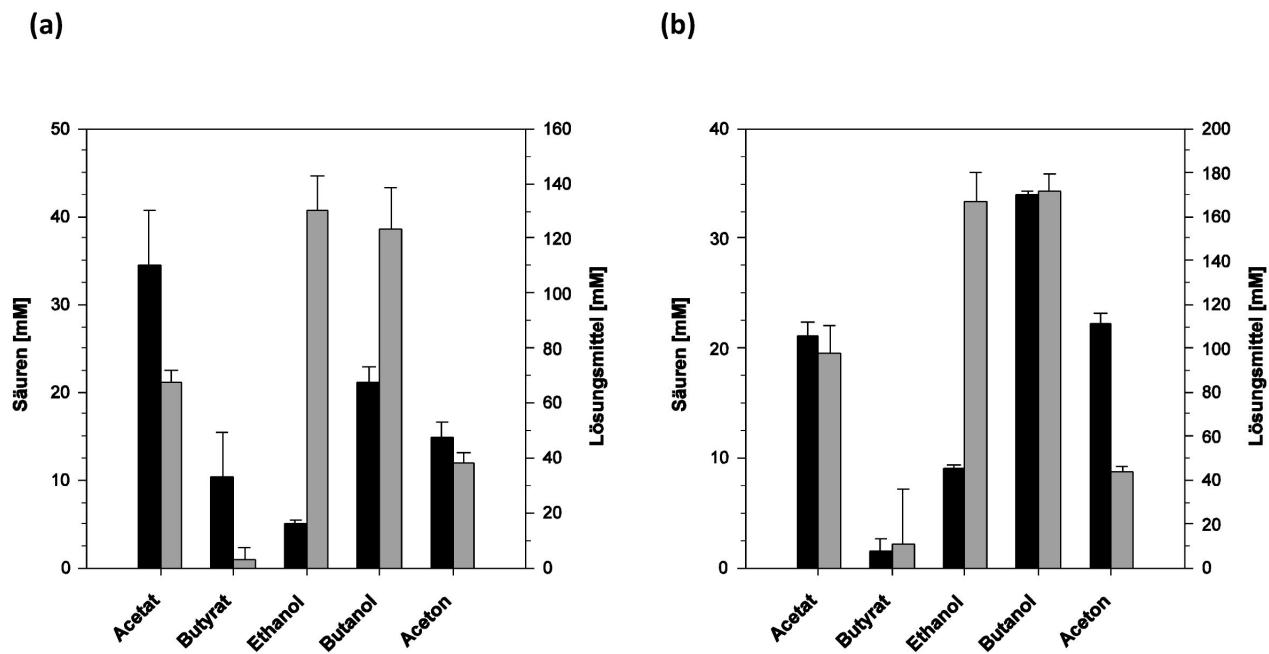
**Abb. A.3:** Vektorkarte von pCons::upp-rex (Soucaille et al., 2006; mod.). Dargestellt ist der Vektor pCons::upp-rex. Hervorgehoben ist das, zwischen den Restriktionsschnittstellen BamHI befindliche Komplementationsfragment von rex (grün) mit der 5'UTR (prex, hellgrün), der Chloramphenicolresistenz (rot) sowie dem Replikationsursprung für Gram-negative (hellblau) und Gram-positive Bakterien (dunkelblau).



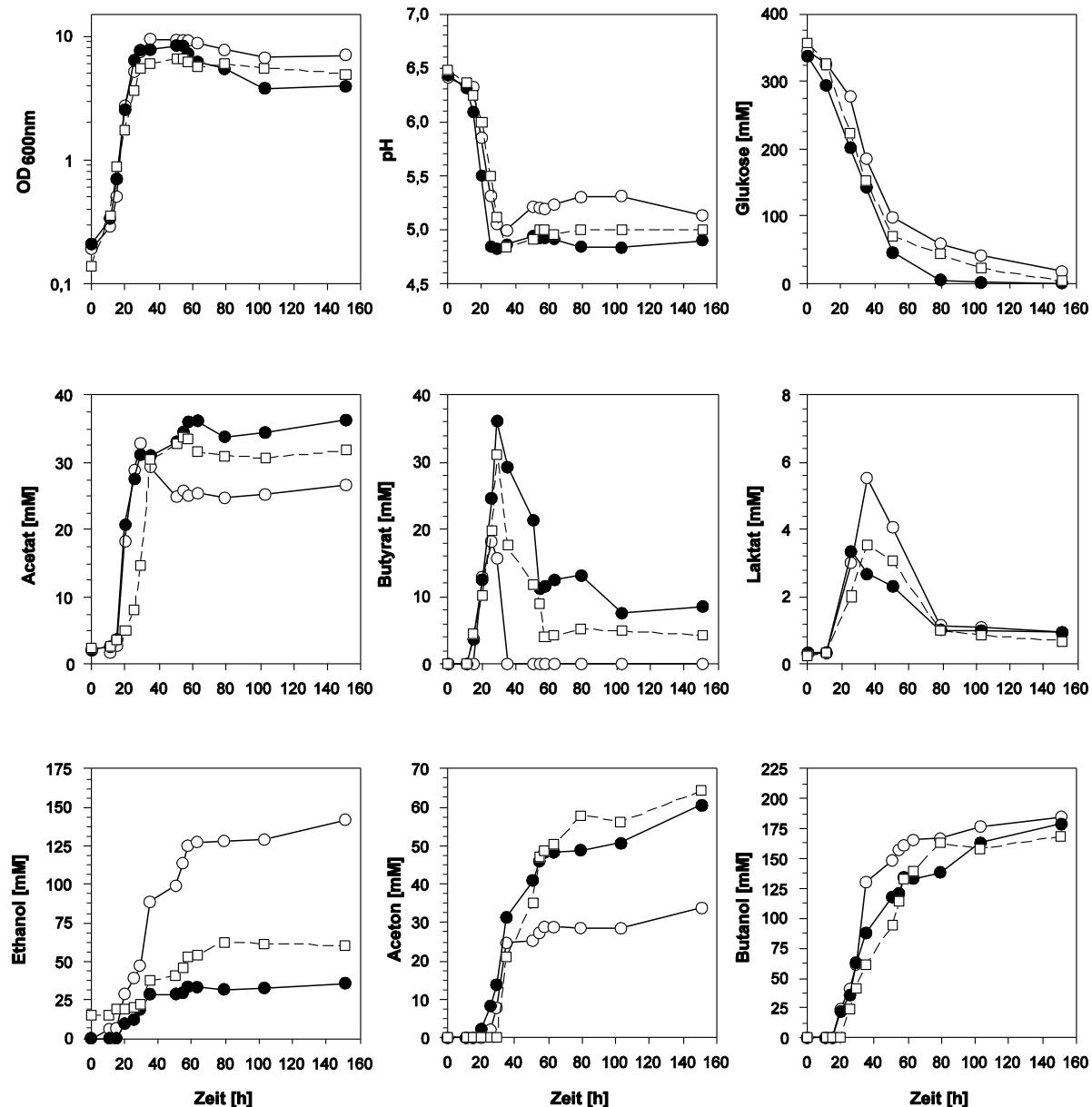
**Abb. A.4:** Komplementationsfragment von rex. Das durch eine PCR erzeugte DNA-Fragment zur Komplementation von Rex wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt und in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 2: rex-Komplementationsfragment (1,2 kBp).



**Abb. A.5:** Nachweis von pCons::upp-rex in *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl*. Mittels PCR-Screening wurde die Existenz von pCons::upp-rex im Stamm *rex::int(95)\_compl* untersucht. Dazu wurde ausschließlich der Vektor der Erythromycin- sowie Chloramphenicol-resistenten Klone amplifiziert und anschließend die Reaktionsansätze in einem 0,8 %igen [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: *rex::int(95)* (kein Fragment), Spur 2 und 11: Größenstandard (1-kBp-Marker), Spur 3 bis 10: *rex::int(95)\_compl*-Klone (4 kBp).



**Abb. A.6:** Durchschnittliche Produktkonzentrationen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum rex::int(95)* nach 60 h und 180 h Kultivierung. Die Diagramme zeigen eine Übersicht der durchschnittlichen Produktkonzentrationen von *rex::int(95)* im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten sind aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten zusammengefasst. (a) Nach 60 h, *C. acetobutylicum* ATCC 824 (schwarze Balken), *C. acetobutylicum rex::int(95)* (graue Balken). (b) Nach 180 h, siehe (a).



**Abb. A.7:** Wachstum und Stoffwechselprodukte von der Stämme *C. acetobutylicum rex::int(95)* und *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824. Dargestellt ist ein repräsentativer Datensatz der untersuchten Bakterienstämme. (a) Die statische Kultivierung erfolgte in 200 ml MS-MES ohne Zusatz von Acetat mit Glukose als C-Quelle bei 37 °C. In regelmäßigen Abständen wurden die optische Dichte und der pH-Wert gemessen. Glukose und Laktat wurden enzymatisch bestimmt und die Erfassung der Produktkonzentrationen erfolgte gaschromatographisch. *C. acetobutylicum* ATCC 824 (●), *C. acetobutylicum rex::int(95)* (○), *C. acetobutylicum rex::int(95)\_compl* (□).

## Danksagung

Zunächst bedanke ich mich sehr herzlich bei **Prof. Dr. Hubert Bahl** für die Überlassung des Themas, das große Interesse am Fortgang der Arbeit, das Vertrauen sowie die Möglichkeit zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Weiterhin danke ich ganz außerordentlich **Dr. Ralf-Jörg Fischer** und **Dr. Tina Lütke-Eversloh** für die unzähligen Diskussionen mit vielen konstruktiven Ideen und Hinweisen, sowie für die ständige Gesprächsbereitschaft mit kritischen und anspruchsvollen Worten. Außerdem bedanke ich mich bei **Dr. Tina Lütke-Eversloh** für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt **Dr. Antje May** nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit sondern vor allem für die ermutigenden Worte nach kleineren oder größeren Krisen, sowie für die ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag und die enge Freundschaft. Des Weiteren bedanke ich mich besonders bei **Dr. Tomas Fiedler** für den konstruktiven Gedankenaustausch und das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich auch sehr bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie der Universität Rostock, dabei besonders bei **Dr. Holger Janssen, Dr. Falk Hillmann, Dr. Oliver Riebe, Dr. Michael Scheel, Dr. Dörte Lehmann, Dr. Miriam Mann, Dr. Franziska Schulz, Ilona Boldt, Monika Timm, Hella Goschke, Regina Karstädt, Christine Voigt, Deliana Vasileva, Katja Zimmermann, Daniela Wetzel, und Ronny Uhlig** für Hilfestellungen jeglicher Art und die gute Stimmung bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Ehemann **Kevin Wietzke** und meinen Kindern **Lilly** und **Karl Wietzke**, die mich moralisch unterstützt, nach Rückschlägen wieder aufgebaut haben und dies auch immer noch tun. Ihr ununterbrochenes Vertrauen und Liebe haben mir immer Kraft gegeben. Zudem bedanke ich mich ganz aufrichtig bei meinen Eltern **Bärbel** und **Willfried Zechlau** sowie meinen Schwiegereltern **Karin** und **Burkhard Wietzke** für ihre enormen Ermutigungen und Aufmunterungen während dieser Zeit.

Abschließend sei allen noch nicht genannten Mitgliedern der Abteilung Mikrobiologie und Biochemie, sowie denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gedankt.

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Rostock, den 28.05.2013

Mandy Wietzke