



Die Rolle der Arginin-Biosynthese bei der Salzstressantwort von *Clostridium acetobutylicum*

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Maria Lehmann

geboren am 15.04.1989 in Lauchhammer

Hanse- und Universitätsstadt Rostock, 20.07.2020

Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Prof. Dr. Martin Hagemann

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften, Pflanzenphysiologie

Datum der Einreichung: 20.07.2020

Datum der Verteidigung: 06.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnisverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	2
2.1 Überleben von Mikroorganismen bei osmotischem Stress	2
2.2 Die Salzstressantwort von <i>B. subtilis</i>	4
2.2.1 Physiologische Anpassungsmechanismen	4
2.2.2 Genregulation unter Salzstress	7
2.3 Der Modellorganismus <i>Clostridium acetobutylicum</i>	8
2.3.1 Physiologie und Genetik	8
2.3.2 ABE-Fermentation und Salzstress.....	11
2.4 Zielstellung.....	14
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide.....	16
3.2 Nährmedien	16
3.2.1 Nährmedium für <i>B. subtilis</i>	16
3.2.2 Nährmedium für <i>E. coli</i>	17
3.2.3 Nährmedien für <i>C. acetobutylicum</i>	17
3.2.4 Medienzusätze.....	18
3.3 Zellanzucht.....	19
3.3.1 Aerobe Zellanzucht von <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	19
3.3.2 Anaerobe Zellanzucht von <i>C. acetobutylicum</i>	19
3.3.2.1 Anzucht in statischer Kultur (Batch-Kultur).....	19
3.3.2.2 Anzucht auf Festmedium.....	20
3.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle	20
3.5 Bestimmung physiologischer Parameter.....	20
3.5.1 Optische Dichte	20
3.5.2 Berechnung von Wachstumsrate und Verdopplungszeit.....	21
3.5.3 Messung des externen pH-Wertes.....	21
3.5.4 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung	21
3.5.5 Gaschromatografie	22
3.5.5.1 Probenvorbereitung und Quantifizierung.....	22
3.5.5.2 Analysebedingungen	23
3.6 Analyse von kompatiblen Soluten.....	23
3.6.1 Vorbereitung der Proben	23

3.6.2	Zellaufschluss von <i>C. acetobutylicum</i> mittels FastPrep®	24
3.6.3	Prolin-Assay	24
3.6.4	Glycin Betain-Bestimmung	25
3.6.5	HPLC-Analysen	26
3.7	Arbeiten mit Nukleinsäuren	26
3.7.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	26
3.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
3.7.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	26
3.7.4	RNA-Seq	27
3.7.5	PCR-Techniken	28
3.7.5.1	Primerdesign	28
3.7.5.2	Standard-PCR	28
3.7.5.3	<i>Colony</i> -PCR	29
3.7.5.4	<i>Splicing by overlap extension</i> -PCR (SOE-PCR)	29
3.7.6	Enzymatische Modifikationen von DNA	30
3.7.6.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	30
3.7.6.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	30
3.7.6.3	Ligation von DNA-Fragmenten	30
3.7.6.4	<i>In vivo</i> Methylierung von Plasmid-DNA	31
3.7.7	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.7.7.1	Standard-Gelelektrophorese	31
3.7.7.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung von Nukleinsäuren	32
3.8	Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen	32
3.8.1	CaCl ₂ -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	32
3.8.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	32
3.8.3	DNA-Transfer in <i>C. acetobutylicum</i>	33
3.8.4	ClosTron® Insertionsmutagenese	33
3.9	Übertragung von DNA auf Membranen (<i>Southern Blot</i>)	34
3.9.1	Southern Blot	34
3.9.2	Hybridisierung der Membran	34
3.9.3	Detektion Digoxigenin-markierter DNA	35
3.10	Statistische Auswertung	36
3.11	Bezugsquellen	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> unter Salzstress	37
4.2	Einfluss von kompatiblen Soluten	44
4.2.1	Der intrazelluläre Aminosäurepool von <i>C. acetobutylicum</i>	45
4.2.2	Supplementierung von <i>C. acetobutylicum</i> mit kompatiblen Soluten	48

4.3 Die <i>argR</i> -Mutanten von <i>C. acetobutylicum</i>	53
4.3.1 Erzeugung und Verifizierung einer <i>argR</i> -Insertionmutante in <i>C. acetobutylicum</i>	55
4.3.2 ArgR-Überexpression.....	60
4.3.3 Wachstumsphysiologische Charakterisierung der <i>argR</i> -Mutanten	62
4.4 Transkriptomanalyse von <i>C. acetobutylicum</i> unter Salzstress	70
4.4.1 Enrichment-Analysen mittels STRING.....	71
4.4.2 Klassifikation der differentiell exprimierten Gene.....	74
5 Diskussion	79
5.1 Salzstress beeinflusst das Wachstum und die ABE-Bildung	79
5.2 Die Rolle von kompatiblen Soluten bei der Salzstressreaktion	83
5.2.1 Prolin und GB in der Salzstressantwort von <i>C. acetobutylicum</i>	85
5.2.2 Arginin als Schutzsubstanz unter Stresseinwirkung.....	88
5.3 Die Rolle der Arginin-Biosynthese in der Salzstressantwort von <i>C. acetobutylicum</i>	89
5.3.1 Inaktivierung von ArgR hat Einfluss auf die Biofilm-Bildung	91
5.3.2 Auswirkungen von Salzstress und ArgR-Inaktivierung auf die Sporulation	92
5.3.3 Verstärkung der Lösungsmittelbildung durch ArgR-Inaktivierung	94
5.3.4 Aminosäure-vermittelte Stresstoleranz der Insertionsmutante.....	95
5.3.5 Verknüpfung der Aminosäure-Biosynthesen in <i>C. acetobutylicum</i>	97
5.4 Fazit und Ausblick	99
6 Literaturverzeichnis.....	100
7 Anhang	114
Danksagung	135
Selbstständigkeitserklärung	137

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Adenin, Ampere
<i>A.</i>	Aqua
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABE	Aceton, Butanol und Ethanol
<i>ad</i>	auffüllen auf
Adc	Acetoacetat-Decarboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
<i>argD</i>	Acetylornithin-Aminotransferase-Gen
<i>argR</i>	Gen des Arginin-Repressors (<i>cac2074</i>)
ArgR	Arginin-Repressor
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
c	Konzentration, centi (10^{-2})
C	Kohlenstoff, Cytosin
C-	Carboxy-
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
ca.	zirka
CAC	<i>C. acetobutylicum</i> Chromosom
CGM	<i>Clostridial Growth Medium</i>
Chl	Chloramphenicol
Cho	Cholin
CO_2	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
COG	<i>Cluster of Orthologous Groups</i>
CT	ClosTron
d	Schichtdicke, desoxy
D	<i>dextro</i> (rechts)
DEG	differentiell exprimierte Gen
<i>dest.</i>	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat

E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EBS	<i>Exon Binding Site</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat., und andere)
F	Farad
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
fw	<i>forward</i>
γ	gamma
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GB	Glycin Betain
GC	Gaschromatograph(ie)
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Stunde
H_2	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HydA	Hydrogenase
IBS	<i>Intron Binding Site</i>
IS	interner Standard
k	kilo (10^3)
K	Kontrolle
K^+	Kaliumionen
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentriert
l	Liter, Länge
L	<i>levo</i> (links)
LB	Luria-Bertani
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
μ	mikro (10^{-6}), Wachstumsrate
m	Meter, milli (10^{-3}), <i>messenger</i>
M	Molar, Marker, mega
MCP	methylakzeptierendes Chemotaxis-Protein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mod.	modifiziert
MS	<i>medium synthetique</i>
Msc	<i>mechanosensitive channel</i>

MW	Molekulargewicht, Mittelwert
n	Nano (10^{-9}), Anzahl der Versuche
N	Stickstoff, Normal
N-	Amino-
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrolotriessigsäure
NTA	Nitrolotriessigsäure
OAT	Ornithin- δ -Aminotransferase
OD	optische Dichte
Opu	Osmolytenaufnahmesystem
ORF	offener Leserahmen
Φ	phi
P	Promotor, Phosphat
PABA	Para-aminobenzoësäure
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
PTS	Phosphoenolpyruvat-Transferasesystem
R	Resistenz
RAM	<i>Retrotransposition-activated Marker</i>
RCA	<i>Reinforced Clostridial Agar</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s. u.	siehe unten
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq	Sequenzierung
Sig	Sigmafaktor
SMM	Spizizen Minimal Medium
SOE	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
Suc	<i>sucrose</i> (Saccharose)
t	Zeit

Tet	Tetracyclin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trikarbonsäure-Zyklus
td	Verdopplungszeit
<i>thlA</i>	Thiolase A-Gen
Tm	Thiamphenicol
TM	Trockenmasse
T _m	Schmelztemperatur
Tre	Trehalose
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	<i>Units</i>
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
VF	Verdünnungsfaktor
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnisverzeichnis

Abbildung 2.1 - Reaktion von Bakterien auf osmotischen Stress	2
Abbildung 2.2 - Charakteristische kompatible Solute.....	5
Abbildung 2.3 - Komponenten der Salzstressantwort von <i>B. subtilis</i>	6
Abbildung 2.4 - Der Zellzyklus von <i>C. acetobutylicum</i>	9
Abbildung 2.5 - Schema ausgewählter Stoffwechselwege von <i>C. acetobutylicum</i>	10
Abbildung 2.6 - Umwandlung von nachwachsender Biomasse in Biokraftstoffe	12
Abbildung 4.1 - Einfluss von NaCl auf das Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i>	37
Abbildung 4.2 - Einfluss von NaCl auf die Bildung der Fermentationsprodukte	40
Abbildung 4.3 - Einfluss von NaCl auf die Lösungsmittelproduktivitäten.....	41
Abbildung 4.4 - Langzeitkultivierung von <i>C. acetobutylicum</i> bei verschiedenen NaCl- Konzentrationen.....	44
Abbildung 4.5 - Prozentualer Anteil der Aminosäuren am Aminosäure-Pool	46
Abbildung 4.6 - Intrazelluläre Prolin- bzw. GB-Konzentration von <i>B. subtilis</i> und <i>C. acetobutylicum</i>	47
Abbildung 4.7 - Einfluss von Supplementen auf das Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i>	48
Abbildung 4.8 - Supplementationsexperimente mit <i>C. acetobutylicum</i> bei 300 mM NaCl.....	49
Abbildung 4.9 - Einfluss von GB und Arginin auf das Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> unter Salzstress.....	50
Abbildung 4.10 - Einfluss von GB und Arginin auf die Produktbildung von <i>C. acetobutylicum</i> unter Salzstress.	52
Abbildung 4.11 - Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> in MS-MES ohne Glukose mit GB.....	53
Abbildung 4.12 - PCR-Amplifikate von <i>cac2074</i>	56
Abbildung 4.13 - Kontrollrestriktion rekombinanter pMTL007C-E2-Plasmide.	57
Abbildung 4.14 - Schematische der Integration des Gruppe-II-Introns in das <i>argR</i> -Gen.....	58
Abbildung 4.15 - Nachweis der Integration des Gruppe-II-Introns in das <i>argR</i> -Gen	58
Abbildung 4.16 - Verifikation der <i>argR</i> -Insertionsmutante durch Southern Hybridisierung.....	59
Abbildung 4.17 - Kontrollrestriktion rekombinanter pTc-Plasmide.	61
Abbildung 4.18 - Methylierung und Transformation des Plasmids pTc:: <i>argR</i>	62
Abbildung 4.19 - Wachstum der <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.	63
Abbildung 4.20 - Bildung der Säuren der <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	65
Abbildung 4.21 - Bildung der Lösungsmittel der <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	66
Abbildung 4.22 - Finales Produktspektrum der <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	67
Abbildung 4.23 - Lösungsmittelproduktivitäten der <i>C. acetobutylicum</i> -Mutanten.....	68

Abbildung 4.24 - Intrazelluläre Prolin-Konzentration der Insertionsmutante.....	69
Abbildung 4.25 - Makroskopischer Vergleich von Insertionsmutante und Wildtyp	70
Abbildung 4.26 - Enrichment-Analyse des Salzstress-Transkriptoms von <i>C. acetobutylicum</i>	71
Abbildung 4.27 - Enrichment-Analyse des Salzstress-Transkriptoms der Insertionsmutante	72
Abbildung 4.28 - Enrichment-Analyse des Transkriptoms von Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp.....	73
Abbildung 4.29 - Enrichment-Analyse des Salzstress-Transkriptoms von Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp	74
Abbildung 4.30 - DEGs des Salzstress-Transkriptoms von <i>C. acetobutylicum</i>	75
Abbildung 4.31 - DEGs des Salzstress-Transkriptoms von der Insertionsmutante.....	76
Abbildung 4.32 - DEGs des Transkriptoms von der Insertionsmutante verglichen zum Wildtyp.	77
Abbildung 5.1 - Maximale spezifische Produktivitäten von <i>C. acetobutylicum</i>	82
Abbildung 5.2 - Die „Recyclingform“ der Arginin-Biosynthese	90
Abbildung 7.1 - Einfluss von Aminosäuren auf das Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i>	119
Abbildung 7.2 - Statistik von Wachstum und Fermentationsprodukten des Wildtyps.	122
Abbildung 7.3 - Statistik des Langzeitwachstums des Wildtyps.....	123
Abbildung 7.4 - Statistik des Wachstums bei 300 mM NaCl mit Supplementierung	124
Abbildung 7.5 - Statistik des Wachstums mit Arginin- und GB-Supplementierung	127
Abbildung 7.6 - Statistik des Wachstums und der Fermentationprodukte der Mutanten.....	128
Abbildung 7.7 - Plasmidkarte von pMTL007C-E2	129
Abbildung 7.8 - Schematische Darstellung des pTc:: <i>hydA</i> -Vektors.....	129
Abbildung 7.9 - Sequenzierung der Nukleotidsequenz von pTc:: <i>argR</i>	130
Abbildung 7.10 - Sequenzierung der Nukleotidsequenz von pMTL007C:: <i>argR</i>	130
Abbildung 7.11 - <i>Intron targeting design</i> Ergebnis für das Gen <i>cac2074</i> (<i>argR</i>).	131
Abbildung 7.12 - Transkriptomdaten ausgewählter Gene von <i>C. acetobutylicum</i>	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - ArgR-Box Konsensussequenz und Gene des ArgR-Regulons	54
Tabelle 2 - Ergebnis der Identifizierung des Intron-Zielortes	55
Tabelle 3 - Organismen	114
Tabelle 4 - Vektoren	114
Tabelle 5 - Rekombinante Plasmide	115
Tabelle 6 - Oligonukleotide	115
Tabelle 7 - Restriktionsendonukleasen	115
Tabelle 8 - Antibiotika	116
Tabelle 9 - Bezugsquellen für Chemikalien	116
Tabelle 10 - Bezugsquellen für Geräte und Materialien	117
Tabelle 11 - Gruppierung und Einteilung der COG-Klassen	131

1 Zusammenfassung

1. Wachstumspysiologische Untersuchungen von *C. acetobutylicum* unter Salzstress identifizierten eine Schwellenkonzentration von 300 mM NaCl, ab der eine signifikante Reduktion der Wachstumsparameter, der Lösungsmittelbildung und des Ertrages auftraten.
2. Den Hauptteil des Aminosäurepools von *C. acetobutylicum* bildeten Glutamat (21 %) und Alanin (26 %). Mit ansteigender Salzkonzentration nahm der Anteil von Glutamat zu, während der von Alanin zurückging (39 % bzw. 19 % bei 400 mM NaCl).
3. Die kompatiblen Solute Prolin und GB wurden von *C. acetobutylicum* weder unter Salzstress, noch in salzfreiem Medium, durch Eigensynthese akkumuliert. Die Supplementierung mit GB hingegen ermöglichte dessen Aufnahme und Akkumulation während des Wachstums, vor allem verstärkt unter Salzstress (136,9 μ M GB/g TM).
4. Supplementationsexperimente zeigten einen positiven Effekt von GB auf das Wachstum bzw. eine Verdopplung der Lösungsmittelbildung durch Arginin-Zugabe.
5. Mittels Clostron® konnte die Inaktivierung des Repressors der Arginin-Biosynthese, ArgR, von *C. acetobutylicum* realisiert werden. Die generierte Insertionsmutante *argR92a::CT* zeigte im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Transkriptlevel der Arginin-Biosynthesegene, sowie eine signifikant höhere Lösungsmittelbildung, sowohl unter Salzstress, als auch in salzfreiem Medium.
6. Vor allem die Tryptophan- und Histidinbiosynthese spielen aufgrund stark erhöhter Transkriptlevel eine Rolle bei der Salzstressantwort, sowohl beim Wildtyp als auch der Insertionsmutante von *C. acetobutylicum*.
7. Erhöhte Transkriptlevel der Histidin-, Tryptophan- und Lysin-Biosynthesegene der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp weisen auf eine Co-Regulation durch ArgR hin, wohingegen die Gene der verzweigtkettigen Aminosäuren unabhängig exprimiert werden.
8. Eine Verknüpfung der Prolin- und Arginin-Biosynthese zeigte sich durch signifikant erhöhte intrazelluläre Prolinkonzentrationen der Insertionsmutante, die vermutlich auf eine Bifunktionalität von ArgD zurückzuführen sind. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte bei der Insertionsmutante außerdem eine Akkumulation von Prolin unter Salzstress detektiert werden.

2 Einleitung

2.1 Überleben von Mikroorganismen bei osmotischem Stress

Bakterien besiedeln nahezu alle erdenklichen Lebensräume der Erde und sind vom tiefsten Meeresboden bis hin zu den höchsten Bergen zu finden. Diese verschiedenen Lebensräume werden durch unterschiedliche physikochemische Parameter charakterisiert, an die sich die Mikroorganismen anpassen müssen um zu überleben (Schlegel und Jannasch 2006). Treten innerhalb dieser Parameter Schwankungen auf, so bedeutet dies Stress für die Bakterien, denn sie müssen auf diese veränderten Umweltbedingungen reagieren. Osmotischer Stress trifft Bakterien in zahlreichen Habitaten: vom Boden, über Süß- und Salzwasser bis hin zu Lebensmitteln oder bei der Besiedlung des Menschen (Billi und Potts 2002; Madigan *et al.* 2019; Oren 2013). Er tritt auf, wenn der osmotische Druck des Milieus sich verändert, extrem hoch oder extrem niedrig ist (Altendorf *et al.* 2009; Wood 2011). Die dabei entstehenden Effekte auf die bakterielle Zelle sind in Abbildung 2.1 vereinfacht dargestellt.

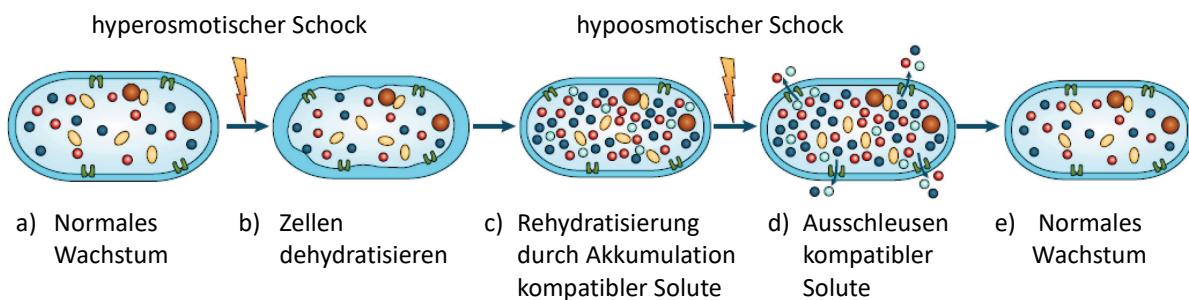


Abbildung 2.1 - Reaktion von Bakterien auf osmotischen Stress (Booth *et al.* 2007, mod.).

Bakterien nutzen die Akkumulation von Kaliumionen (rot), Glutamat (dunkelblau) und kompatible Solute (hellblau) zur Steuerung der intrazellulären Osmolarität. Während diese Osmolyte durch mechanosensitive Kanäle wieder ausgeschleust werden können, verbleiben große Proteine und gelöste Stoffe (braun und gelb) im Cytoplasma. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Auswirkungen von osmotischem Stress auf Bakterien sind zum einen abhängig von den gelösten Stoffen im Zytosol im Vergleich zum besiedelten Milieu. Zum anderen spielen die Permeabilität und die mechanischen Eigenschaften der bakteriellen Zellwand und -membran eine wichtige Rolle. Die semipermeable Zytosolmembran sorgt dafür, dass Wasser ungehindert in die Zelle einströmen kann, im Wasser gelöste Substanzen wie Makromoleküle, Ionen und organische Verbindungen werden jedoch zurückgehalten (Bovell *et al.* 1963; Madigan *et al.* 2019). Um Wachstum zu gewährleisten, sind Bakterien bestrebt, die intrazelluläre Konzentration osmotisch aktiver Substanzen höher als die des umgebenden Mediums zu halten. So kann Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle einströmen und einen gegen die Zellwand gerichteten hydrostatischen Druck, den sogenannten Turgor, aufbauen (Abbildung 2.1, A). Die Aufrechterhaltung des Turgors stellt dabei eine wichtige Grundlage für das bakterielle Zellwachstum, die Membranspannung und Zellwandsynthese dar (Taiz 1984; Whatmore und

Reed 1990; Rojas *et al.* 2017). Gelangen Bakterien in ein hyperosmolares Milieu, so kommt es zur Dehydratisierung und Plasmolyse des Zytoplasmas durch den Ausstrom von Wasser aus der Zelle (Abbildung 2.1, B). Um dem Zusammenbruch des Turgors entgegenzuwirken und das osmotische Gleichgewicht mit ihrem Milieu wiederherzustellen, nutzen Bakterien osmotisch aktive Verbindungen, die so genannten kompatiblen Solute (*compatible solutes*, Brown 1976). Diese Osmolyte können durch *de novo*-Synthese oder durch Aufnahme aus der Umwelt akkumuliert werden und wirken so dem Ausstrom von Wasser sowie dem Einstrom von anorganischen Ionen entgegen (Abbildung 2.1, C). Unter hypoosmotischen Bedingungen strömt Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zellen ein und der daraus resultierende Anstieg des Turgordrucks kann zur Lyse der Zellen führen. Eine unter den Bakterien weit verbreitete Strategie zur Senkung des Wassereintrags ist der schnelle und unselektive Ausstoß von Ionen und osmotisch aktiven Substanzen aus dem Cytoplasma durch die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle (Abbildung 2.1, D) bis sich erneut ein osmotisches Gleichgewicht einstellt (Abbildung 2.1, E) (Berrier *et al.* 1992; Poolman und Glaasker 1998; Wahome *et al.* 2009; Rojas *et al.* 2017).

Neben der Veränderung des Turgordrucks hat osmotischer Stress noch weitere negative Effekte auf Zellstruktur, -physik und -chemie. Vor allem unter hyperosmolaren Bedingungen sind Bakterien weiteren, zusätzlichen Stressoren ausgesetzt. Zum einen führt der Wasserverlust zur Reduzierung des zytoplasmatischen Volumens. Dadurch kommt es zur Ablösung und Faltenbildung der Plasmamembran, wodurch membrandurchspannende Proteine zerstört und die Flagellenfunktion beeinträchtigt werden (Okrend und Doetsch 1969; Wood 2011). Ein reduzierter Wassergehalt verringert außerdem die Hydrathüllen von Proteinen und Nucleinsäuren, die durch Denaturierung und Mutationen beschädigt werden und ihre Funktion nicht mehr ausführen können (Billi und Potts 2002). Zum anderen werden die Zellen Stress durch hohe Konzentrationen von anorganischen Ionen ausgesetzt. Treten zusätzlich zum osmotischen Stress auch noch ionenspezifischen Effekte auf, wird daher von Salzstress gesprochen (Hagemann 2011; Wood 2011). Eine hohe Konzentration anorganischer Ionen, insbesondere Natrium- und Chloridionen, im Zytosol hat direkte toxische Auswirkungen auf verschiedene Stoffwechselprozesse. So kann die Bindung von RNA und anionischen Metaboliten (z. B. Bikarbonat, Carboxylate, Zuckerphosphate) durch Chloridionen beeinträchtigen werden, da sie anionische Bindestellen blockieren. Natriumionen hingegen stören kationische Bereiche, die z. B. für die Bindung von Kaliumionen, Kalzium oder Magnesium nötig sind (Serrano *et al.* 1999). Vor allem kaliumabhängige Stoffwechselprozesse sind empfindlich gegenüber hohen Natriumkonzentrationen, da beide Ionen um die gleichen Bindestellen konkurrieren. Neben ähnlichen physikochemischen Eigenschaften entspricht das kleinere Ion Natriumion durch seine große Hydrathülle auch der Größe des Kaliumions. Daher können Kaliumtransporter nicht zwischen diesen Ionen unterscheiden, wodurch hohe Natriumkonzentrationen zu einem Kaliummangel führen können (Hagemann 2011).

Um trotz der zahlreichen negativen Effekte von Salzstress dennoch ihr Überleben und Wachstum zu sichern, benötigen Bakterien entsprechende Schutz- und Anpassungsreaktionen. Allgemein haben sie dabei zwei verschiedene Strategien entwickelt. Die so genannte *salt-in*-Strategie wird von

einigen spezialisierten Vertretern der halophilen Archaeen und Bakterien genutzt. Sie sind an extrem salzhaltige Habitate angepasst und halten eine sehr hohe zytoplasmatische Konzentration von Kaliumionen aufrecht. Auch der Stoffwechsel dieser Mikroorganismen ist an ihr Habitat angepasst, sodass viele ihrer Enzyme und Strukturproteine einen kontinuierlich hohen Salzgehalt zur Aktivität und Stabilität benötigen (Müller und Oren 2003; Oren 2013). Die zweite Möglichkeit der Salzstressantwort wird vom Großteil der Organismen verwendet und als *salt-out*-Strategie bezeichnet. Hierbei wird durch aktives Pumpen von Ionen aus der Zelle verhindert, dass hohe Salzkonzentrationen das Zytoplasma erreichen. So können die Bakterien eine niedrige intrazelluläre Ionenkonzentration aufrechterhalten. Das osmotische Gleichgewicht wird durch die Akkumulation von Osmolyten erreicht (Abbildung 2.1 c), die entweder von den Bakterien selbst produziert oder aus dem Medium aufgenommen werden (Hagemann 2011; Oren 2013).

Die Salzstressantwort ist für den Gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* detailliert untersucht und beschrieben. Insbesondere die Identifizierung der Aufnahme- und Syntheseapparate von osmoprotektiven Substanzen führte zu einem besseren Verständnis der Salzanpassung auf genetischer und Proteinebene (Kempf und Bremer 1998). Der Ablauf und die beteiligten Synthese- und Transportproteine der Salzstressantwort von *B. subtilis* sollen daher im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

2.2 Die Salzstressantwort von *B. subtilis*

2.2.1 Physiologische Anpassungsmechanismen

B. subtilis ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, Endosporen bildendes Bodenbakterium, das in der Natur weit verbreitet ist. Als Bewohner der oberen Bodenschichten ist es häufigen Schwankungen des Salzgehaltes ausgesetzt, z. B. durch Überflutung und Austrocknung. Daher besitzt es effiziente Mechanismen zur Stressanpassung, um das Wachstum und Überleben zu sichern. Intensive Untersuchungen führten zur Identifizierung der Aufnahme- und Syntheseapparate von osmoprotektiven Substanzen (Abbildung 2.3) und zu einem besseren Verständnis der Osmoregulation auf genetischer und Proteinebene (Kempf und Bremer 1998; Hoffmann und Bremer 2016, 2017). Wie viele andere Bakterien, so reagiert auch *B. subtilis* auf eine plötzliche Zunahme der externen Salzkonzentration mit einer schnellen Aufnahme von Kaliumionen (Whatmore *et al.* 1990). Die erhöhte Kaliumkonzentration dient als erster Schutz der Zellen gegen das Ausströmen von Wasser und dem damit drohenden Turgorzusammenbruch. Die Aufnahmesysteme für Kaliumionen gehören zur Familie der Ktr-Kationenkanäle sowie ein möglicherweise Kalzium-gesteuerter MthK-ähnlicher Kanal (Abbildung 2.3, Hoffmann und Bremer 2016.) Mit diesen Kanälen ist *B. subtilis* in der Lage, unter Salzstress seine Kaliumkonzentration im Zytoplasmata zu verdoppeln (Whatmore *et al.* 1990). Als Nutzer der *salt-out*-Strategie ist der Metabolismus von *B. subtilis* jedoch nicht darauf ausgelegt, langanhaltend hohe Kaliumkonzentration zu tolerieren. Daher wird das anfangs angehäufte Kalium in einem zweiten Schritt der Anpassung durch organische Osmolyte ersetzt (Whatmore *et al.* 1990; Kempf und

Bremer 1998). Diese speziellen Osmolyte werden als *compatible solutes* bezeichnet, da sie in hohen Konzentrationen im Zytosol akkumuliert werden können ohne den Zellmetabolismus zu stören (Brown 1976). Im Allgemeinen handelt es sich dabei um niedermolekulare, lösliche organische Verbindungen. Diese können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen handelt es sich dabei um α - und β -Aminosäuren sowie deren Derivate wie z. B. Glycin Betain (GB) oder Prolin (Abbildung 2.2, A). Zur zweiten Gruppe zählen Zucker und Polyole, wie z. B. Sucrose und Trehalose (Abbildung 2.2, B).

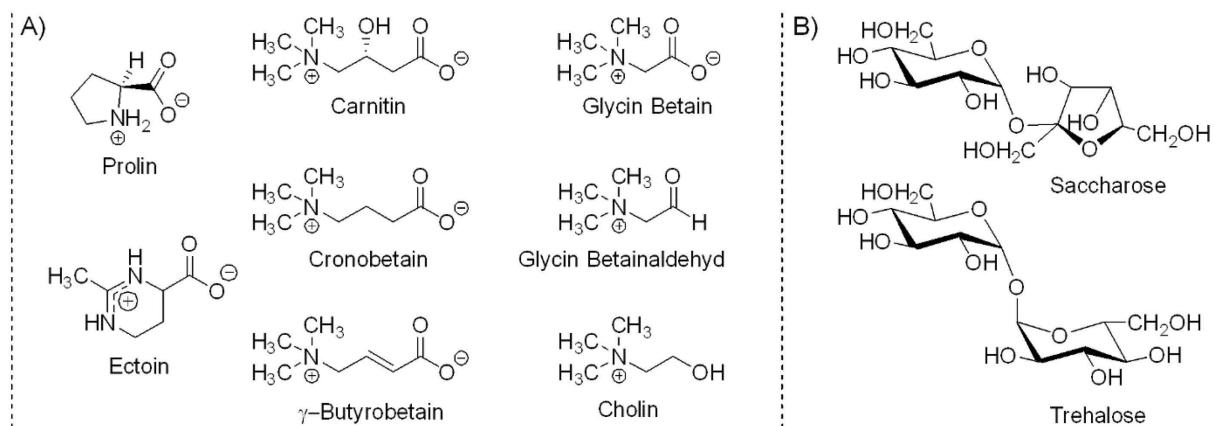


Abbildung 2.2 - Charakteristische kompatible Solute (Kempf und Bremer 1998, Hagemann 2011, mod.).

(A) Aminosäuren und Derivate, die häufig von *B. subtilis* akkumuliert werden. (B) Zuckerartige kompatible Solute, wie z. B. von Cyanobakterien genutzt werden.

Die schützende Wirkung der kompatiblen Solute begründet sich zum einen in ihrer Fähigkeit, den Wasserausstrom aus salzgestressten Zellen zu verhindern. So wird durch den Austausch von Kalium gegen organische Osmolyte die Ionenstärke des Zytosplasmas reduziert, Turgordruck und Wassergehalt der Zelle jedoch nicht beeinträchtigt (Wood 2011). Zum anderen wirken sich die akkumulierten Osmolyte positiv auf die Stabilität und Löslichkeit von Proteinen aus und erhalten deren korrekte Funktion unter ansonsten denaturierenden Bedingungen (Kempf und Bremer 1998; Wood 2011). Der Kaliumexport in *B. subtilis* ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass neben dem bisher beschriebenen Kationen-Protonen-Antiporter KhtTU weitere Kaliumexporter in *B. subtilis* präsent sind (Hoffmann und Bremer 2016). Im Gegensatz dazu ist der Transport und die Akkumulation von Osmolyten in *B. subtilis* schon lange detailliert untersucht und physiologisch sowie molekular charakterisiert (Kappes *et al.* 1996; Blohn *et al.* 1997; Kempf und Bremer 1998; Hoffmann und Bremer 2017). Bisher sind 15 natürlich vorkommende kompatible Solute identifiziert, die als Schutzsubstanzen für *B. subtilis* unter Salzstress dienen (Hoffmann und Bremer 2011, 2017). Sie sind hauptsächlich mit Prolin oder GB chemisch verwandt und werden durch hochaffine Aufnahmesysteme von osmotisch gestressten *B. subtilis*-Zellen akkumuliert oder synthetisiert (Kempf und Bremer 1998).

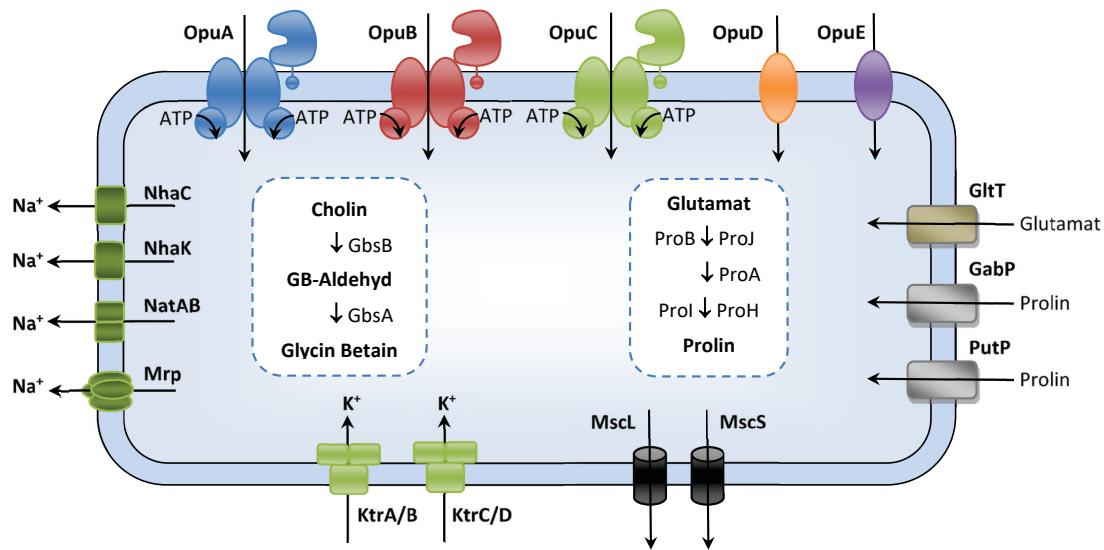


Abbildung 2.3 - Komponenten der Salzstressantwort von *B. subtilis* (Hoffmann und Bremer 2016, mod).

Schematisch dargestellt sind das Osmolytenaufnahmesystem (Opu), Transporter (Glt, Gab, Put) und Biosynthesewege (GB, Prolin) für kompatible Solute, sowie Ionenkanäle für Natrium-Export (Nha, Nat, Mrp) und Kalium-Import (Ktr), sowie mechanosensitive Kanäle (Msc).

Die fünf osmotisch regulierten und substratspezifischen Transportsysteme von *B. subtilis* werden als Opu (*osmoprotectant uptake*) bezeichnet (Abbildung 2.3). Die ABC-Transporter OpuA, OpuB und OpuC werden durch die Hydrolyse von ATP angetrieben und zeichnen sich durch unterschiedliche Substratspezifitäten aus. Während OpuA den Haupttransporter für GB markiert, vermittelt OpuB nur den Import von Vorläufermolekülen für die Synthese von GB (Kempf und Bremer 1998; Hoffmann und Bremer 2011). Die Symporter OpuD und OpuE nutzen Energie aus dem Natriumgradienten über die Zytoplasmamembran für ihre Funktion. Dabei ist OpuD an der Aufnahme verschiedener kompatibler Stoffe beteiligt, wohingegen OpuE allein für die Aufnahme von Prolin verwendet wird (Kappes *et al.* 1996; Blohn *et al.* 1997). Um zytotoxische Effekte zu vermeiden, müssen die beim OpuD- und OpuE-vermittelten Transport ebenfalls importierten Natriumionen wieder aus der Zelle ausgeschleust werden. Das Natriumexportsystem von *B. subtilis* besteht dabei aus den Kationen-Protonen-Antiportern Mrp NhaC und NhaK, sowie dem ABC-Transporter NatAB (Fujisawa *et al.* 2005; Hoffmann und Bremer 2016).

Abgesehen von der Vielzahl an kompatiblen Stoffen, die *B. subtilis* aufnehmen und akkumulieren kann, werden nur Prolin und GB durch zelleigene Enzyme synthetisiert (Hoffmann und Bremer 2011). Die *de novo*-Synthese von Prolin geht von Glutamat aus und kann über zwei Wege realisiert werden. Von der anabolen und der salzstressadaptiven Biosynthese spielt jedoch nur die adaptive für die Osmolytenakkumulation eine Rolle (Hoffmann und Bremer 2011). GB wird von *B. subtilis* durch die Oxidation von Cholin hergestellt. Da das Bakterium nicht in der Lage ist, Cholin selbst zu synthetisieren, nutzt es die bereits beschriebenen Transporter, um es aus der Umwelt zu importieren (Boch *et al.* 1994; Hoffmann und Bremer 2011). Allgemein zeigt sich, dass in *B. subtilis* die Akkumulation der Hauptosmolyte, GB und Prolin, linear abhängig von der Höhe des extern auftretenden Salzstresses ist. Ungestresste Zellen zeichnen sich durch eine

Prolinkonzentration zwischen 10 und 20 mM bzw. einen GB-Pool von 150 mM aus. Ist *B. subtilis* hohem Salzstress (z. B. 1 M NaCl) ausgesetzt, steigen die Werte auf etwa 500 mM Prolin bzw. 570 mM GB an (Whatmore *et al.* 1990; Hoffmann *et al.* 2013).

Die Erhöhung des Salzgehalts der natürlichen Lebensräume von *B. subtilis* z. B. durch Austrocknung, erfolgt in der Regel recht langsam, so dass die Zelle genügend Zeit hat, sich an diese ungünstigen Bedingungen anzupassen. Niederschläge oder Überschwemmungen des Bodens vermindern die externe Osmolarität jedoch sehr schnell, so dass *B. subtilis* unmittelbar darauf reagieren muss. Dieser hypoosmotische Schock führt zu einem massiven Einstrom von Wasser in die Zellen und kann durch den ansteigenden Turgor sogar zu deren Lyse führen (Abbildung 2.1). Um dem entgegenzuwirken, erfolgt ein schnelles Ausschleusen von wasseranziehenden Ionen und organischen Verbindungen aus dem Zytoplasma. Dies wird über dehnungsaktivierbare mechanosensitive Kanäle (*mechanosensitive channels, msc*) geregelt, deren Öffnung durch Änderungen der Membranspannung unter Konformationsänderung der Kanalstruktur ausgelöst wird (Booth *et al.* 2007). *B. subtilis* besitzt drei Vertreter der kleinen MscS-Typ Kanäle und einen großen MscL-Typ Kanal wodurch es den Übergang von hoher zu niedriger Osmolarität realisieren kann (Booth *et al.* 2007; Hoffmann *et al.* 2008; Wahome *et al.* 2009).

2.2.2 Genregulation unter Salzstress

Die genetische Regulation der Salzstressantwort bei *B. subtilis* erfolgt in zwei Stufen (Spiegelhalter und Bremer 1998). Wird das Bakterium plötzlich hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt, greifen zuerst allgemeine Stressreaktionen unter der Regulation des alternativen Transkriptionsfaktors SigB. Diese allgemeine Stressantwort umfasst bei *B. subtilis* die Expression mehrerer hundert Gene und ermöglicht einen präventiven Schutz gegen eine Vielzahl von Umweltbelastungen und Stressoren (Hecker *et al.* 2007). Diese schnelle, jedoch nur vorübergehende Induktion der Genexpression wird gefolgt von einer dosis- und dauerabhängigen Stressantwort. Unter anhaltend hohen Salzkonzentrationen übernimmt der so genannte *Housekeeping*-Sigmafaktor von *B. subtilis*, SigA, die Steuerung (Spiegelhalter und Bremer 1998). Interessant ist dabei, dass z. B. die Gene der Transporter OpuE und OpuD sowohl SigA- als auch SigB-Bindestellen aufweisen (Kappes *et al.* 1996; Spiegelhalter und Bremer 1998). Durch diese doppelte osmotische Kontrolle wird die Transportkapazität der Osmolyte Prolin und GB (Abbildung 2.3), sowohl für hyperosmotisch geschockte als auch für kontinuierlich gestresste Zellen, deutlich erhöht (Spiegelhalter und Bremer 1998). Die Kombination der beiden Promotoren ermöglichen daher sowohl eine zügige, als auch eine gut abgestufte physiologische Reaktion auf Salzstress (Spiegelhalter und Bremer 1998; Hoffmann und Bremer 2016). Neben den Transkriptionsfaktoren SigA und SigB konnte auch die Salzschockinduktion von SigW nachgewiesen werden (Huang *et al.* 1999; Petersohn *et al.* 2001; Steil *et al.* 2003). SigW zählt zu den Sigmafaktoren extrazytoplasmatischer Funktion (*extracytoplasmic function, ECF*). Im Allgemeinen kontrolliert diese Klasse von Sigmafaktoren die Aufnahme oder Sekretion spezifischer Moleküle und Ionen oder die Reaktion auf verschiedene Stressoren (Huang *et al.* 1999; Petersohn *et al.* 2001). SigW ist insbesondere in

Entgiftungsreaktionen und die Produktion von antimikrobiellen Verbindungen involviert (Huang *et al.* 1999). Die Salzschockinduktion von SigW liegt wahrscheinlich im negativen Einfluss ionischer Effekte auf Zellmembran und Transportprozesse begründet, da keine der bekannten osmoregulierten Gene von *B. subtilis* einen SigW-Promotor aufweist (Petersohn *et al.* 2001).

Einen reprimierenden Effekt hat Salzstress vor allem auf die Gene der Chemotaxis und Zellmotilität was zu einer Beeinträchtigung der Schwärmfähigkeit von *B. subtilis* führt (Steil *et al.* 2003). Vor allem die Transkription des *hag*-Gens, das Strukturprotein der Geißel, ist unter hohen Salzkonzentrationen stark reprimiert (Hoffmann *et al.* 2002). Die physiologische Bedeutung dieser Effekte ist jedoch derzeit noch ungeklärt. Auch die Sporenbildung wird durch einen hohen Salzgehalt unterdrückt (Ruzal *et al.* 1998; Steil *et al.* 2003). *B. subtilis* ist bekannt für seine Fähigkeit, unter Nährstoffmangel oder ungünstigen Umweltbedingungen resistente Endosporen zu bilden (Higgins und Dworkin 2012; Setlow 2014). Diese Überdauerungsformen ermöglichen das Überleben über einen langen Zeitraum, da sie bei günstigen Wachstumsbedingungen wieder zu vegetativen Zellen auskeimen können (Setlow 2014). Diese Möglichkeit der Stressvermeidung steht *B. subtilis* allerdings unter dem Einfluss hoher Salzgehalte nicht zur Verfügung, da der Sporenbildungsprozess schon frühzeitig blockiert wird (Ruzal *et al.* 1998). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass salzgestresste *B. subtilis*-Zellen nicht über die nötigen Ressourcen verfügen, um den energieaufwändigen und komplexen Entwicklungsprozess zur Endospore vollenden zu können (Hoffmann und Bremer 2016; Higgins und Dworkin 2012). Zumal sich die Erhöhung des externen Salzgehaltes auf viele zelluläre Prozesse negativ auswirkt und das Wachstum von *B. subtilis* erheblich verlangsamt (Boch *et al.* 1994).

Die hier beschriebenen, sowie zahlreiche weitere Aspekte der Salzstressantwort von *B. subtilis* sind mittlerweile detailliert untersucht (Boch *et al.* 1994; Blohn *et al.* 1997; Steil *et al.* 2003; Hoffmann und Bremer 2016). Einerseits gibt es immer noch einen großen Anteil an Proteinen mit bisher unbekannter Funktion und dementsprechend auch unerforschte Teile der zellulären und physiologischen Salzanpassung (Steil *et al.* 2003). Des Weiteren ist auch der genaue Mechanismus der Wahrnehmung und Reaktion der Transporter auf osmotische Veränderungen, sowie die spezifische Regulation der einzelnen Komponenten in vielen Belangen noch unverstanden (Hoffmann und Bremer 2017).

2.3 Der Modellorganismus *Clostridium acetobutylicum*

2.3.1 Physiologie und Genetik

Während es sich bei der Gattung *Bacillus* um aerobe Sporenbildner handelt, zählt *Clostridium acetobutylicum* zu den obligat anaeroben sporenbildenden Clostridien. Die Gattung *Clostridium* ist vor allem durch ihre humanpathogenen Vertreter, wie z. B. *C. botulinum*, *C. perfringens* oder *C. tetani* bekannt. *C. acetobutylicum* stellt demgegenüber den Modellorganismus aphathogener saccharolytischer Clostridien dar (Dworkin *et al.* 2006). Es ist in der Lage, eine Vielzahl an verschiedenen Kohlenhydraten, wie z. B. Arabinose, Galaktose, Glukose, Mannose und Xylose, zu

verwerten (Mitchell 1998; Qureshi *et al.* 2006; Ezeji und Blaschek 2008; Servinsky *et al.* 2010). Charakteristisch für *C. acetobutylicum* ist sein biphasischer Fermentationsmetabolismus, welcher in Abbildung 2.4 illustriert ist.

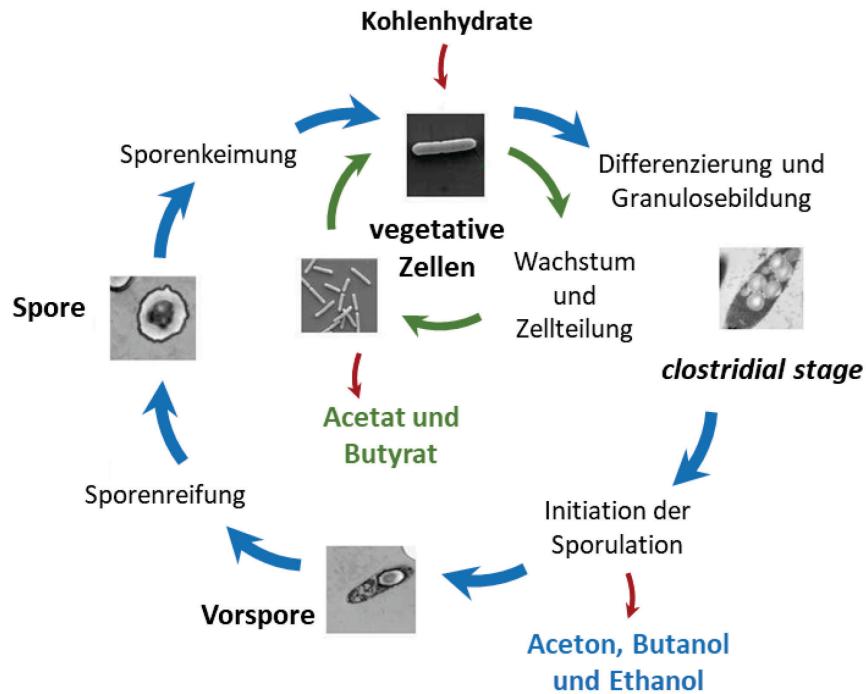


Abbildung 2.4 - Der Zellzyklus von *C. acetobutylicum* (Janssen 2010, mod.).

Dieser Gärungsstoffwechsel unterteilt sich in eine säurebildende Phase (Acidogenese) und eine Lösungsmittelphase (Solventogenese). Die erste Phase des Metabolismus stellt die Acidogenese dar, welche mit der exponentiellen Wachstumsphase korreliert. Dabei werden aus Kohlenhydraten, neben H₂ und CO₂, die organischen Säuren Acetat und Butyrat gebildet, wodurch der pH-Wert des externen Milieus absinkt (Andersch *et al.* 1983; Hartmanis und Gatenbeck 1984). Beim Erreichen externet pH-Werte von unter 4,5 liegt allerdings ein Großteil der organischen Säuren undissoziiert im Medium vor und kann in dieser Form ungehindert durch die Zellmembran in das Zytosol zurückdiffundieren. Dort dissoziieren die Säuren aufgrund des höheren internen pH-Wertes wieder, was zu einem Zusammenbruch des transmembranen Protonengradienten und damit zum Zelltod führt (Dürre 2011). Um der Gefährdung durch die organischen Säuren im Medium zu entgehen, leitet *C. acetobutylicum* bei zunehmender Ansäuerung des Mediums den so genannten „Lösungsmittel-Shift“ und damit den Übergang zur Solventogenese ein. In dieser Transitionsphase geht die exponentielle in die stationäre Wachstumsphase über und die Zellen durchlaufen eine Reihe morphologischer Veränderungen. Die Endosporenbildung wird initiiert und die vegetativen, stäbchenförmigen Zellen beginnen, Granulose als Energiequelle zu akkumulieren (Zimmermann 2011). Die Zellen schwollen dabei zu einer charakteristischen zigarrenartigen Form an und werden als „clostridial stage“-Zellen bezeichnet (Jones *et al.* 1982; Long *et al.* 1984). Zeitgleich mit der Initiation der Sporulation setzt in der Solventogenese die Produktion der Lösungsmittel ein. Die zuvor gebildeten Säuren werden teilweise reassimiliert und in die

Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol (ABE) in einem Verhältnis von 3:6:1 umgewandelt (Mitchell 1998). Dies lässt den pH-Wert im externen Milieu wieder ansteigen (Alsaker und Papoutsakis 2005) und verschafft den Zellen ausreichend Zeit, die eingeleitete Sporulation zu beenden. Aus den „clostridial stage“-Zellen entwickeln sich Vorsporen, die dann anschließend zu den für Clostridien typischen Sporen reifen (Long *et al.* 1984). Unter geeigneten Bedingungen sind diese Sporen in der Lage auszukeimen und eine funktionstüchtige vegetative Zelle zu bilden (Dürre 2014), wodurch der Wachstumszyklus erneut beginnt (Abbildung 2.4)

Durch die genaue physiologische Charakterisierung und eine Vielzahl von molekularbiologischen und metabolischen Analysen zählt *C. acetobutylicum* zu den am besten untersuchten solventogenen Clostridien. Nach Isolierung und Erstbeschreibung durch Chaim Weizmann zwischen 1912 und 1914, wurde der Typstamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 im Jahr 1924 aus Gartenerde in Connecticut isoliert (Weizmann 1915; Weyer und Rettger 1927). Die vollständige Sequenzierung des Genoms konnte 2001 durch Nölling *et al.* realisiert werden (Abbildung 2.5).

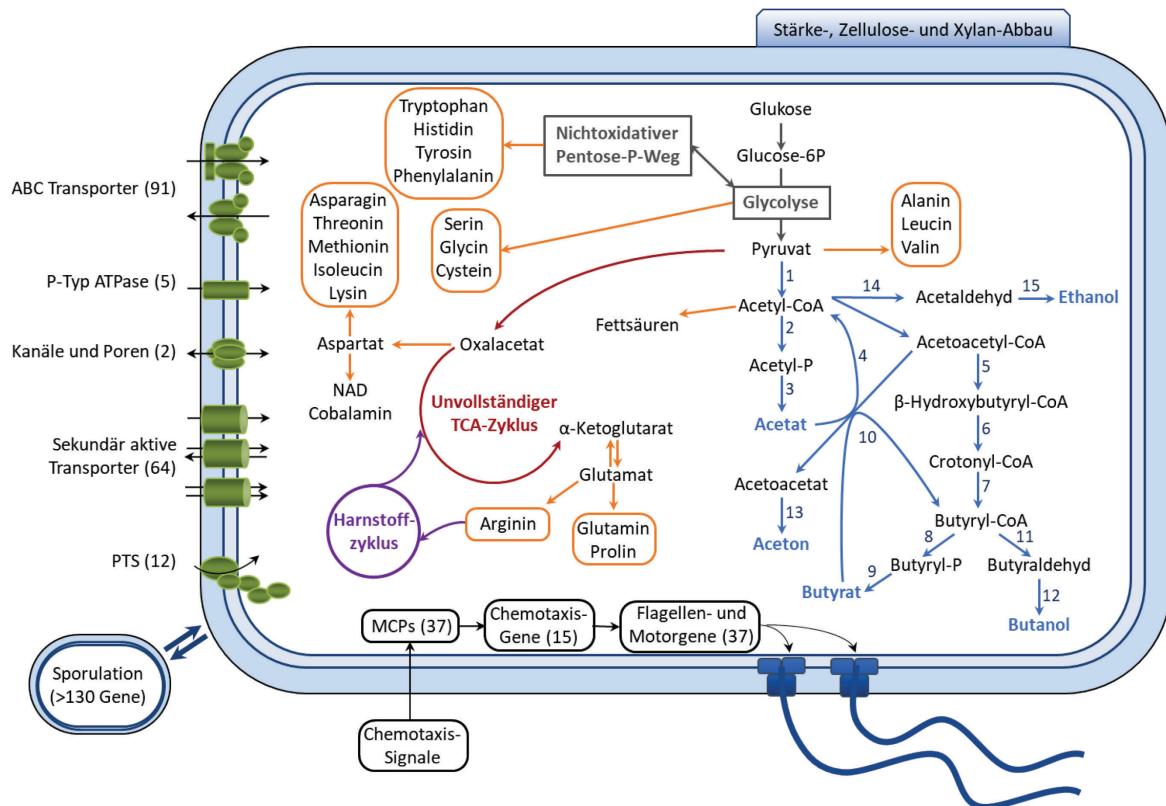


Abbildung 2.5 - Schema ausgewählter Stoffwechselwege von *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.* 2001, mod.).

Die Stoffwechselwege sind wie folgt farblich kodiert: Katabolismus von Kohlenhydraten zu Pyruvat, grau; unvollständiger TCA-Zyklus, rot; Gärungsstoffwechsel, blau; Biosynthesewege, orange; Harnstoffzyklus, violett; Chemotaxis, schwarz. Die Zahlen im Gärungsstoffwechsel entsprechen folgenden Enzymen: (1) Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, Hydrogenase und Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase; (2) Phosphotransacetylase; (3) Acetatekinase; (4) Thiolase; (5) Betahydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; (6) Crotonase; (7) Butyryl-CoA-Dehydrogenase; (8) Phosphotransbutyrylase; (9) Butyratkinase; (10) Acetoacetyl-CoA:Acyl-CoA-Transferase; (11) Butyraldehyd-Dehydrogenase; (12) Butanol-Dehydrogenase; (13) Acetoacetat-Decarboxylase; (14) Acetaldehyd-Dehydrogenase; (15) Ethanol-Dehydrogenase. Transporter (grün) sind nach Hauptkategorien gruppiert und die jeweilige Anzahl in Klammern angegeben. Abkürzungen: P, Phosphat; PTS, Phosphoenolpyruvat-Transferasesystem; MCP, methylakzeptierendes Chemotaxis-Protein; TCA, Trikarbonsäure-Zyklus.

Dies ermöglichte die Entwicklung molekularbiologischer Arbeitsmethoden und so die weiterführende Erforschung dieses Organismus, wodurch er den Status eines Modellorganismus apathogener Clostridien erreichte (Bahl und Dürre 1993; Nölling *et al.* 2001). Das Chromosom von *C. acetobutylicum* ist ca. 3,9 Bp groß und enthält 3740 proteinkodierende ORFs. Zusätzlich besitzt das Bakterium das 192 kBp große Megaplasmid pSOL1, welches für weitere 178 Proteine kodiert, darunter die zur Lösungsmittelbildung benötigten Enzyme (Nölling *et al.* 2001). Verschiedene genetische Systeme ermöglichen mittlerweile die Modifizierung von *C. acetobutylicum* und führen zur Entwicklung von Stämmen mit veränderten Eigenschaften (Xue *et al.* 2017).

2.3.2 ABE-Fermentation und Salzstress

Aufgrund der Fähigkeit zur ABE-Fermentation erlangte *C. acetobutylicum* schon sehr früh große biotechnologische Bedeutung. Im Ersten Weltkrieg lag der Fokus vor allem auf der bakteriellen Acetonproduktion (Weizmann 1915). Aceton wurde für die Herstellung von Schießpulver genutzt, jedoch konnte der Ausgangsstoff für die chemische Acetonerzeugung aufgrund des Krieges nicht importiert werden (Dürre 2008). Die bakterielle Fermentation eröffnete einen Weg, große Mengen dieses Lösungsmittels zu synthetisieren und brachte England und der USA einen entscheidenden Vorteil (Jones und Woods 1986; Dürre 2008). Das während der Fermentation synthetisierte Butanol galt zu dieser Zeit noch als Nebenprodukt und wurde in großen Tanks gesammelt. In den 20er und 30er Jahren gab es jedoch im Zuge des Aufschwungs der Automobilindustrie vermehrten Bedarf an Lösungsmitteln zur Herstellung von Autolacken. Durch die Prohibition 1920 in den USA kam die Versorgung mit Amylalkohol zur Herstellung von Amylacetat-basierten Lacken zum Erliegen, sodass dringend eine Ersatzsubstanz benötigt wurde. Es zeigte sich, dass auch Butylacetat, welches aus Butanol als Ausgangsstoff gewonnen wurde, bestens zur Lackherstellung geeignet war. So rückte die biotechnologische Butanolherstellung in den Fokus, sodass die Gründung neuer Produktionsstätten und die Optimierung der Fermentationsprozesse vorangetrieben wurde (Dürre 2008). Nach dem Zweiten Weltkrieg sorgte jedoch die Entwicklung kostengünstiger Erdölbasierter Verfahren zur Produktion von Aceton und Butanol für die Einstellung der ABE-Fermentation in den Industrieländern. Erst der Anstieg der Ölpreise in den 1970er Jahren entfachte erneut verstärktes Interesse an der biotechnologischen Lösungsmittelproduktion. Vor allem, da Butanol mittlerweile als universale Plattformchemikalie und Ausgangsstoff z. B. für die Herstellung von Kleb-, Kunst- oder Aromastoffen, Dentalprodukten oder Weichmachern genutzt wird (Dürre 2008; Wang *et al.* 2017).

Aktuell besteht aber auch zunehmendes Interesse an Butanol als Biokraftstoff. Ähnlich wie Ethanol kann es mit flüssigen fossilen Brennstoffen gemischt werden, oder diese sogar vollständig ersetzen (López-Contreras *et al.* 2012). Dabei weist Butanol durch seine physikalisch-chemischen Eigenschaften sogar eine Reihe von Vorteilen gegenüber Ethanol auf. Neben einer höheren Energiedichte und niedrigerem Dampfdruck ist Butanol weniger korrosiv und kann in den aktuellen Motoren ohne Umbauten eingesetzt werden (Dürre 2008; López-Contreras *et al.* 2012). Vor allem in der aktuellen Klimaproblematik hat Biobutanol einen großen Stellenwert, da es fermentativ aus

nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden kann und damit zur Senkung der Treibhausgasemissionen und Erdölabhängigkeit beiträgt. Je nachdem, welche Rohstoffe dabei für die Fermentation eingesetzt werden, wird zwischen Biobutanol der ersten, zweiten und dritten Generation unterschieden (Abbildung 2.6).

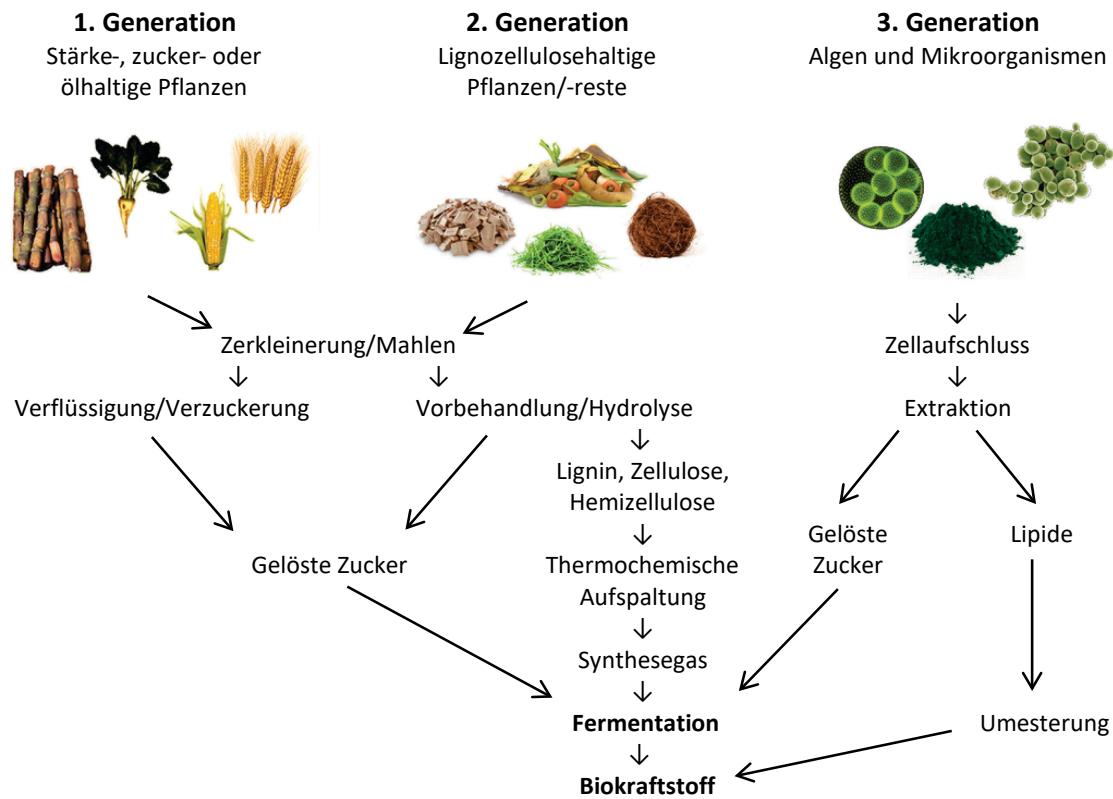


Abbildung 2.6 - Umwandlung von nachwachsender Biomasse in Biokraftstoffe (Wang *et al.* 2017; González-González *et al.* 2018).

Die erste Generation umfasst dabei verschiedene landwirtschaftliche Rohstoffe, darunter Ölpflanzen wie Ölpalmen, Soja und Raps sowie Zucker- und Stärkepflanzen wie Zuckerrohr und Mais. Aufgrund schlechterer Energiebilanzen, hohem Wasserverbrauch und der Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion erwiesen sich diese Rohstoffe jedoch als nicht tragbar zur Biokraftstoffherstellung. Als bessere Alternative erwiesen sich Rohstoffe der zweiten Generation, die auch als „*Non-Food*“-Biomasse bezeichnet werden (Wang *et al.* 2017; González-González *et al.* 2018; Abo *et al.* 2019). Dabei handelt es sich vor allem um zellulose- bzw. lignozellulosehaltige Biomasse aus land- und forstwirtschaftlichen Abfällen. Obwohl Biomasse der zweiten Generation heutzutage in großem Umfang in der Ethanolproduktion eingesetzt wird, besteht immer noch die Problematik hoher Kosten und schlechter Nachhaltigkeit (Dürre 2008; Wang *et al.* 2017; González-González *et al.* 2018). Neuste Forschungen fokussieren sich auf Biokraftstoffe der dritten Generation, bei der Mikroalgen-Biomasse zur Fermentation eingesetzt wird. Algen haben gegenüber den Rohstoffen der ersten und zweiten Generation zahlreiche Vorteile. Neben schnellen Wachstumsraten und hoher photosynthetischer Effizienz kann der Anbau von

Algen, unabhängig von landwirtschaftlichen Flächen und terrestrischen Ressourcen, im Meer- oder Brackwasser erfolgen. Darüber hinaus verbrauchen sie beim Wachstum große Mengen des Treibhausgases CO₂ und liefern so einen zusätzlichen Beitrag zur aktuellen Klimaproblematik (Wang *et al.* 2017; González-González *et al.* 2018). Doch unabhängig von der Generation gibt es hinsichtlich der Rohstoffe für die fermentative Biobutanolherstellung eine Herausforderung: die Zugänglichkeit und Freisetzung der bakteriell nutzbaren Zucker. *C. acetobutylicum* und andere lösungsmittelproduzierende Stämme sind nicht in der Lage, Zellulose abzubauen. Dementsprechend müssen die Rohstoffe erst einer Vorbehandlung unterzogen werden, um die clostridielle Fermentation zu ermöglichen (Ezeji und Blaschek 2008; López-Contreras *et al.* 2012; Mussatto 2016; Wang *et al.* 2017; Abo *et al.* 2019).

Für die Vorbehandlung der Biomasse wurden eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, die in vier Kategorien eingeteilt werden können: physikalisch, chemisch, physikalisch-chemisch und biologisch. Einige Beispiele sind u. a. die mechanische Zerkleinerung, der Einsatz von Dampfexplosionen oder chemischen Mitteln wie Säuren oder Laugen, sowie die biologische Vorbehandlung mit Mikroorganismen oder Enzymen (Mussatto 2016). Am vielversprechendsten scheint dabei vor allem der Einsatz von Alkali-Säure-Hydrolyseverfahren in Kombination mit physikalischen Vorbehandlungen, aufgrund von erhöhter Zelluloseaufspaltung bei minimalem Kohlenhydratverlust (Mussatto 2016; Wang *et al.* 2017). Beim Einsatz dieser Verfahren und insbesondere auch bei der Verwendung von marinen Mikroalgen, kann es jedoch zu erhöhten Natriumkonzentrationen in der aufbereiteten Biomasse kommen. Dies wiederum führt zu Salzstress bei der Fermentation, der *C. acetobutylicum* negativ beeinflusst (González-González *et al.* 2018). Die hemmende Wirkung von Salzstress bei der ABE-Fermentation ist schon lange bekannt, die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nur unzureichend erforscht (Maddox *et al.* 1995; Qureshi *et al.* 2008). Bei *C. acetobutylicum* führen bereits Salzkonzentrationen ab 500 mM zu einer völligen Wachstumshemmung. Bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt zwar Wachstum, die Fermentation verschiebt sich jedoch von der Solventogenese zur Acidogenese (Maddox *et al.* 1995). Neuste Studien konnten Einblicke in das Metabolom von *C. acetobutylicum* unter Natriumstress geben (Zhao *et al.* 2016). Dabei zeigte sich, dass bereits 200 mM NaCl das Wachstum, die Zuckeraufnahme, den zentralen Kohlenstoffmetabolismus sowie die Lösungsmittelbildung beeinträchtigen. Neben einer verlängerten lag-Phase sind in der Folge die Wachstumsrate und die Biomassekonzentration signifikant verringert. Zhao *et al.* vermuten, dass der hohe Salzgehalt die Zellhomöostase stört und *C. acetobutylicum* dementsprechend einen erheblichen Teil seiner Ressourcen in Entgiftungs- und Anpassungsreaktionen investieren muss. Die Beobachtung der verminderten Lösungsmittelbildung wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. So ließen die durchgehend hohen Acetat- und Butyratkonzentrationen nach Eintritt in die Solventogenese auf eine verminderte Umwandlung der Säuren in Lösungsmittel schließen. Interessanterweise zeigte sich allerdings die biomasseabhängige Produktivität der Lösungsmittel, im Gegensatz zu deren Endkonzentrationen, unabhängig vom Salzstress (Zhao *et al.* 2016).

Die Untersuchung des Salzstressmetaboloms von *C. acetobutylicum* lieferte erste Erkenntnisse hinsichtlich des Verhaltens dieses Bakteriums unter hohen Natriumkonzentrationen. Zur

Aufdeckung der genauen Anpassungsmechanismen, vor allem hinsichtlich der genetischen Regulation, genutzter Schlüsselgene und Transporter, sowie akkumulierter Schutzsubstanzen, bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen.

2.4 Zielstellung

Kennzeichnend für die letzten Jahre ist die Besorgnis über die globale Erwärmung, Umweltverschmutzung und CO₂-Emmission. Dem gegenüber steht allerdings ein ansteigender Energieverbrauch, der auch 2018 immer noch zu 85 % mit fossilen Brennstoffen gedeckt wurde. Obwohl die Forderungen nach einem beschleunigten Ausstieg aus der Nutzung fossiler Energieträger von einem breiten Teil der Gesellschaft getragen wird, betrug die Energiegewinnung aus erneuerbaren Ressourcen 2018 lediglich nur 4 % (BP p.l.c. 2019). Da vor allem im Transportsektor ein großer Verbrauch an erdölbasierten Treibstoffen vorliegt, ist die Herstellung von Biokraftstoffen aus nachwachsender Biomasse ein vielversprechender Weg, die Abhängigkeit vom Erdöl und die Umweltbelastung zu verringern. Besonders Butanol ist als flüssiger Biokraftstoff bestens geeignet, da es direkt von bestehenden Fahrzeugen verwendet werden kann. Seine speziellen Eigenschaften, wie z. B. höherer Energiegehalt, geringe Schadstoffemissionen, sowie sichere Lagerung und Handhabung dank des niedrigen Dampfdrucks, machen es dabei für den Verkehrssektor besonders attraktiv (Dürre 2008; López-Contreras *et al.* 2012).

Die mikrobielle Butanolherstellung mittels *C. acetobutylicum* ist ein schon lange untersuchtes und im industriellen Maßstab erfolgreich eingesetztes Verfahren (Dürre 2008; López-Contreras *et al.* 2012; Wang *et al.* 2017). Dank seines sequenzierten Genoms sind die an der Lösungsmittelbildung beteiligten Gene und Enzyme bekannt (Nölling *et al.* 2001) und konnten bereits mittels molekularbiologischer Techniken optimiert werden (Xue *et al.* 2017). Dieses so genannte *metabolic engineering* verfolgt das Ziel, *C. acetobutylicum* hinsichtlich der Butanolproduktion, Substratnutzung und Lösungsmittelresistenz zu verbessern. Darin besteht immer noch die wichtigste Voraussetzung, um die fermentative Biobutanolherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen im Vergleich zu fossilen Kraftstoffen wirtschaftlich konkurrenzfähig zu machen (Dürre 2008). In Bezug auf die Substratnutzung müssen die bisher eingesetzten in der Regel kostenintensiven Rohstoffe durch billigere Substrate ersetzt werden, deren Anbau außerdem nicht mit der Lebensmittelindustrie konkurriert. Lignozellulosehaltige Biomasse aus landwirtschaftlichen Abfällen oder die Nutzung von Algenbiomasse haben sich dabei als attraktives Ausgangsmaterial für die Biobutanolproduktion erwiesen (Dürre 2008; López-Contreras *et al.* 2012; González-González *et al.* 2018; Abo *et al.* 2019). Der vorangehende Aufschluss der Lignozellulose mit NaOH, sowie die Anzucht von Algen im Meerwasser resultieren jedoch in nicht zu vernachlässigenden Salzgehalten in diesen Substraten (Mussatto 2016; González-González *et al.* 2018). Dies verhindert den praktischen Nutzen dieser zukunftsweisenden Ansätze, da Salzstress hemmend auf die Lösungsmittelbildung und damit negativ auf die Butanolausbeute wirkt (Maddox *et al.* 1995; Qureshi *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2016).

Interessanterweise ist bisher die Salzstressregulation von *C. acetobutylicum* kaum untersucht und eine genaue Aufschlüsselung der potentiell beteiligten Anpassungsreaktionen steht noch aus. Hier soll diese Arbeit ansetzen und einen Beitrag zur Grundlagenforschung leisten. Die Identifizierung von potentieller Schutzsubstanzen, sowie die Aufdeckung möglicher Schlüsselgene und Synthesewege der Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* standen dabei im Fokus. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten im weiteren Verlauf genutzt werden, um die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* unter Salzstress zu verbessern.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Alle verwendeten Organismen, Plasmide und Oligonukleotide sind in Tabelle 3 - Tabelle 6 im Anhang aufgelistet.

3.2 Nährmedien

Zur Sterilisierung wurden hitzestabile Lösungen und Nährmedien im Anschluss an die Herstellung bei 121 °C für 20 min autoklaviert (Tischautoklav Systek DB-45, Tuttnauer Europe B.V.), wohingegen hitzelabile Lösungen mittels Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt) sterilfiltriert wurden.

3.2.1 Nährmedium für *B. subtilis*

Für die Kultivierung von *B. subtilis* fand Spizizen Minimal Medium (SMM) mit Spurenelementen Anwendung (Harwood und Cutting 1990). Zusätzlich wurde als Kohlenstoffquelle 0,5 % Glukose (w/v) nach dem Autoklavieren direkt vor dem Beimpfen des Mediums aus einer sterilen Stammlösung (50 % [w/v]) zugegeben.

5x SMM

(NH ₄) ₂ SO ₄	10	g
K ₂ HPO ₄	70	g
KH ₂ PO ₄	30	g
Na ₃ Citrat x 2H ₂ O	15	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	11	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

100x Spurenelemente

CaCl ₂	0,55	g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1,35	g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,10	g
ZnCl ₂	0,17	g
CuCl ₂ x 6H ₂ O	0,05	g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,06	g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,06	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

3.2.2 Nährmedium für *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte entweder in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Medienzusätze wurden bei Bedarf zugegeben (3.2.4).

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

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

Zur Herstellung von festem Nährmedium wurde 1,5 % [w/v] Agar-Agar hinzugegeben.

Der pH-Wert lag ohne Einstellung zwischen 7 und 7,5.

3.2.3 Nährmedien für *C. acetobutylicum*

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* erfolgte je nach Experiment entweder in flüssigen oder auf festen anaeroben Medien. Für die Herstellung der Flüssigmedien wurden die benötigten Substanzen in destilliertem Wasser gelöst und wenn nötig, der pH-Wert eingestellt. Um den gelösten Sauerstoff zu entfernen, wurde das Medium in der Mikrowelle bis zum Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (0,1 % [w/v]) aufgekocht. Während des Abkühlens wurde das Medium mit Stickstoff begast um ein erneutes Eindiffundieren von Sauerstoff zu verhindern (Breznak und Costilow 1994). Anschließend konnten die Kulturgefäße luftdicht verschlossen und für 20 min bei 121 °C und 1 bar im Autoklav sterilisiert werden.

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

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

* Zugabe nach dem Autoklavieren direkt vor dem Beimpfen aus einer sterilen, anaeroben Stammlösung (50 % [w/v]).

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

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

* Zugabe aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (100x) vor dem Autoklavieren.

** Vor Zugabe des Puffers MES wurde der pH-Wert mit NH₄OH auf 6,6 eingestellt.

RCA-Medium (*reinforced clostridial agar*)*

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

* Das RCA-Medium wurde als Komplettmedium von der Firma Oxoid (Wesel) bezogen.

Der pH-Wert lag ohne weitere Einstellung bei 6,8.

Vor Verwendung der Nährmedien erfolgte bei Bedarf die Zugabe weiterer Medienzusätze (3.2.4).

3.2.4 Medienzusätze

Wie bereits erwähnt mussten den Nährmedien gegebenenfalls die hier aufgeführten Medienzusätze beigefügt werden. Antibiotika wurden in Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert, wobei die Zugabe steril nach Autoklavieren und Abkühlung der Medien auf unter 50 °C erfolgte (Tabelle 8, Anhang). Von den als kompatible Solute genutzten Aminosäuren und Zuckern fanden anaerobe Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 mM Anwendung. Dafür mussten die Lösungen zunächst in sterile anaerobe Hungates sterilfiltriert und erneut mit Stickstoff durchgast werden. Die Lagerung erfolgte im Anschluss bei 4 °C. Für Untersuchungen unter hochosmolaren Bedingungen wurde das Medium mit der gewünschten Konzentration NaCl versetzt. Dies konnte entweder durch Einwaage der benötigten NaCl-Menge vor dem Autoklavieren, oder durch Zugabe direkt vor dem Beimpfen aus einer sterilen aneroben Stammlösung (4 M) realisiert werden.

Titan (III)-NTA-Lösung

Nitrilotriessigsäure	5,73	g
NaOH (5 M)*	20	ml
TiCl ₃ -Lösung (15 %, 8 w/v)]	6,4	ml
Na ₂ CO ₃ (2 M)*	10	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	75	ml

*Diese Komponenten wurden vor ihrer Verwendung mittels N₂-Durchgasung anaerobisiert.

Die Herstellung von Titan-(III)-NTA ist in der Dissertation Schulz (2013) erläutert. Zur Reduktion von Restsauerstoff erfolgt die Zugabe von 1-3 Tropfen des niedervalenten Titans zu 10 ml CGM bzw. MS-MES Medium (3.2.3).

3.3 Zellanzucht

3.3.1 Aerobe Zellanzucht von *B. subtilis* und *E. coli*

Die Anzucht von *B. subtilis* erfolgte unter aeroben Bedingungen in SMM-Flüssigkulturen (3.2.1) unter Schütteln (180 Upm) im Brutschrank bei 37 °C unter Verwendung entsprechender Medienzusätze (3.2.4). Vorkulturen wurden im 5-ml-Maßstab über Nacht kultiviert und im Anschluss zur Inokulation von 150-ml-Hauptkulturen in Schikanekolben genutzt.

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Flüssigkulturen unter Schütteln (180 Upm) bzw. auf LB-Festmedien (3.2.2) im Brutschrank bei 37 °C unter Verwendung entsprechender Medienzusätze (3.2.4).

3.3.2 Anaerobe Zellanzucht von *C. acetobutylicum*

3.3.2.1 Anzucht in statischer Kultur (Batch-Kultur)

Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* erfolgten anaerob unter N₂-Atmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen (Ochs) oder Müller&Krempel-Serumflaschen (Müller & Krempel AG). Batch-Kulturen (10 ml) wurden mit 0,1 Vol. einer MS-MES Sporensuspension bzw. mit 1 ml einer CGM-Glycerin- Stammkultur (3.4) inokuliert. Im Falle von Sporensuspensionen schloss sich eine Induktion der Sporenenkeimung durch Pasteurisierung (80 °C, 10 min) an. Vorkulturen dienten in der Regel der Beimpfung von Batch-Hauptkulturen in Müller&Krempel-Serumflaschen unterschiedlicher Volumina (50-200 ml). Diese durften aufgrund der Gasentwicklung und des zu erwartenden Druckanstiegs nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens befüllt werden. Die Anzucht von Vorkulturen erfolgte in Komplexmedium (CGM; 3.2.3). Wachstumsversuche wurden stets in 200 ml MS-MES (3.2.3) durchgeführt. Im Falle eines Medienwechsels war eine weitere Vorkultur in MS-MES Medium notwendig. Hierfür wurden 0,1 Vol. einer CGM-Vorkultur in 10 ml MS-MES-Vorkulturen überimpft. Die Hauptkultur wurde in der Regel mit einer optischen Dichte (OD₆₀₀, 3.5.1) von 0,1 inokuliert. Bei Bedarf wurden den Medien entsprechende Zusätze direkt vor

der Inokulation zugefügt (3.2.4). Untersuchungen des Wachstums erfolgten durch regelmäßige Messungen der OD₆₀₀, des pH-Wertes und der gebildeten Gärungsprodukte (3.5).

3.3.2.2 Anzucht auf Festmedium

Anzuchten von *C. acetobutylicum* auf Nähragarplatten (RCA, 3.2.3) erfolgten in einer Anaeroben-Werkbank (MACS-MG 1000, Meintrup DWS Laborgeräte GmbH) unter N₂-Atmosphäre bei 37 °C. Die Agarplatten mussten zur Anaerobisierung mindestens 24 h vor ihrer Verwendung eingeschleust werden. Die Gasatmosphäre in der Anaeroben-Werkbank bestand aus 95 % N₂ und 5 % H₂ zur Reduktion von eingetragenem Luftsauerstoff.

3.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Die Stammhaltung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnte als Sporensuspension in MS-MES Medium erfolgen (3.2.3). Dafür wurden die Kulturen bis zur Sporulation der Zellen (ca. 5 Tage) bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen kultiviert und anschließend bei -20 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung der Sporensuspension wurden Stammkulturen angelegt, die bei -70 °C aufbewahrt wurden. Die Konservierung von Insertionsmutanten erfolgte durch die Zugabe von 0,5 ml anaerober CGM-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], CGM-Medium 40 % [v/v]) zu 1 ml logarithmisch wachsenden Zellen in 1,5-ml-Schraubdeckelrörchen. Nach gründlichem Durchmischen folgte eine 30-minütige anaerobe Inkubation bevor die Zellen bei -70 °C gelagert wurden. Zur Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen wurde 1 ml einer exponentiell wachsenden Zellsuspension mit 0,5 ml LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) in 1,5-ml-Schraubdeckelrörchen gegeben, anschließend gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert. Eine Vitalitätskontrolle der Stammkulturen erfolgte durch regelmäßiges Ausplattieren auf Festmedium oder der Anzucht in Flüssigmedium. Die Reinheit der Stammkulturen wurde durch die mikroskopische Überprüfung auf eine einheitliche Zellmorphologie und durch regelmäßige Reinheitsausstriche gewährleistet.

3.5 Bestimmung physiologischer Parameter

3.5.1 Optische Dichte

Die optischen Dichte (OD₆₀₀) diente als Wachstumsparameter für Flüssigkulturen und wurde in einem Spektralphotometer gegen einen Medienleerwert entweder in Plastikküvetten mit 1 cm Schichtdicke (Ultrospec 3000, GE Healthcare GmbH) oder direkt in Hugates (Nanocolor® VIS, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) gemessen. Bei Extinktionen über 0,3 erfolgten entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension mit PBS.

PBS (phosphate buffered saline)-Puffer (pH 7,4)

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

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 7,4 mit konzentrierter HCl eingestellt.

3.5.2 Berechnung von Wachstumsrate und Verdopplungszeit

Die Wachstumsrate (μ) ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase (Formel 1). Über die Wachstumsrate kann weiterhin die Verdopplungszeit t_d bestimmt werden (Formel 2), welche das Zeitintervall der Zellmasseverdopplung pro Stunde angibt (Madigan *et al.* 2019)

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{(t_2 - t_1)}$$

Formel 1: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (μ). x_1/x_2 , OD₆₀₀ gemessen zu zwei Zeitpunkten t₁/t₂ während des exponentiellen Wachstums.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit (td). μ , spezifische Wachstumsrate.

3.5.3 Messung des externen pH-Wertes

Der pH-Wert konnte während der Batch-Kulturen extern mit einem pH-Meter (WTW pH 526, WTW GmbH, Weilheim) überwacht und nach Sedimentation (13000 Upm, 4 °C, 5 min) in einem zellfreien Überstand gemessen werden.

3.5.4 Optisch-enzymatische Glukosebestimmung

Der Glukoseverbrauch während des Wachstums von *C. acetobutylicum* konnte ein optisch-enzymatisch bestimmt werden. Dabei wird D-Glukose in einer ersten Reaktion durch eine Hexokinase (EC 2.7.1.1) unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-Phosphat und ADP umgewandelt. Anschließend erfolgt die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat unter NADP⁺-Verbrauch durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) zu 6-Phospho-D-Glukonat und NADPH+H⁺. Die gebildete Menge an NADPH ist dabei proportional zur umgesetzten Glukosemenge und kann photometrisch mittels der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm gegen einen

Leerwert bestimmt werden (Ultrospec 3000, GE Healthcare GmbH). Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgt anschließend mit folgender Formel.

$$c_{Glukose} = \frac{\Delta E \times V \times MW_{Glukose}}{\epsilon \times d \times v} \times VF \text{ [g/l]}$$

Formel 3: Berechnung der Glukosekonzentration. c, Konzentration; ΔE , Extinktionsänderung; V, Gesamtvolumen des Ansatzes (ml); MW, Molekulargewicht (180,16 g/mol); ϵ , Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm ($6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$); d, Schichtdicke der Küvette (1 cm); v, Probenvolumen; VF, Verdünnungsfaktor.

Um den Glukoseverbrauch während des Wachstums einer MS-MES Batch-Kultur (3.3.2.1) zu beobachten, wurden in den verschiedenen Wachstumsphasen 2-ml Proben entnommen und sedimentiert (5 min, 13000 Upm, 4 °C). Der Überstand konnte entweder direkt für die Messung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden. In der Regel wurden die Proben für die Messung 1:100 mit *A. dest.* verdünnt. Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte im Doppelansatz, wobei dafür folgender Reaktionsansatz in eine Halbmikroliterplastikküvette gegeben wurde:

0,2 M Tris-HCl + 2 mM MgSO ₄ (pH 7,6)	900 µl
NADP ⁺ (44 mg/ml)	10 µl
ATP (96 mg/ml)	10 µl
Probe (zellfreier Überstand)	10 µl

Nach dem Mischen des Ansatzes wurde die Extinktion des Leerwertes (E1) bei 340 nm gemessen. Durch Zugabe von 10 µl Enzymgemisch (Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 3 mg/ml, Roche) konnte die zuvor beschriebene Reaktion eingeleitet werden. Der Reaktionsansatz wurde erneut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Bestimmung der Extinktion E2 bei 340 nm. Für die Ermittlung der Glukosekonzentration wurde die Extinktionsänderung (ΔE) mittels Differenz zwischen E1 und E2 bestimmt und die Glukosemenge für jede Probe mit Formel 3 berechnet.

3.5.5 Gaschromatografie

3.5.5.1 Probenvorbereitung und Quantifizierung

Die Quantifizierung der gebildeten Gärungsprodukte von *C. acetobutylicum* erfolgte gaschromatographisch. Dafür wurden 2 ml der zu analysierenden Zellsuspension bei 13000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Dieser wurde in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der Gärungsprodukte wurden 100 µl des zellfreien Überstandes, 900 µl destilliertes Wasser und 100 µl interner Standard (IS; 55 mM Isobutanol in 2 M HCl und 0,5 M Acetoin) in ein Rollrandgefäß gegeben. Nachdem das Gefäß mit einer Bördelkappe gasdicht verschlossen wurde,

konnten 0,5 µl der Probe über einen automatisierten Probengeber zur Analyse in das System injiziert werden. Die Quantifizierung der Gärungsprodukte erfolgte über ein Eichchromatogramm. Dieses konnte mit Hilfe einer Eichlösung erstellt werden, welche jeweils 5 mM der zu analysierenden Produkte und den internen Standard Isobutanol enthielt. Über das Programm EZChrom Elite (Agilent Technologies) erfolgte sowohl die Steuerung des Gaschromatographen und des Probengebers als auch die Auswertung der Signale.

3.5.5.2 Analysebedingungen

Die Analyse und Quantifizierung der Gärungsprodukte Acetat, Butyrat, Aceton, Butanol und Ethanol erfolgte mit einem Agilent 7890A Gaschromatographen (Agilent Technologies) unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID). Als Trägergas diente N₂, welches über einen Feuchtigkeits- sowie einen Sauerstofffilter von Wasser, Sauerstoff, sowie schwefeligen und chlorierten Substanzresten gereinigt wurde. Als FID-Brenngase dienten synthetische Luft und Wasserstoff, welche zur Entfernung organischer Substanzen zuvor über einen Aktivkohlefilter geführt wurden. Für die Analyse von Alkoholen und Carbonsäuren fand eine mit Porapak P (80-100 mesh) gepackte Säule Anwendung. Die Analysebedingungen für die Detektion der flüssigen Gärungsprodukte sind nachfolgend dargestellt.

Chromatografiesäule: INNOSteel-GC-Säule (2 m x 1/8"AD x 2 mm, Porapak P 80/100 mesh)

Säulentemperatur: 155-197 °C; 9 °C/min

Trägergas: N₂ (30 ml/min)

Injektortemperatur: 195 °C

Detektor: FID; 230 °C

3.6 Analyse von kompatiblen Soluten

3.6.1 Vorbereitung der Proben

Um die Akkumulation von potentiellen Schutzsubstanzen gegen Salzstress zu untersuchen, erfolgte zunächst das Wachstum in 50-150 ml Minimalmedium mit definierten NaCl-Konzentrationen. Als Kontrolle dienten dabei Batch-Kulturen ohne NaCl-Zugabe. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von ca. 1 erreichten, bzw. nach 14 h Wachstum, wurden 50-ml-Proben entnommen und für 5 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Bei salzgestressten Proben enthielt der Waschpuffer die entsprechende Konzentration NaCl, die salzfreie Kontrolle wurde mit Puffer ohne NaCl gewaschen. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C. Vor der Analyse der kompatiblen Solute mussten die Pellets lyophilisiert (Gefriertrockner VaCo1, Zibus technology GmbH) und ihr Trockengewicht bestimmt werden (Analysewaage XA205, Mettler-Toledo GmbH).

Waschpuffer

EDTA (0,5 M, pH 8,0)	200	ml
Tris-HCL (1M, pH 8,0)	50	ml
NaCl*	0-500	mM
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

*Die eingesetzte NaCl-Menge war abhängig von der genutzten NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium.

3.6.2 Zellaufschluss von *C. acetobutylicum* mittels FastPrep®

Für den Aufschluss von *C. acetobutylicum* mittels FastPrep® wurden lyophilisierte Zellen (3.6.1) in 2-ml-Schraubdeckelröhrchen überführt. Nach Zugabe von 600 µl geeigneter Aufschlusslösung (3.6.3, 3.6.4) und 400 mg Glasperlen (0,1-0,11 mm, Sartorius) konnten die Zellen mittels FastPrep® (FP120 Cell Disrupter, Thermo Savant) bei einer Geschwindigkeit von 6,0 m/s mit jeweils 6 Zyklen für 30 s aufgeschlossen werden. Zwischen den Zyklen erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 min. Die lysierten Zellen wurden anschließend bei 13000 Upm und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand konnte vom Glasbrei abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Der Glasbrei wurde anschließend mit 400 µl Aufschlusslösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation konnte der Überstand wie zuvor abgenommen und mit dem ersten Überstand vereint werden.

3.6.3 Prolin-Assay

Um den Prolin-Gehalt von Zellen zu bestimmen, fand ein von Abrahám *et al.* (2010) optimiertes kolorimetrisches Assay auf Ninhydrinbasis Anwendung. Bei einem sauren pH-Wert bildet Ninhydrin mit Prolin ein rotes Chromophor, welches für die photometrische Konzentrationsbestimmung verwendet werden kann. Die vorbereiteten Proben (3.6.1) wurden in Sulfosalicylsäure (3 % [w/v]) mittels FastPrep® aufgeschlossen (3.6.2). In 2-ml-Eppendorfgefäß wurde ein Reaktionsgemisch aus 100 µl Sulfosalicylsäure (3 %), 200 µl Eisessig, 200 µl saurem Ninhydrin sowie 100 µl Überstand (3.6.2) gegeben und gut vermischt. Die Reaktionsgefäße mussten dann mit einem Deckelverschluss gesichert und bei 96 °C für 60 min inkubiert werden. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Gefäße auf Eis, um die Reaktion zu beenden. Die nachfolgenden Arbeiten wurden unter einem Abzug durchgeführt. Um den gebildeten Farbstoff zu extrahieren erfolgte die Zugabe von 1 ml Toluol. Die Proben wurden mittels Vortexmixers für 20 s gründlich durchmischt und im Anschluss 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Trennung der organischen und der Wasserphase zu ermöglichen. Das im Toluol enthaltene Chromophor wurde in Quarzküvetten überführt und die Absorption bei 520 nm gegen Toluol als Referenz gemessen (Ultrospec 3000, GE Healthcare GmbH). Die Prolin-Konzentration konnte mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibrierungskurve bestimmt und auf Trockengewichtsbasis (3.6.1) berechnet werden. Dafür wurden Standardkonzentrationen von Prolin wie zuvor beschrieben behandelt und die Absorption bestimmt.

Sulfosalicylsäure (3 %)

5-Sulfosalicylsäure	3	g
<i>A. dest.</i>	ad	100

Saures Ninhydrin

Ninhydrin	1,25	g
Eisessig	30	ml
Orthophosphorsäure (6 M)	20	mL

Durch Vortexen und sanfte Erwärmung lösen. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C für bis zu einer Woche.

3.6.4 Glycin Betain-Bestimmung

Um den Glycin Betain (GB)-Gehalt der Zellen erfassen zu können, fand die von Valadez-Bustos *et al.* (2016) modifizierte Periodid-Methode zur Bestimmung quaternärer Ammoniumverbindungen (Grieve und Grattan 1983) Anwendung. Dabei wird GB als Periodidkomplex bei niedrigem pH-Wert ausgefällt und kann dann spektrophotometrisch, unter Nutzung einer Kalibrierungsgeraden, bestimmt werden. Die vorbereiteten Proben (3.6.1) wurden in H₂SO₄ (2 N) mittels FastPrep® aufgeschlossen (3.6.2) und im Anschluss bei 60 °C für 10 min inkubiert, um die quartären Ammoniumverbindungen zu extrahieren. Es folgte das Zentrifugieren bei 13000 Upm für 10 min bei Raumtemperatur. In einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß wurden nun vorsichtig 125 µl vom zellfreien Überstand mit 50 µl Iod-Kaliumiodid-Lösung gemischt. Zur Bildung der GB-Kristalle wurden die Gefäße im Dunkeln bei 0 bis 4 °C für 16 h inkubiert. Die anschließenden Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls im Dunkeln. Die gebildeten GB-Kristalle wurden mittels Zentrifugation bei 13000 Upm für 30 min bei 0 °C sedimentiert und der Überstand sorgfältig mit einer Pipette abgesaugt. Die sedimentierten Kristalle konnten anschließend in 1,4 ml 1,2-Dichlorehan aufgenommen und durch Schütteln für 48 h bei 150 Upm und Raumtemperatur gelöst werden. Die Absorption konnte in Quarzküvetten bei 290 nm mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000, GE Healthcare GmbH) abgelesen werden. Die Konzentration von GB konnte auch hier mittels einer zuvor erstellten Kalibrierungskurve bestimmt und auf Trockengewichtsbasis (3.6.1) berechnet werden. Dafür wurden Standardkonzentrationen von GB wie zuvor beschrieben behandelt und die Absorption bestimmt.

Iod-Kaliumiodid-Lösung

Jod	15,7	g
Kaliumiodid	20	g
<i>A. dest.</i>	ad	100

3.6.5 HPLC-Analysen

Zur Bestimmung des Aminosäure-Pools der Zellen erfolgte die Analyse mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, Shimadzu). Die vorbereiteten Proben (3.6.1) wurden in Ethanol (80 % [v/v], reinst) mittels FastPrep® aufgeschlossen (3.6.2) und im Anschluss bei 65 °C für 2 h inkubiert, um die freien Aminosäuren zu extrahieren. Der Überstand wurde im Anschluss durch Lyophilisierung getrocknet und in 1 ml Na₂HPO₄ (8 mM, pH 6,8) mit 0,4 % Tetrahydrofuran gelöst. Einzelne Aminosäuren wurden nach Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd unter Verwendung einer Hypersil 120 ODS-Säule (4,6x150 mm, KNAUER) mittels HPLC (CLASS-VP5, Shimadzu) bestimmt. Detaillierte Analysebedingungen sind der Arbeit von Möke (2014) zu entnehmen.

3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.7.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Materialien und Lösungen wurden vor dem Arbeiten für 20 min bei 121 °C autoklaviert, um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren. Hitzelabile Lösungen hingegen wurden durch einen Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm; Schleicher&Schuell) sterilfiltriert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96 %igem [v/v] Ethanol behandelt oder abgeflammt. Die Desinfektion von Arbeitsflächen und hitzelabilen Gebrauchsgegenständen erfolgte mit Ethanol (70 % [v/v]).

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

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte zum einen mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979), wobei das Standardprotokoll der Dissertation von Schulz (2013) zu entnehmen ist. Zum anderen wurde das „NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG), sowie das „Plasmid PLUS DNA Purification Mini Prep Kit“ (Genaxxon BioScience GmbH) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.7.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Die Gewinnung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte aus 50 ml CGM-Kulturen (3.2.3), die zuvor mit 0,1 Vol. einer Vorkultur (3.3.2.1) inkokuliert und bei 37 °C inkubiert wurden. Bei einer OD₆₀₀ der Kultur von 1 wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5000 Upm, 4 °C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit 1,5 ml Waschpuffer gewaschen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung des Zellsediments erfolgte bei -20 °C. Die Isolierung der DNA wurde nach einer modifizierten Methode von Bertram (1989) durchgeführt und ist detailliert in der Dissertation von Schulz (2013) beschrieben. Anschließend erfolgte eine Qualitätsprüfung der isolierten chromosomal DNA mittels Agarosegelektrophorese (3.7.7.1).

3.7.4 RNA-Seq

Zur Probengewinnung für die RNA-Sequenzierung wurde 0,1 Vol. einer MS-MES Vorkultur (3.3.2.1) in 50 ml MS-MES-Medium (3.2.3) inkuliert und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ der Kultur von ca. 1,5 wurden 750 µl durch Zentrifugation (5 min, 5000 Upm, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Die weiterführenden Arbeiten wurden durch das Göttingen *Genomics Laboratoy* durchgeführt. Für die RNA-Isolierung wurde das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) genutzt, aber statt des RW1- wurde RWT-Puffer (Qiagen) verwendet, um auch RNAs kleiner 200 nt zu isolieren. Zur Bestimmung der RNA-Integritätszahl (RIN) wurde die isolierte RNA mit einem Agilent Bioanalyzer 2100 unter Verwendung des „Agilent RNA 6000 Nano Kit“ (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben analysiert. Verbleibende genomische DNA konnte durch den Verdau mit TURBO DNase (Invitrogen, ThermoFischer Scientific) entfernt werden. Das „Ribo-Zero™ Magnetic Kit“ (Epicentre Biotechnologies) wurde verwendet, um die Anzahl der rRNA-abgeleiteten Sequenzen zu reduzieren. Für die Sequenzierung wurden strangspezifische cDNA-Bibliotheken mit dem „NEBNext Ultra II directional RNA library preparation Kit for Illumina“ (New England BioLabs) erstellt. Zur Qualitäts- und Größenbestimmung der Bibliotheken wurden Proben mittels Agilent Bioanalyzer 2100 und einem „Agilent High Sensitivity DNA Kit“, wie vom Hersteller (Agilent Technologies) empfohlen, untersucht. Die Konzentrationsbestimmung der Bibliotheken erfolgte mittels „Qubit® dsDNA HS Assay Kit“ gemäß Herstellerangaben (Life Technologies GmbH). Die Sequenzierung erfolgte mittels HiSeq4000 (Illumina Inc.), dem „HiSeq 3000/4000 SR Cluster Kit“ zur Clustergenerierung und dem „HiSeq 3000/4000 SBS Kit“ (50 Zyklen) zur Sequenzierung im Single-End-Modus (1 x 50 Zyklen). Für die Qualitätsfilterung und das Entfernen der restlichen Adaptersequenzen wurden Trimmomatic-0.32 (Bolger *et al.* 2014) und ein *Cutoff phred-33 Score* von 15 verwendet. Die Zuordnung der restlichen Sequenzen erfolgte mit dem Programm *Bowtie* (V2, Langmead und Salzberg 2012 im implementierten End-to-End-Modus, der eine Ausrichtung des gesamten *Reads* von einem Ende zum anderen erfordert. Zuerst wurden gepaarte Endlesungen gegen eine Datenbank abgebildet, die aus tRNA- und rRNA-Sequenzen von *C. acetobutylicum* besteht. Nicht ausgerichtete Lesungen wurden anschließend gegen das Genom von *C. acetobutylicum* abgebildet. Differentielle Expressionsanalysen erfolgten mit dem BaySeq-Programm (Mortazavi *et al.* 2008). Gene mit log2-facher Expressionsänderung von $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$, einem Wahrscheinlichkeitswert von $\geq 0,9$ und einem angepassten p-Wert von $\leq 0,05$ wurden als differentiell exprimiert angesehen. Der p-Wert wurde dabei durch die Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR) auf der Grundlage des Benjamini-Hochberg-Verfahrens korrigiert. Die RNA-Seq-Daten wurden an die SRA-Datenbank übermittelt.

3.7.5 PCR-Techniken

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Erzeugung von DNA-Fragmenten genutzt. Diese konnten für weitere Klonierungsschritte (3.7.6) oder zur Verifikation positiver Klone verwendet werden. Die Amplifikation fand in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biometra) statt. Standard-PCR-Analysen wurden mit der *Pwo* DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Genaxxon biosciene GmbH) durchgeführt.

3.7.5.1 Primerdesign

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden spezifisch an die entsprechenden Zielsequenzen angepasste Oligonukleotide (Tabelle 6, Anhang) abgeleitet. Um eine spätere Klonierung der PCR-Fragmente in entsprechende Vektoren (Tabelle 4, Anhang) zu ermöglichen, wurden am 5'- bzw. 3'-Ende der eigentlichen Primersequenz Restriktionsschnittstellen eingefügt. Zusätzlich erfolgte die Einführung von sechs Adenin-Nukleotiden am 5'-Ende, wodurch eine Zusammenlagerung der Primer verhindert werden sollte. Oligonukleotid-Paare wurden so konstruiert, dass sich die Schmelztemperaturen nicht mehr als 3 °C unterscheiden. Die Berechnungen der Schmelztemperaturen erfolgten durch OligoCalc (Kibbe 2007) unter <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.

3.7.5.2 Standard-PCR

Der Reaktionsansatz für eine Standard-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Template DNA	10-100	ng
10x <i>Pwo</i> -Puffer (complete)	5	µl
dNTPs (je 10 mM)	1	µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	2	µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	2	µl
<i>Pwo</i> -Polymerase	1	µl
<i>A. dest.</i> ad	50	µl

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Programm genutzt:

Denaturierung	94	°C	2	min	1 x
Denaturierung	94	°C	30	s	
Anlagerung	T _m (Primer) – 3 °C		30	s	← 30 Zyklen
Elongation	72	°C	1	min/kBp	
Elongation	72	°C	5	min	1 x
Lagerung	4	°C	∞	unendlich	

3.7.5.3 Colony-PCR

Diese PCR wurde zur Verifikation von positiven *C. acetobutylicum*-Klonen unter Verwendung der Terra™ Polymerase (1,25 U/μ, Takara Bio Europe SAS) verwendet. Dafür wurden entsprechende Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse von RCA-Platten entnommen und in 25 μl sterilem *A. dest.* suspendiert, bei 99 °C für 10 min aufgekocht und die Zelltrümmer sedimentiert (13000 Upm, 1 min, 4 °C). Anschließend konnte 1 μl des zellfreien Überstands für einen 25 μl PCR-Reaktionsansatz eingesetzt werden. Dabei erfolgte die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, sowie die Programmierung des Thermocyclers nach Herstellerangaben (Terra™ PCR Direct Polymerase Mix, Takara Bio Europe SAS).

3.7.5.4 Splicing by overlap extension-PCR (SOE-PCR)

Für eine zielgerichtete Mutation von *C. acetobutylicum* ATCC 824 fand das ClosTron® Gene Knockout System Anwendung (Heap *et al.* 2007; Heap *et al.* 2010). Hintergrund ist die Inaktivierung entsprechender Zielgene mittels Insertionsmutagenese unter Verwendung eines mobilen Gruppe-II-Introns. Das mobile Gruppe-II-Intron muss dabei spezifisch mittels SOE-PCR (Ho *et al.* 1989) an das entsprechende Zielgen angepasst werden. Dafür erfolgte die Generierung von spezifischen Oligonukleotidsequenzen durch die ClosTron®-Homepage (Heap *et al.* 2010). Als Basis diente dabei die Sequenz des zu mutierenden Genes. Im Zuge dieser SOE-PCR mussten drei an das Zielgen angepasste Primer (IBS, EBS-1d, EBS-2) und ein unveränderter Primer (EBS Universal) gemeinsam in einem Reaktionsansatz zu einem „Four Primer Mix“ vereint werden (Tabelle 6, Anhang). IBS- und EBS-1d-Primer wurden im Überschuss eingesetzt, um eine verstärkte Bildung des an die Zielsequenz angepassten Introns (350 Bp) zu fördern (Abb. 4.2).

„Four Primer Mix“

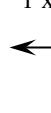
IBS (100 μM)	2	μl
EBS-1d (100 μM)	2	μl
EBS-2 (20 μM)	2	μl
EBSUniversal (20 μM)	2	μl
<i>A. dest.</i> ad	20	μl

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich nach folgendem Schema zusammen:

Intron-DNA	1	μl
dNTPs (je 10 mM)	1	μl
„Four Primer Mix“	2	μl
10x <i>Pwo</i> -Puffer complete	5	μl
<i>Pwo</i> -Polymerase	1	μl
<i>A. dest.</i> ad	50	μl

Für die SOE-PCR wurde das folgende Programm genutzt:

Denaturierung	94	°C	30	s	1 x
Denaturierung	94	°C	15	s	
Annealing	55	°C	30	s	
Elongation	72	°C	30	s	
Elongation	72	°C	2	min	1 x
Lagerung	4	°C	∞	unendlich	



30 Zyklen

Anschließend wurden alle Ansätze mittels Gelelektrophorese (3.7.7.1) aufgetrennt und durch eine Gel-Extraktion (3.7.7.2) aufgereinigt.

3.7.6 Enzymatische Modifikationen von DNA

3.7.6.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Tabelle 7) war eine sequenzspezifische Hydrolyse von Nukleinsäuren und Erzeugung von linearen DNA-Fragmenten mit definierten Enden möglich. Diese wurden zum einen für die Agarosegelelektrophorese (3.7.7.1) und zum anderen für Ligationsreaktionen (3.7.6.3) eingesetzt. Die Verwendung der empfohlenen Puffer und Inkubationszeiten erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Scientific). Das Mindestvolumen des Restriktionsansatzes für den Verdau von 1 µg DNA betrug 10 µl.

3.7.6.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Selbstligation der verwendeten Vektoren (Tabelle 4) während der Ligationsschritte zu unterbinden, musste nach dem Restriktionsverdau eine Dephosphorylierung des 5'-Endes mittels der FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) erfolgen. Linearisierte Vektor-DNA wurde dabei mit 2 U FastAP™ und 1x FastAP™-Puffer versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss fand eine Aufreinigung statt (3.7.7.2), um das eingesetzte Enzym und die Puffer wieder zu entfernen.

3.7.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Thermo Scientific) in einem 20 µl-Standardvolumen mit 1x T4-Ligase-Puffer bei 22 °C für 1 h oder bei 16 °C über Nacht. Im Ligationsansatz wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, um eine effiziente Reaktion zu gewährleisten. Im Anschluss konnten der Ligationsansatz direkt für eine Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen (3.8.1) verwendet werden.

3.7.6.4 *In vivo* Methylierung von Plasmid-DNA

Vor der Transformation von Plasmid-DNA in *C. acetobutylicum* ist die spezifische Methylierung der eingesetzten Plasmide notwendig, da diese sonst als Fremd-DNA erkannt und abgebaut werden. Hierfür wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* ER2275 pAN-II transformiert (3.8.2). Die auf dem Plasmid pAN-II kodierte Methyltransferase Φ3TI (*B. subtilis* Phage) erzeugt das gleiche DNA-Methylierungsmuster wie in *C. acetobutylicum* (Mermelstein *et al.* 1992). Die Plasmide wurden erneut isoliert (3.7.2), auf Methylierung mittels Restriktionsverdau mit *SatI* kontrolliert (3.7.6.1) und anschließend für die Transformation in *C. acetobutylicum* (3.8.3) eingesetzt.

3.7.7 Agarose-Gelelektrophorese

3.7.7.1 Standard-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook und Russell 2001) in Agarosegel-Mini-Kammern (Whatman Biometra) konnte die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgen. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente variierte die eingesetzte Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer zwischen 0,8-1,5 % (w/v). Zur Visualisierung der Lauffront und um ein möglichst vollständiges Einsinken der Proben in die Geltaschen zu gewährleisten, wurden diese vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Zusätzlich wurden Längenstandards (Thermo Scientific) aufgetragen, um eine Größen- bzw. Konzentrationsabschätzung der DNA vornehmen zu können. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V (Power Pack P 25) für 30-60 min unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer. Für die Agarosegelelektrophorese von RNA wurden die Elektrophoresetensilien gesondert gereinigt (3.7.1) und es wurde mit steriler Agarose und sterilem Laufpuffer gearbeitet.

Zur Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte entweder die Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad (1µg/ml *A. dest.*) für 15-30 min mit anschließender Wässerung für 2 min oder die Anwendung des Farbstoffes GelRed (Genaxxon BioScience GmbH) direkt im Loading Dye. Die DNA-Fragmente konnten nachfolgend bei einer Wellenlänge von 312 nm mittels einer Photodokumentationsanlage (DarkHood DH-50, Biostep GmbH) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

50x TAE (Sambrook und Russell 2001)

Tris	242	g
Eisessig	57,1	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100	ml
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

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> <i>ad</i>	10	ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert

3.7.7.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte) aus Agarosegelen sowie die Aufreinigung (PCR-Produkte, Vektor-DNA) erfolgte unter Verwendung des „Gel extraction Mini Prep Kit“ bzw. des „Plasmid PLUS DNA Purification Mini Prep Kit“ (Genaxxon BioScience GmbH). Für die Isolierung wurde die gewünschte DNA-Bande nach gelelektrophoretischer Auftrennung (3.7.7.1) unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und gemäß den Herstellerangaben. Es folgte die Qualitätsüberprüfung der DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel (3.7.7.1).

3.8 Erzeugung rekombinanter Mikroorganismen

3.8.1 CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli*

Für CaCl₂-vermittelte Transformationen von Vektor-DNA in *E. coli* Zellen (Tabelle 3, Anhang) wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 20 µl Ligationsansatz (3.7.6.3) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis mit anschließendem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min schloss sich die Regeneration der Zellen durch Zugabe von 900 µl LB-Medium (3.2.2) und Inkubation bei 37 °C und 180 Upm für 1 h an. Dann wurden 50 -200 µl der Zellen zur Selektion auf LB-Festmedium mit entsprechenden Zusätzen (3.2.2, Tabelle 8, Anhang) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung des Transformationsvorganges wurden rekombinante Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium mit jeweiligem Selektionszusatz inkokuliert und anschließend mittels Plasmidminipräparation (3.7.2) überprüft.

3.8.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Elektroporation von *E. coli* zur Aufnahme von Vektor-DNA (Dower *et al.* 1988) erfolgte unter Verwendung eines GenePulserII™ (Bio-Rad Laboratories, München). Dafür wurden 40 µl elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend zusammen mit 2,5 µl Vektor-DNA in bei -20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) gegeben. Die Elektroporation fand bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV statt, wobei Zeitkonstanten von 4,5-5,2 ms erreicht werden sollten. Im Anschluss konnte die Regeneration der Zellen durch Zugabe von 500 µl LB-Medium (3.2.2) und einer Inkubation für 1 h bei 37 °C und 180 Upm erreicht werden.

Nachfolgend wurden 20-100 µl der Zellen auf Selektionsfestmedium (3.2.2, Tabelle 8, Anhang) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine erfolgreiche Transformation konnte durch Inokulation von Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium mit jeweiligem Selektionszusatz und anschließender Plasmidisolation (3.7.2) bestätigt werden.

3.8.3 DNA-Transfer in *C. acetobutylicum*

Die Transformation mittels Elektroporation von *C. acetobutylicum* erfolgte nach Mermelstein *et al.* (1992) mit Hilfe eines GenePulserII™ (Bio-Rad). Die genutzten kompetenten *C. acetobutylicum*-Zellen waren stets frisch angezogen. Dafür wurden 50 ml CGM-Medium (3.2.3) mit einer CGM-Vorkultur inkuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde auf Eis und unter anaeroben Bedingungen gearbeitet. Die Durchführung erfolgte, bis auf die Zentrifugation, in einer Anaeroben-Werkbank (MACS-MG 1000, Meintrup DWS Laborgeräte GmbH). Für die Zentrifugation (Sorvall RC 6C Plus, Kendro Laboratory Products GmbH) kamen anaerobe SS34-Zentrifugenröhren zum Einsatz. Die genauen Arbeitsschritte und verwendeten Puffer sind der Dissertation von Schulz (2013) zu entnehmen.

3.8.4 ClosTron® Insertionsmutagenese

Mit Hilfe des ClosTron® Systems (Heap *et al.* 2007; Heap *et al.* 2010) konnte eine gezielte Inaktivierung von Genen in *Clostridium* mittels Insertionsmutagenese erfolgen. Zuvor wurde ein Algorithmus (<http://clostron.com/clostron2.php>, Perutka *et al.* 2004) angewendet, um den bestmöglichen Insertionsort im Zielgen und entsprechende Oligonukleotide für die Insertionsmutagenese abzuleiten (Tabelle 6, Anhang). Das mobile Gruppe-II-Intron musste anschließend durch eine SOE-PCR (3.7.5.4) an das Zielgen angepasst und das resultierende 350-Bp-Insert durch Hydrolyse mit *Hind*III und *Bsp*1407I (Tabelle 7, Anhang) in den Vektor pMTL007C-E2 (Tabelle 4, Abbildung 7.7, Anhang) kloniert werden. Nach der Methylierung des Konstruktet in *E. coli* ER2275 (3.7.6.4) konnte die Transformation in *C. acetobutylicum* erfolgen (3.8.3). Erfolgreiche Transformanten wurden auf RCA-Medium (3.2.3) mit Thiamphenicol (Tabelle 8, Anhang) selektiert. Davon wurde eine resistente Kolonie in 500 µl CGM-Medium (3.2.3) für 4 h inkubiert. Während dieser Wachstumsphase fand die Integration des Introns in das Genom von *C. acetobutylicum* und die Ausbildung einer Erythromycin-Resistenz statt. Im Anschluss erfolgte die Selektion auf RCA-Medium mit Erythromycin (3.2.3, Tabelle 8, Anhang). Für den Nachweis der korrekten Integration in das Zielgen wurden die resistenten Klone mittels Colony-PCR (3.7.5.3) und im Southern Blot unter Verwendung einer Gen-spezifischen und *erm*RAM-spezifischen Sonde verifiziert (3.9.2).

3.9 Übertragung von DNA auf Membranen (*Southern Blot*)

3.9.1 Southern Blot

Der von Southern (1975) entwickelte Kapillarblot ermöglichte die Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente auf Nylonmembranen, um durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch Gensequenzen nachweisen zu können. Dazu erfolgte nach entsprechender Hydrolyse der DNA (Tabelle 7) die Auf trennung in einem Agarosegel (1 %, 3.7.7.1). Das Gel wurde anschließend für 10 min in 0,25 N HCl gewaschen, um Einzelstrangbrüche zu erzeugen und den Transfer zu erleichtern. Danach folgten eine Denaturierung und Neutralisierung für jeweils 30 min in entsprechenden Puffern (s. u.). Währenddessen wurden Nylonmembran und Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) auf die Gelgröße zugeschnitten. Vor dem Aufbau des Blots mussten sowohl das Gel, als auch die Nylonmembran in 2x SSC-Puffer für 5 min äquilibriert werden. Es wurden 4 Lagen Whatman-Papier in 2x SSC-Puffer angefeuchtet und auf einen Stapel Filterpapier (ca. 10 cm Höhe) aufgeschichtet. Danach wurden luftblasenfrei die Nylonmembran und das Agarosegel platziert und der Aufbau mit einer Glasscheibe und einem Gewicht (500 g) stabilisiert. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte in ca. 15-20 h. Anschließend wurde die DNA auf der Membran durch beidseitiges *cross-linking* für 3 min bei 254 nm (DarkHood DH-50, Biostep GmbH) kovalent fixiert.

Denaturierungspuffer

NaOH	35,06	g
NaCl	87,66	g
<i>A. dest.</i>	ad	1000 ml

Neutralisierungspuffer

NaCl	16	g
Tris	60,55	g
<i>A. dest.</i>	ad	1000 ml

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

20x SSC-Puffer

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

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

3.9.2 Hybridisierung der Membran

Die Nylonmembran (3.9.1) musste zuerst in einem Hybridisierungsröhrchen (Ochs) mit 20 ml Hybridisierungslösung in einem entsprechenden Ofen (Biometra) bei 42 °C vorbehandelt werden, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Die für die Detektion verwendeten Digoxigenin

(DIG)-markierten DNA-Sonden wurden mit dem „DIG-DNA Labeling Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben generiert. Anschließend wurde die DIG-markierte DNA-Sonde in 5 ml Hybridisierungslösung gelöst und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen, die noch heiße Sonde auf die Membran gegeben und für 16-24 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen bei gleichmäßiger Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 2x SSC-SDS-Puffer für jeweils 15 min gewaschen und konnte für die Detektion (3.9.3) eingesetzt werden.

Hybridisierungspuffer

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

2x SSC-SDS-Puffer

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

3.9.3 Detektion Digoxigenin-markierter DNA

Die Detektion DIG-markierter DNA (3.9.2) erfolgte mit einem Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (Roche). Dabei setzt die Antikörper-gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) chromogene Substrate wie NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) um, was zu einem tiefblauen Farbumschlag führt und dem Nachweis der DNA dient. Die Membran wurde hierfür 1 min mit Puffer 1 gewaschen und anschließend 1-2 h in Puffer 2 bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Puffer 1 für 5 min erfolgte die Inkubation mit 20 ml Antikörper-Konjugat-Lösung für 30 min bei RT. Es schloss sich das zweimalige Waschen mit Puffer 1 für jeweils 15 min und die Äquilibrierung der Membran mit Puffer 3 für 2 min an. Der optische Nachweis fand im Dunkeln mit 5 ml Färbelösung statt, bis eine ausreichende Färbung der Banden erzielt wurde. Die Reaktion konnte durch das Waschen mit *A. dest.* gestoppt werden.

Puffer 1

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

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

Puffer 2

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

Antikörper-Konjugat-Lösung

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

Puffer 3

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	ml
NaCl	5,84	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,17	g
<i>A. dest.</i> ad	1000	ml

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

Färbelösung

Puffer	35	ml
NBT/BCIP-Lösung	40	µl

3.10 Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde in mindestens zweifach biologisch unabhängigen Replikaten durchgeführt und die Daten als Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) berechnet. Die p-Werte wurden durch *Dunnett's multiple comparisons test* bzw. *Holm-Sidak's multiple t-test* bestimmt. Ein p-Wert geringer als 0,05 wurde dabei als signifikant betrachtet. Die Datenanalyse wurde mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurde in einigen Diagrammen auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet. Die entsprechenden Werte (MW, SD) sind in Abbildung 7.2 - Abbildung 7.6 im Anhang zu finden.

3.11 Bezugsquellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Diagonal (Münster), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Fluka/Riedel-de Haen (über Sigma-Aldrich), Merck KG Feinchemikalien und Laborbedarf Deutschland (Darmstadt) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) bezogen. In der Regel hatten diese die Reinheitsgrade „reinst“ oder „zur Analyse“. Gase wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert. Die Bezugsquellen für Chemikalien (Tabelle 9) und Materialien (Tabelle 10) sind detailliert im Anhang zu finden.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstum von *C. acetobutylicum* unter Salzstress

Um einen ersten Einblick in das Verhalten von *C. acetobutylicum* unter Salzstress zu erhalten, wurden Wachstumsversuche bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen durchgeführt (3.3.2.1). Dabei sollten neben der optischen Dichte und dem pH-Wert auch die Bildung der Fermentationsprodukte, sowie die Glukoseassimilation verfolgt werden, um eine Aussage über die Produktivität der Zellen treffen zu können. In Abbildung 4.1 sind die Entwicklung der optischen Dichte und des pH-Wertes bei verschiedenen Salzkonzentrationen über einen Zeitraum von 130 h dargestellt.

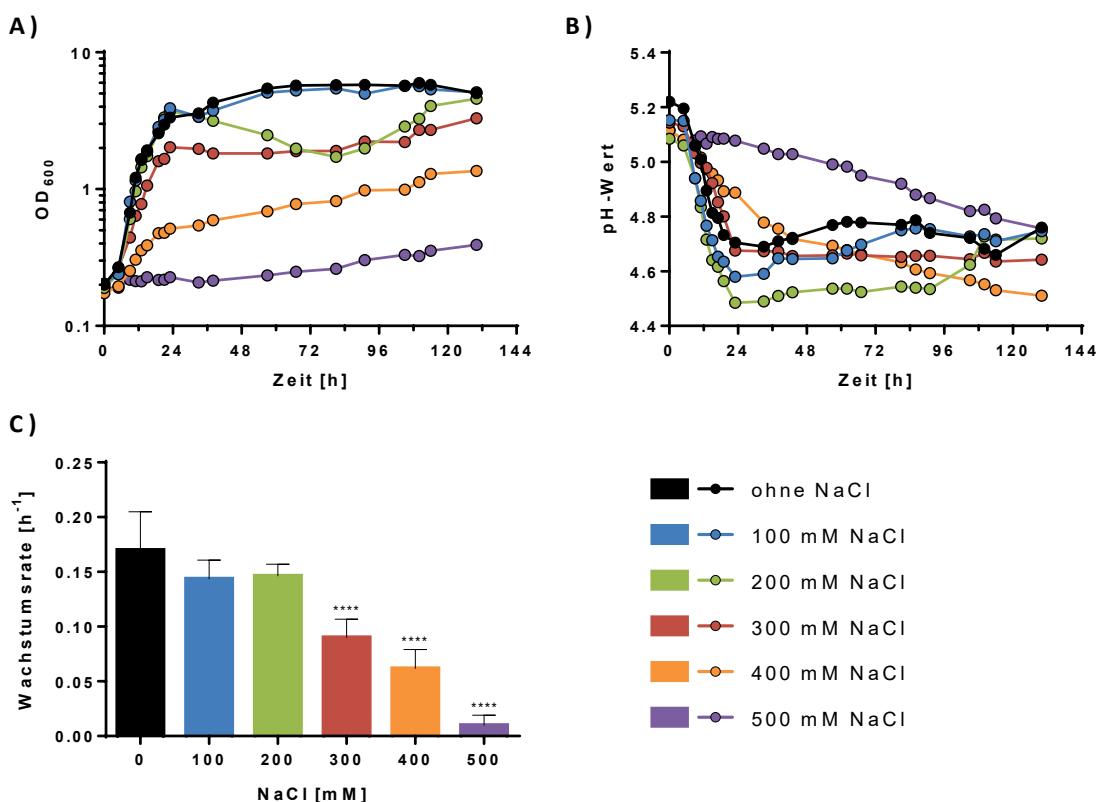


Abbildung 4.1 - Einfluss von NaCl auf das Wachstum von *C. acetobutylicum*.

(A) Optische Dichte bei 600 nm, (B) pH-Wert und Wachstumsraten bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen vergleichend zur ungestressten Kontrolle (schwarz). 200 ml MS-MES, 130 h, 37 °C, n ≥ 3, Dunnett's multiple comparison (**** p ≤ 0,0001; aus Übersichtlichkeitsgründen wurde bei A und B auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

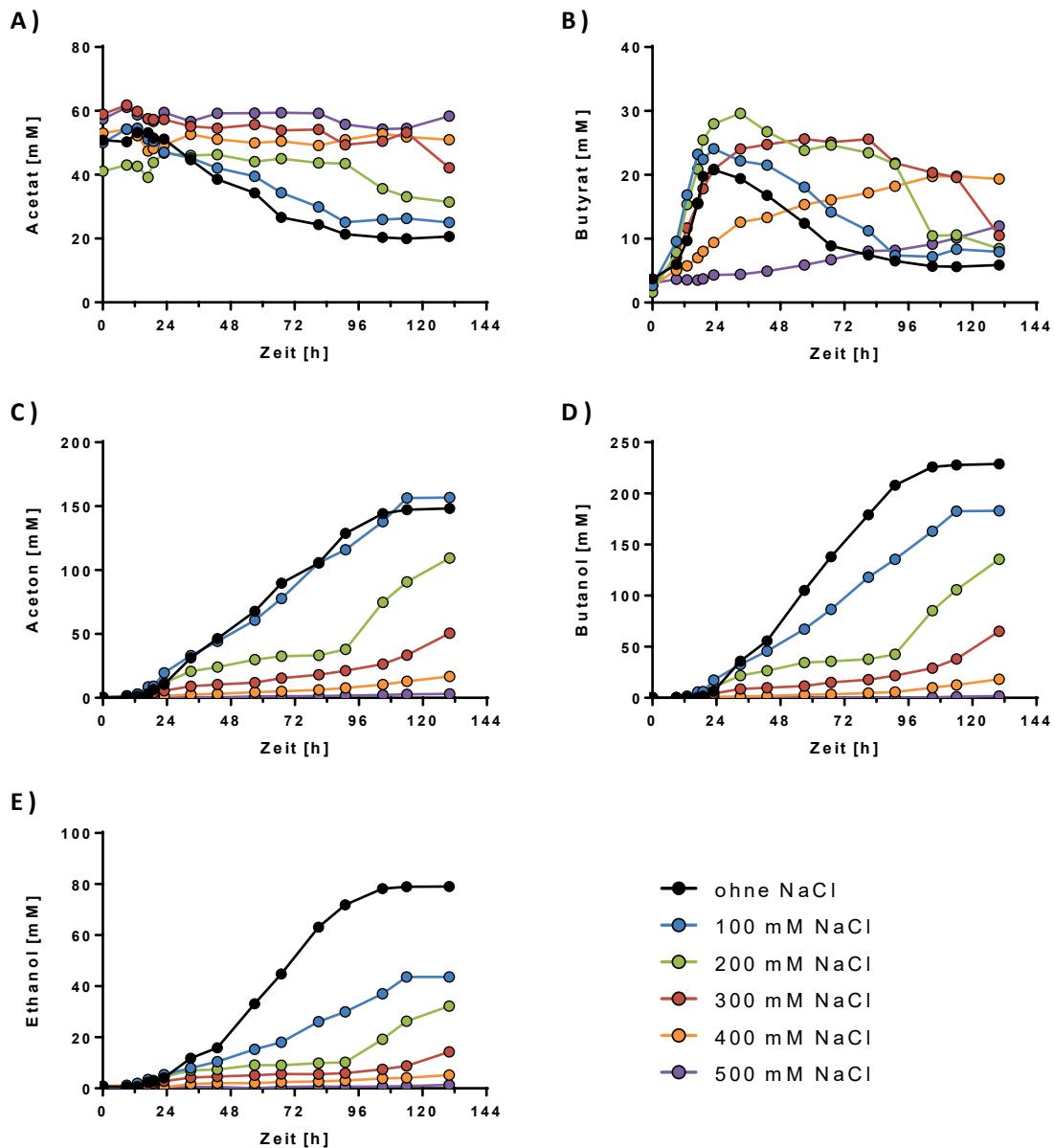
In Minimalmedium ohne NaCl-Zusatz trat *C. acetobutylicum* nach ca. 7 h aus der lag-Phase in die Phase des exponentiellen Wachstums ein. Diese war gekennzeichnet durch eine rasche Zunahme der optischen Dichte bei einer Wachstumsrate von 0,17 h⁻¹. Nach etwa 23 h stagnierte das Wachstum bei einer OD von etwa 3,33 und der Wildtyp ging in die stationäre Phase über. Die maximale optische Dichte mit 6,1 wurde allerdings erst nach 67 h erreicht. Ein ähnlicher

Wachstumsverlauf war auch bei der Zugabe von 100 mM NaCl zum Wachstumsmedium zu erkennen. Die Wachstumsrate fiel mit $0,144 \text{ h}^{-1}$ etwas geringer aus, im Vergleich zum salzfreien Medium. Nach 23 h bei einer OD von 3,89 setzte die stationäre Phase ein und die maximale optische Dichte von 5,62 wurde erst nach 86 h erreicht. Erste Veränderungen im Wachstumsverhalten zeigten sich bei der Zugabe von 200 mM NaCl zum Medium. Hinsichtlich lag- und exponentieller Wachstumsphase gab es kaum Unterschiede zu den bereits beschriebenen Kultivierungen und die Wachstumsrate von 146 h^{-1} ähnelte der von 100 mM NaCl. Die stationäre Phase der 200 mM-Kultur begann ebenfalls nach ca. 23 h bei einer OD von 3,72. Dabei war der Wachstumsverlauf jedoch durch einen Rückgang auf eine OD von 1,72 zwischen 23 h und 81 h gekennzeichnet. Im Anschluss stieg die OD wieder an und erreichte erst am Ende des Wachstumsversuches bei 130 h eine maximale OD von 4,21. Der negative Einfluss von Salz auf das Wachstum von *C. acetobutylicum* wurde bei der Zugabe von 300 mM NaCl deutlich und äußerte sich durch eine auffällig verminderte Wachstumsrate von $0,09 \text{ h}^{-1}$. Nach 19 h und bei einer OD von 1,6 trat die stationäre Phase ein, wobei die maximale OD von 3,29 ebenfalls erst am Ende des Versuches nach 130 h erreicht wurde. Mit zunehmender Salzkonzentration im Medium wurden auch die wachstumsinhibierenden Effekte größer. Bei 400 mM NaCl betrug die Wachstumsgeschwindigkeit während der exponentiellen Phase noch $0,04 \text{ h}^{-1}$. Nach etwa 17 h und einer OD von 0,407 scheint die Wachstumsgeschwindigkeit abzunehmen und die Kultur in ein lineares Wachstum überzugehen, sodass am Ende nach 130 h die OD bei 1,36 lag. Das Wachstum bei 500 mM NaCl äußerte sich ebenfalls durch eine sehr langsame und lineare Zunahme der OD, sodass die finale OD nach 130 h Wachstum bei 0,391 lag.

Neben der optischen Dichte konnte auch der extrazelluläre pH-Wert der Kulturen einen Aufschluss über das Wachstumsverhalten geben (Abbildung 4.1, B). Der typische pH-Verlauf beim Wildtyp ohne NaCl startete bei einem Ausgangswert von 5,2, welcher mit dem Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase aufgrund der Säurebildung bis auf einen Minimalwert von 4,7 nach ca. 33 h abnahm. Mit dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase setzte der für *C. acetobutylicum* charakteristische „Lösungsmittelshift“ ein. Dieser zeichnete sich durch die Reassimilierung der Säuren und deren nachfolgende Umwandlung in pH-neutrale Lösungsmittel aus. Dadurch kommt es zu einem erneuten Ansteigen des pH-Wertes auf bis zu 4,8. Auch unter leichtem Salzstress (100-200 mM NaCl) fiel der pH-Wert während der exponentiellen Wachstumsphase, wobei er bei 100 mM NaCl im Wachstumsmedium einen Minimalwert von 4,6 und bei 200 mM NaCl sogar 4,5 erreichte. Während der stationären Phase stieg jedoch auch dort der pH-Wert wieder an und erreichte bei 100 mM NaCl Werte wie unter salzfreiem Wachstum. Bei 200 mM NaCl war dies auch der Fall, allerdings konnte dort erst gegen Ende des Wachstumsversuches wieder ein pH-Wert von ca. 4,7 erreicht werden. Wurde das Wachstumsmedium mit 300 mM NaCl versetzt, so ähnelte der pH-Wertverlauf dem ohne Salzstress. Jedoch zeigte sich zum Zeitpunkt der Transitionsphase ein gleichbleibend niedriger Wert um ca. 4,7, der auch während der stationären Phase auf diesem Level stagnierte und sich bis zum Ende des Versuches nicht mehr veränderte. Unter 400 mM und 500 mM Salzstress war über den gesamten Wachstumsverlauf ein kontinuierliches Absinken des

pH-Wertes zu beobachten. Bei 400 mM NaCl sank dieser stärker ab und erreichte nach 130 h einen Wert von 4,5, wohingegen bei 500 mM NaCl der pH-Wert nach 130 h ca. 4,8 betrug.

Der Verlauf des pH-Wertes über die verschiedenen Wachstumsphasen ist wie bereits erwähnt auf die Bildung der Gärungsprodukte von *C. acetobutylicum* zurückzuführen. Diese konnten mittels Gaschromatographie (3.5.5) analysiert werden und sind in Abbildung 4.2 dargestellt.



(Fortsetzung nächste Seite)

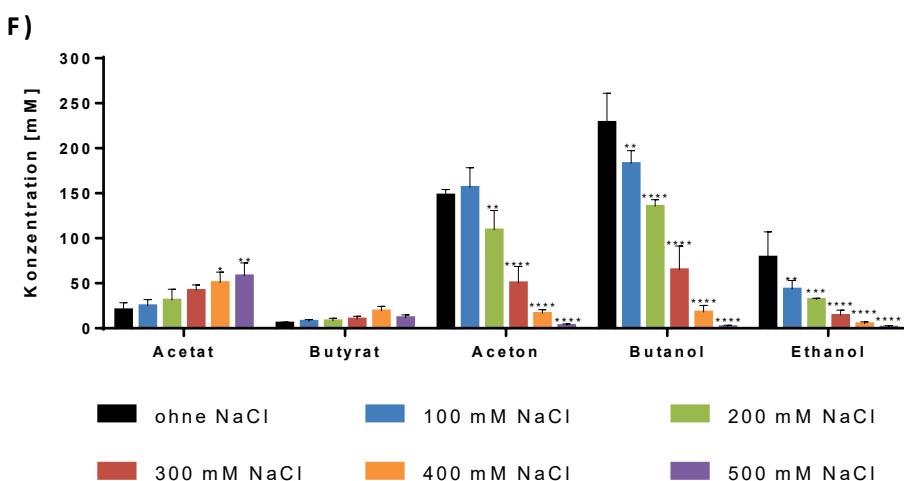


Abbildung 4.2 - Einfluss von NaCl auf die Bildung der Fermentationsprodukte von *C. acetobutylicum*.

(A) Acetat, (B) Butyrat, (C) Aceton, (D) Butanol, (E) Ethanol sowie (F) Finales Produktspektrum nach 130 h Wachstum bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen im Vergleich zur ungestressten Kontrolle (schwarz), 200 ml MS-MES, 120 h, 37 °C, n = 4, Dunnett's multiple comparison (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001; aus Übersichtlichkeitsgründen wurde in A-E auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Während des exponentiellen Wachstums bildete *C. acetobutylicum* typischerweise die Säuren Acetat und Butyrat, die dann während der stationären Phase reassimiliert und zu den Lösungsmitteln Aceton, Butanol und Ethanol umgewandelt wurden. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Salzkonzentration im Medium die Konzentration der Säuren zunahm. Während im salzfreien Wachstumsversuch die Acetatkonzentration von ca. 51 mM auf 21 mM nach 130 h sank, so waren bei 300 mM NaCl noch 40 mM Acetat am Ende des Wachstumsversuches im Medium zu detektieren. Bei 400 mM bzw. 500 mM NaCl blieb die Acetatkonzentration während des gesamten Wachstumsverlaufes auf einer Höhe von ca. 51 mM bzw. 58 mM. Bei Butyrat war ein ähnliches Bild zu erkennen. Im salzfreien Medium produzierte *C. acetobutylicum* in der exponentiellen Wachstumsphase bis zu 21 mM Butyrat, das im Verlauf der stationären Phase auf eine Konzentration von ca. 6 mM zurückging. So verhielt es sich auch bei 100 mM bzw. 200 mM NaCl im Medium. Allerdings nahm mit steigendem Salzgehalt auch die Konzentration des produzierten Butyrats zu, sodass zum „Lösungsmittelshift“ 24 mM bzw. 29 mM Butyrat im Medium vorlagen. Auch die Reassimilierung setzte mit steigendem Salzstress verspätet bzw. gar nicht ein. Während bei 300 mM NaCl die Butyratkonzentration erst nach etwa 80 h abnahm, zeigte sich bei 400 mM bzw. 500 mM NaCl eine stetige Zunahme der Butyratkonzentration auch während der stationären Wachstumsphase.

Die Lösungsmittelbildung setzt bei *C. acetobutylicum* typischerweise nach ca. 17 h Wachstum mit dem Übergang in die stationäre Phase ein. Ohne Salzstress war der Wildtyp in der Lage, 150 mM Aceton, 230 mM Butanol und 80 mM Ethanol zu bilden. Bei 100 mM NaCl im Wachstumsmedium verhielt sich die Acetonproduktion wie im salzfreien Medium, jedoch war die Butanol- und Ethanolproduktion vermindert und erreichte finale Konzentrationen von nur 183 mM Butanol bzw. 44 mM Ethanol. Bei 200 mM NaCl-Stress zeigte sich eine verlangsamte Lösungsmittelbildung, die

erst nach ca. 90 h einsetzte und finale Konzentrationen von 109 mM Aceton, 136 mM Butanol und 32 mM Ethanol erreichte. Bei 300 mM NaCl zeigte sich noch eine leichte Zunahme der Lösungsmittel während der stationären Phase, allerdings wurden nur noch sehr geringe Mengen im Vergleich zum salzfreien Medium produziert. Wurde die Salzkonzentration noch weiter erhöht, war so gut wie keine Lösungsmittelproduktion mehr zu verzeichnen. Der Einfluss von Salzstress auf das finale Produktspektrum von *C. acetobutylicum* ist noch einmal in Abbildung 4.2, F illustriert. So zeigt sich allgemein, dass mit zunehmender NaCl-Menge im Medium eine erhöhte Säurekonzentration zu detektieren war. Im Gegensatz dazu nahm die Produktion der Lösungsmittel mit Zunahme des Salzstresses sukzessiv ab. Um die Lösungsmittelbildung unter Salzstress genauer zu charakterisieren, erfolgte zusätzlich die Messung des Glukoseverbrauchs und die daraus resultierende Berechnung der Lösungsmittelerträge sowie der -produktivitäten (Abbildung 4.3).

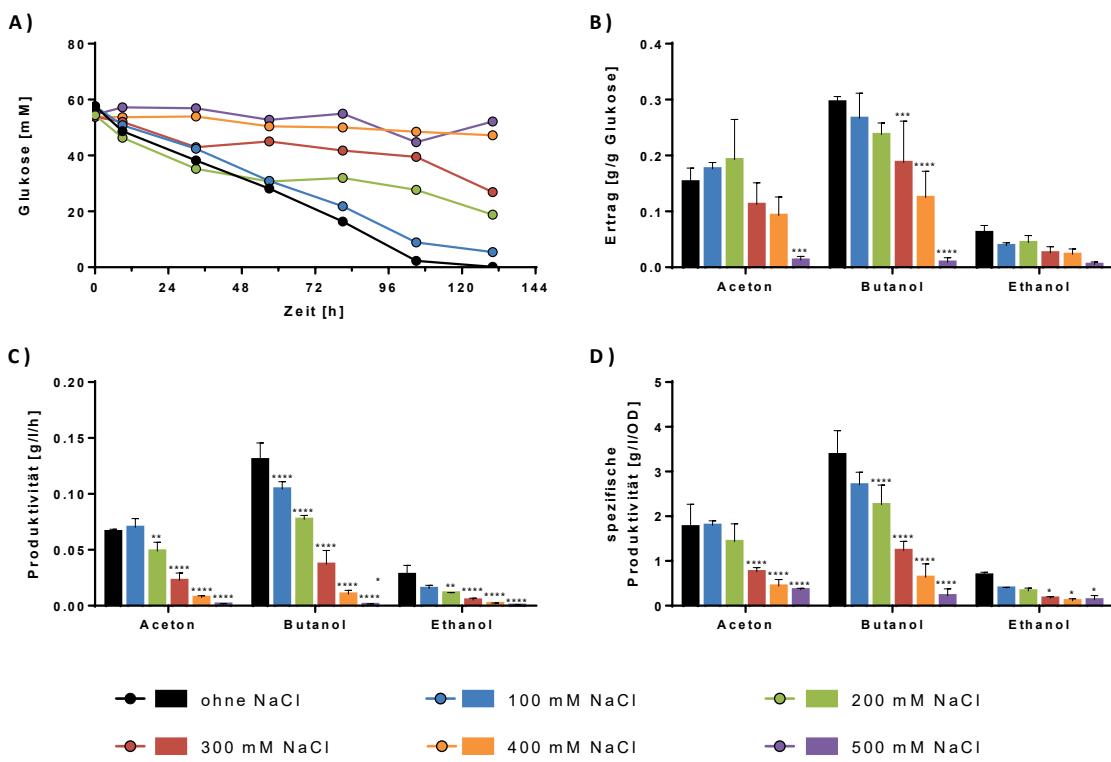


Abbildung 4.3 - Einfluss von NaCl auf die Lösungsmittelproduktivitäten von *C. acetobutylicum*.

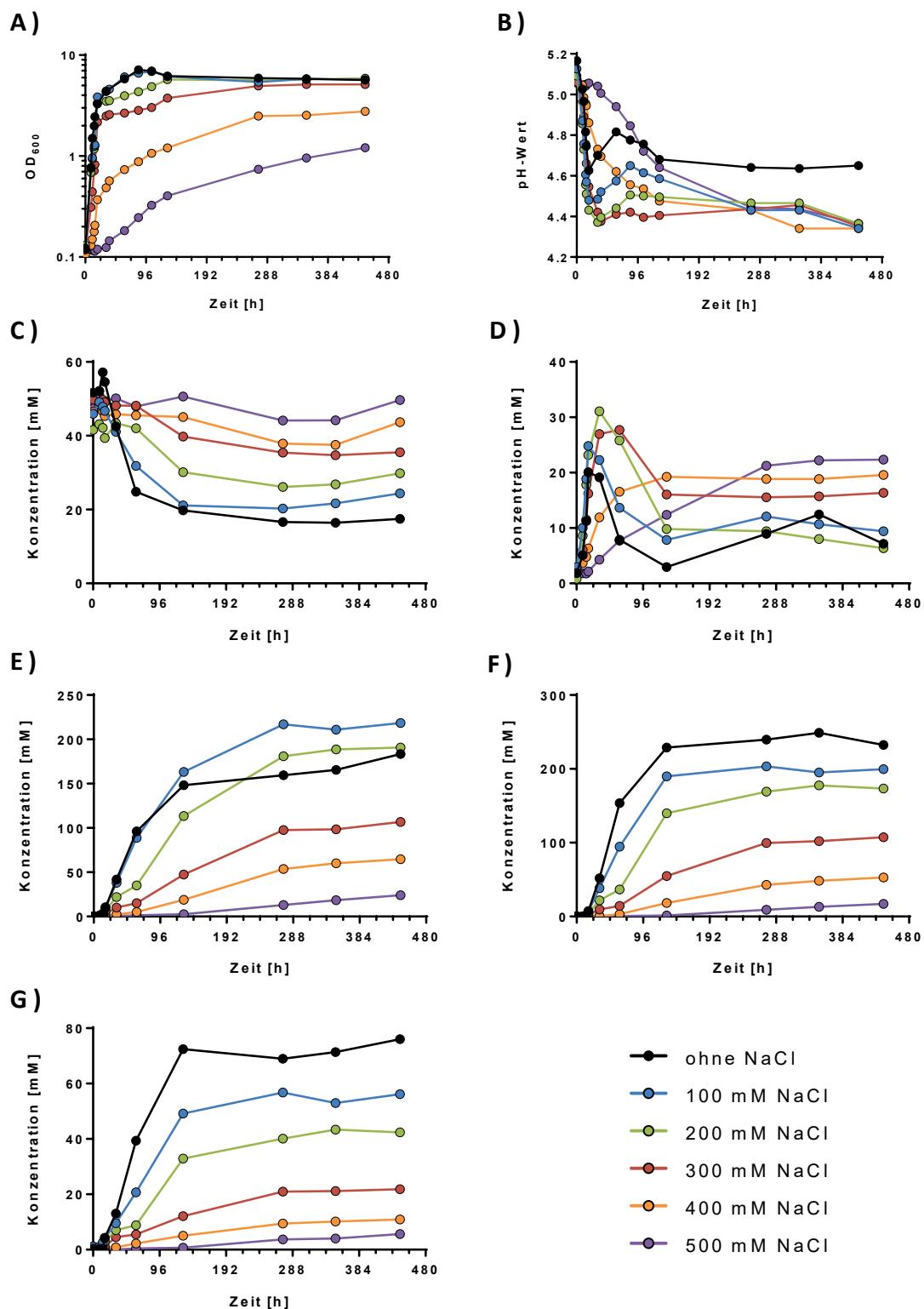
(A) Glukoseverbrauch, (B) Lösungsmittelertrag, (C) Produktivität und (D) spezifische Produktivität beim Wachstum von *C. acetobutylicum* bei verschiedenen Salzkonzentrationen im Vergleich zur salzfreien Konrolle (schwarz). 200 ml MS-MES, 130 h, 37 °C, n = 4, Dunnett's multiple comparison (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,0001; aus Übersichtlichkeitsgründen wurde in A auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Aus Abbildung 4.3, A) geht deutlich hervor, dass die Glukoseaufnahme der Zellen mit zunehmender Salzkonzentration sukzessiv abnimmt. Während in salzfreiem Medium Glukose von *C. acetobutylicum* mit einer Rate von 0,443 g/l/h aufgenommen wurde, sank diese bereits bei einer geringen NaCl-Konzentration von 100 mM auf 0,401 g/l/h ab, bis sie bei 500 mM NaCl nur noch 0,096 g/l/h betrug. Dementsprechend wurden bei 400 mM und 500 mM NaCl im Medium während 130 h Wachstum auch nur etwa 20 % der bereitgestellten Glukose verbraucht. Im Vergleich dazu

waren es bei 300 mM NaCl noch 50 %, während in salzfreiem Medium fast die gesamte Glukose aufgenommen wurde. Anhand des Glukoseverbrauchs sowie der gebildeten Lösungsmittel ließ sich anschließend der Ertrag berechnen (Abbildung 4.3, B). So konnte ohne NaCl im Medium von *C. acetobutylicum* je Gramm Glukose jeweils 0,153 g Aceton, 0,296 g Butanol und 0,062 g Ethanol gebildet werden. Auch im Hinblick auf den Ertrag von Aceton zeigte sich ein positiver Effekt von geringen NaCl-Konzentrationen im Medium. So wurde unter 200 mM Salzstress bis zu 0,192 g Aceton/g Glukose gebildet. Abgesehen von dieser Ausnahme war jedoch auch beim Ertrag zu erkennen, dass dieser mit zunehmender NaCl-Konzentration im Medium abnahm. So wurde z. B. bei 300 mM NaCl nur noch 74 % (0,113 g/g) des ursprünglichen Acetonertrages erreicht. Auch der Butanol- (0,187 g/g) und Ethanolertrag (0,026 g/g) sanken auf ca. 63 % bzw. 41 % ab. Unter 500 mM Salzstress wurden nur noch etwa 8 % des Aceton- und Ethanol- bzw. 3 % des Butanolertrages, im Vergleich zum salzfreien Medium, erreicht.

Der Vergleich der Lösungsmittelproduktivitäten unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen (Abbildung 4.3) zeigt deutlich, dass ab 300 mM NaCl im Medium ein signifikanter Rückgang zu verzeichnen ist. Die Butanol- und Ethanolproduktivitäten weisen ohne NaCl-Zugabe die höchsten Werte auf. Für Butanol wurde dabei eine Produktivität von 0,131 g/l/h bzw. 3,376 g/l/OD und für Ethanol 0,028 g/l/h bzw. 0,687 g/l/OD erreicht. Interessanterweise war bezüglich der Acetonproduktion ein positiver Effekt bei der Zugabe von 100 mM NaCl zu erkennen. Im Vergleich zur salzfreien Kontrolle konnte dort leicht erhöhte Produktivitäten beobachtet werden, jedoch zeigte sich bei weiter ansteigender Salzkonzentration auch dort ein Rückgang. Dieser war bei Butanol und Ethanol ebenfalls zu beobachten, wobei dort kein Anstieg der Produktivitäten bei 100 mM zu verzeichnen war. So konnte z. B. bei der Zugabe von 300 mM NaCl zum Medium nur noch ca. 35 % der ursprünglichen Aceton-, 28 % der Butanol- und 18 % der Ethanolproduktivität erreicht werden. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Wachstumsversuchen erfolgte die Durchführung von Langzeitkultivierungen unter Salzstress, um die langfristigen Effekte von NaCl auf das Wachstum und die Produktbildung zu überprüfen. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 4.4 (Seite 44) dargestellt.

Vergleichend zu den beschriebenen Wachstumsversuchen konnte mittels Langzeitkultivierung besonders bei 400 mM und 500 mM Salzstress die Verzögerung des Wachstums und eine verlängerte lag-Phase verdeutlicht werden. Trotz der hohen Salzkonzentrationen wurden finale optische Dichten von 3 bei 400 mM NaCl und von 1,4 bei 500 mM NaCl erreicht. Der pH-Wert sank bei diesen beiden Salzkonzentrationen über die gesamte Kultivierungszeit ab und lag nach ca. 26 Tagen bei 4,3. Dies war vor allem durch die Bildung von Butyrat bedingt, dessen finale Konzentration bei 500 mM Salzstress mit 23 mM am höchsten war. Die Lösungsmittelproduktion fiel jedoch auch bei längerer Kultivierung sehr gering aus, obwohl die biomassaspezifische Produktivität, vor allem für Aceton und Butanol, bei mehr als 1 g/l/OD lag. Eine weitere Besonderheit zeigte sich wieder bei 100 mM und 200 mM NaCl im Wachstumsmedium. Dort konnten bei der Langzeitkultivierung sogar größere Mengen Aceton produziert werden, als in der salzfreien Kontrolle.



(Fortsetzung nächste Seite)

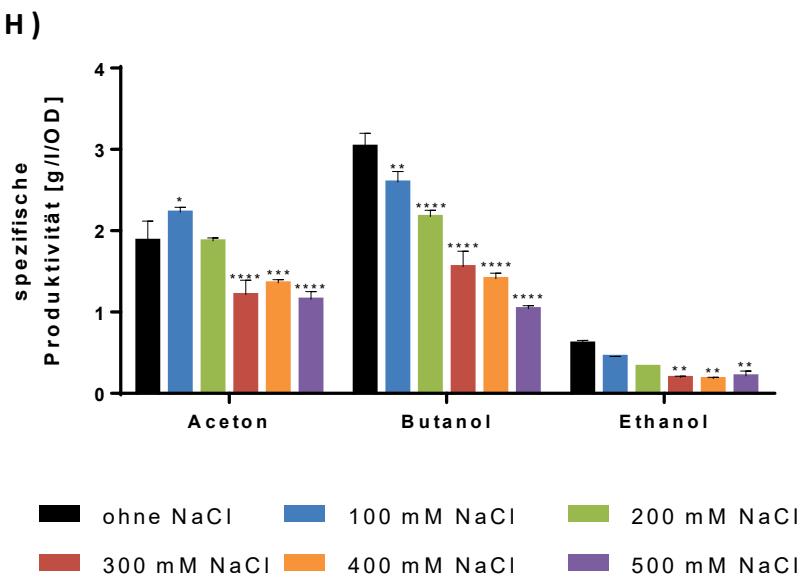


Abbildung 4.4 - Langzeitkultivierung von *C. acetobutylicum* bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

(A) Optische Dichte bei 600 nm, (B) pH-Wert, Konzentration der Fermentationsprodukte (C) Acetat, (D) Butyrat, (E) Aceton, (F) Butanol und (G) Ethanol, sowie (F) spezifische Produktivität nach 440 h Wachstum. 200 ml MS-MES, 440 h, 37 °C, n = 3, Dunnett's multiple comparison (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001; aus Übersichtlichkeitsgründen wurde in A-G auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

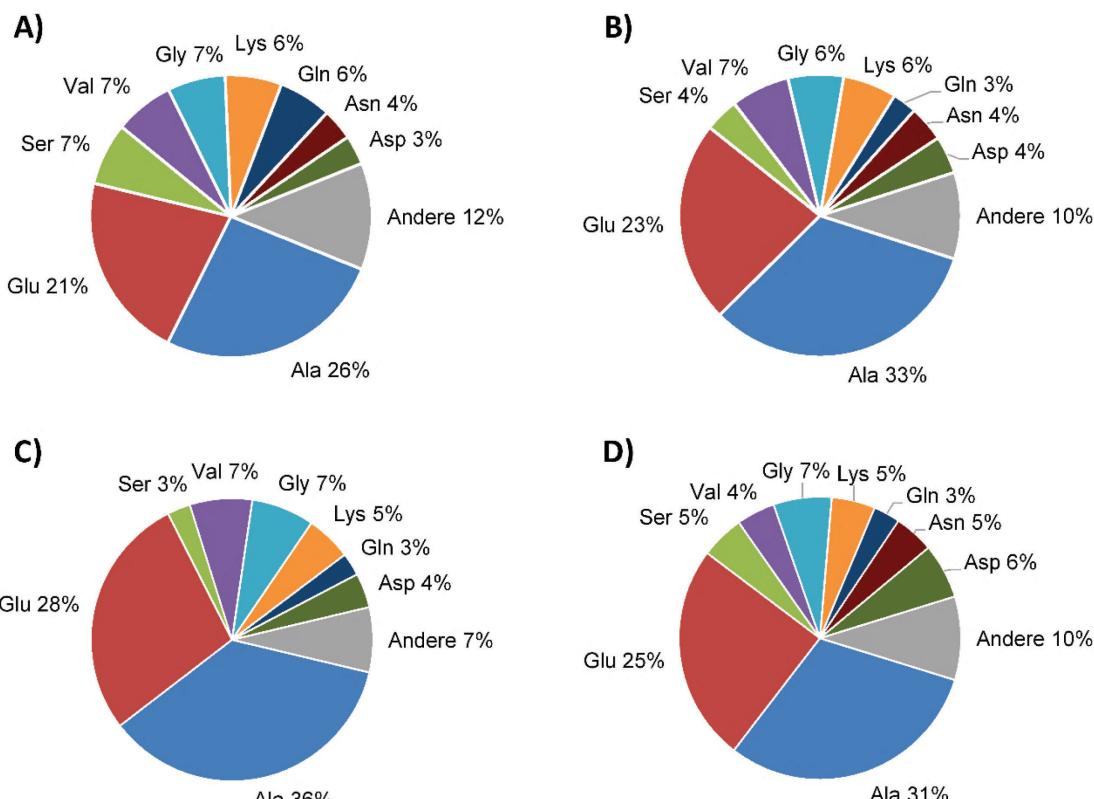
Obwohl z. B. im Hinblick auf die Acetonproduktion geringe Mengen NaCl im Medium den Ertrag und die Produktivität erhöhen konnten, war grundsätzlich eine inhibierende Wirkung von Salzstress auf das Wachstum und die Produktbildung von *C. acetobutylicum* zu erkennen. Diese trat ab einer Konzentration von 300 mM NaCl im Medium deutlich hervor. Ab 400 mM NaCl konnte eine sehr starke Hemmung von Wachstumsgeschwindigkeit und ABE-Produktivität dokumentiert werden. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 300 mM NaCl zum Wachstumsmedium im Durchschnitt nur zu einer Halbierung der Wachstumsrate und des Glukoseverbrauches, sowie der Lösungsmittelbildung. Dementsprechend wurde in ausgewählten Folgeexperimenten der Fokus auf 300 mM NaCl-Stress gelegt, um zuverlässige Ergebnisse generieren zu können und den Einblick in die Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* zu vertiefen.

4.2 Einfluss von kompatiblen Soluten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt schützen sich Bakterien vor hohen Salzkonzentrationen, indem sie kompatible Solute akkumulieren und so die Osmolarität des Cytoplasmas dem des Außenmediums anpassen (2.2.1). Dementsprechend galt es herauszufinden, ob *C. acetobutylicum* ebenfalls in der Lage ist, diese Schutzsubstanzen in der Salzstressantwort zu nutzen.

4.2.1 Der intrazelluläre Aminosäurepool von *C. acetobutylicum*

Mittels HPLC-Technik sollten die von *C. acetobutylicum* akkumulierten Aminosäuren detektiert werden. Dafür wurden die Zellen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Medium inkubiert (3.3.2.1) und nach 12-14 h Wachstum bei 37 °C geerntet (3.6.1). Nachdem das Trockengewicht bestimmt war, erfolgte der Aufschluss der Zellen (3.6.2) und die erneute Lyophilisierung des Überstandes. Das Lyophilisat konnte im Anschluss für die HPLC vorbereitet und die Konzentration der intrazellulären Aminosäuren bestimmt werden (3.6.5). In Abbildung 4.5 ist der prozentuale Anteil der von *C. acetobutylicum* akkumulierten Aminosäuren dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass Prolin und GB nicht mittels HPLC bestimmt werden konnten und daher auch nicht einbezogen wurden.



(Fortsetzung nächste Seite)

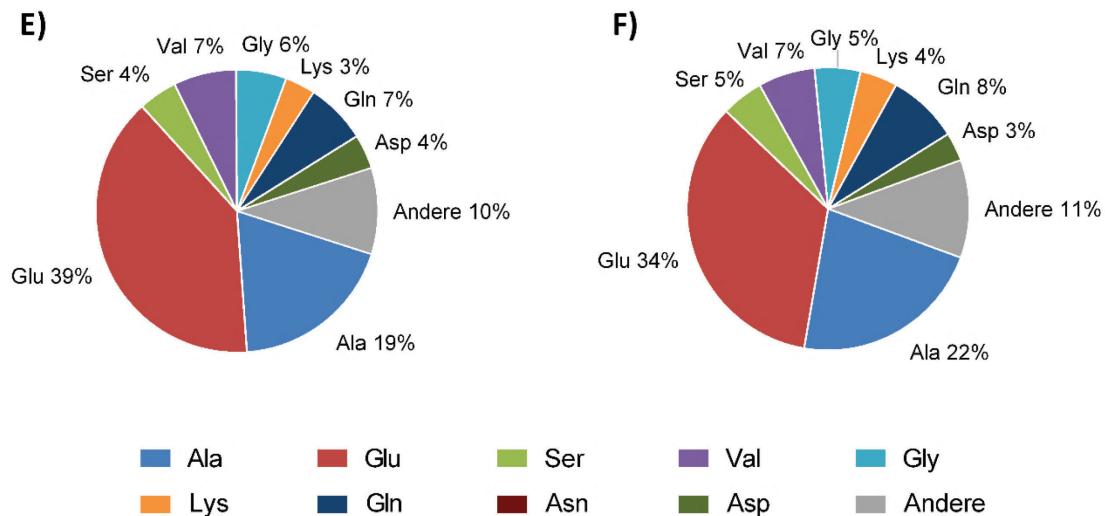


Abbildung 4.5 - Prozentualer Anteil der Aminosäuren am Aminosäure-Pool von *C. acetobutylicum*.

Anteile der mittels HPLC detektierten Aminosäuren bei verschiedenen Salzkonzentrationen ($n \geq 3$). (A) ohne NaCl, (B) 100 mM NaCl, (C) 200 mM NaCl, (D) 300 mM NaCl, (E) 400 mM NaCl, (F) 500 mM NaCl.

In Abbildung 4.5 ist gut zu erkennen, dass unter salzfreiem Wachstum Alanin und Glutamat den Großteil des intrazellulären Aminosäurepools von *C. acetobutylicum* ausmachen. Alle weiteren detektierten Aminosäuren nehmen jeweils nur unter 10 % der Gesamtmenge ein. Serin, Valin und Glycin weisen dabei einen Anteil von je 7 % auf, gefolgt von Lysin und Glutamin mit je 6 %. Bei der Zugabe von NaCl zum Wachstumsmedium zeigt sich im Allgemeinen, dass mit ansteigender Salzkonzentration der Anteil von Glutamat am Aminosäurepool zunimmt. Während bei 100 mM NaCl 23 % Glutamat ausmacht, sind es bei 300 mM bereits 28 % und bei 400 mM bzw. 500 mM Salzstress 39 % bzw. 35 %. Während der Alaninanteil unter leichtem Salzstress zuerst ansteigt und bei 300 mM NaCl im Medium einen Höchstwert von 36 % erreicht, liegen bei 400 mM und 500 mM NaCl nur noch 19 % bzw. 22 % vor. Die Anteile der anderen in Abbildung 4.5 dargestellten Aminosäuren blieben im Großen und Ganzen ähnlich und schwanken zwischen 3-8 %, unabhängig der eingesetzten Salzkonzentration.

Der intrazelluläre Prolin- und GB-Gehalt der Zellen wurde in separaten Experimenten spektrophotometrisch bestimmt (3.6.3, 3.6.4). Um die Funktionalität der Assays zu überprüfen, diente *B. subtilis* als Positivkontrolle (3.3.1). Die zu untersuchenden Zellen wurden in salzfreiem Medium bzw. mit 300 mM NaCl-Zugabe bei 37 °C inkubiert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 geerntet (3.6.1). Es folgte die Bestimmung des Trockengewichtes und der Aufschluss der Zellen in dem für das Assay geeignetem Puffer (3.6.2). Im Anschluss konnten die intrazelluläre Prolinmenge (3.6.3) bzw. der GB-Gehalt (3.6.4) unter Nutzung zuvor erstellter Kalibrierungskurven berechnet werden.

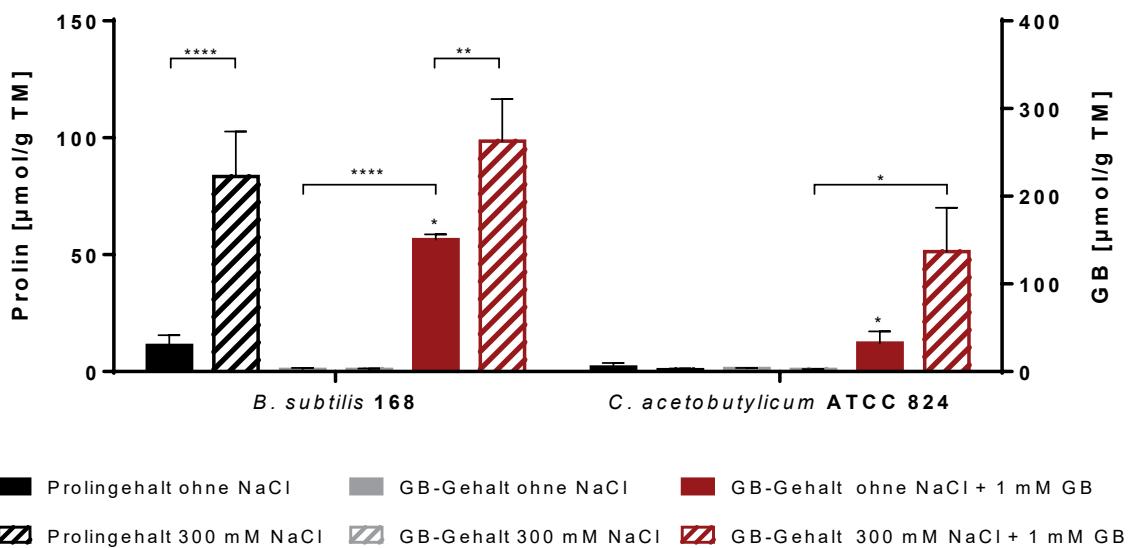


Abbildung 4.6 - Intrazelluläre Prolin- bzw. GB-Konzentration von *B. subtilis* und *C. acetobutylicum*.

Intrazellulärer Prolin- und GB-Gehalt nach Wachstum von *B. subtilis* und *C. acetobutylicum* in Minimalmedium ohne NaCl bzw. mit 300 mM NaCl. Zusätzlich erfolgte die Kultivierung unter Salzstress mit 1 mM GB-Supplementierung. $n \geq 2$, Holm-Sidak's multiple t-test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

In Abbildung 4.6 sind die berechneten intrazellulären Prolin- und GB-Konzentrationen der Zellen ohne Salzstress bzw. mit 300 mM NaCl im Medium dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass *B. subtilis* als Positivkontrolle in der Lage ist, unter Salzstress sehr hohe Mengen an Prolin zu akkumulieren. Der Gehalt von 11,2 µmol/g TM Prolin in salzfreiem Medium stieg um das ca. Achtfache auf etwa 83,4 µM/g an. Im Vergleich dazu zeigt *C. acetobutylicum* in salzfreiem Medium nur eine geringe intrazelluläre Prolinkonzentration von 1,9 µmol/g TM. Unter 300 mM NaCl-Stress sank die Menge an intrazellulärem Prolin sogar auf 0,9 µmol/g TM ab. Bezuglich GB konnte sowohl bei *B. subtilis* als auch bei *C. acetobutylicum* keine Akkumulation nachgewiesen werden. Erst die Zugabe von 1 mM GB zum Wachstumsmedium resultierte in einer messbaren Menge akkumulierten GBs. Bei *B. subtilis* konnten unter Wachstumsbedingungen ohne Salzstress 150,5 µmol/g TM bestimmt werden, wobei in salzhaltigem Medium mit 262,7 µmol/g TM bis zu 75 % GB akkumuliert wurde. *C. acetobutylicum* zeigte mit 32,6 µmol/g TM ebenfalls geringe Menge an GB unter salzfreien Bedienungen, wobei unter Salzstress auch die intrazelluläre GB-Konzentration auf 136,9 µmol/g TM erhöht werden. Zusammenfassend zeigte sich unter Salzstress im Hinblick auf Prolin bei *B. subtilis* eine Steigerung um das Achtfache und bei *C. acetobutylicum* eine Halbierung der Konzentration. Der GB-Gehalt stieg unter Salzstress bei *B. subtilis* um das Zweifache und bei *C. acetobutylicum* um das Vierfache im Vergleich zur salzfreien Probe, jedoch nur, wenn GB als kompatibles Soult extern dem Medium zugesetzt wurde.

4.2.2 Supplementierung von *C. acetobutylicum* mit kompatiblen Soluten

Die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umwelt wird von Mikroorganismen favorisiert, da sie energetisch günstiger als die Neusynthese ist (Hoffmann und Bremer 2017). Daher sollte überprüft werden, ob die externe Zugabe von Osmolyten einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung von *C. acetobutylicum* unter Salzstress hat. Es erfolgten Kultivierungsexperimente mit 300 mM NaCl-Zusatz unter Zugabe ausgewählter kompatibler Solute. Die Auswirkung dieser Supplementation auf Wachstum und Produktbildung sollte einerseits Auskunft über die potentiell von *C. acetobutylicum* genutzten kompatiblen Solute geben. Andererseits zielte die Supplementation dieser Schutzsubstanzen auf eine Erhöhung der Lösungsmittelbildung unter Salzstress ab. Neben Aminosäuren und deren Vorläufermolekülen wurden unter anderem die Zucker Trehalose und Saccharose getestet. Nachfolgend sind zum einen die kompatiblen Solute näher beschrieben, die auf Grund ihrer Rolle als Schutzsubstanz in anderen Organismen zur Supplementation ausgewählt wurden. Zum anderen werden die Supplementationen gezeigt, welche eine positive Wirkung auf die Lösungsmittelbildung aufwiesen. Die weiteren untersuchten kompatiblen Solute sind in Abbildung 7.1 (Anhang) zusammengefasst.

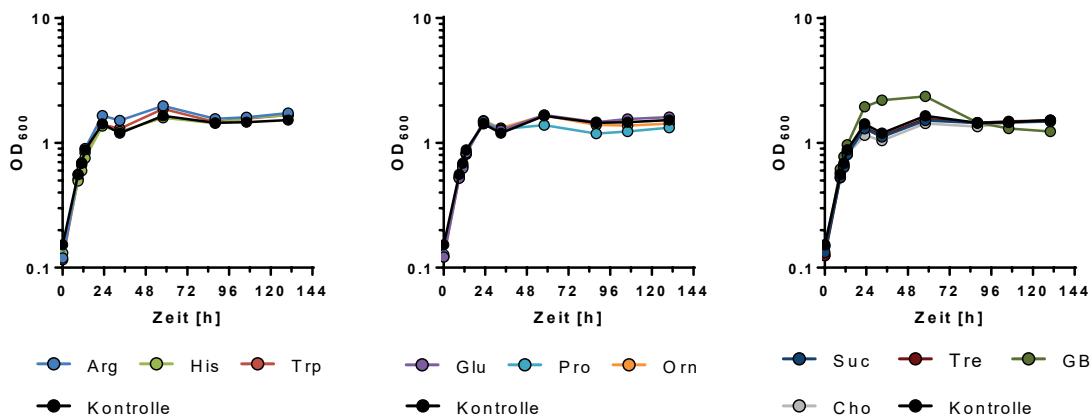


Abbildung 4.7 - Einfluss von Supplementen auf das Wachstum von *C. acetobutylicum* bei 300 mM NaCl.

Optische Dichte bei 600 nm der supplementierten *C. acetobutylicum*-Kulturen im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle. 10 ml MS-MES mit 300 mM NaCl und 1 mM kompatibles Solut, 130 h, 37 °C, n = 4 (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Abbildung 4.7 zeigt ausgewählte Supplementierungsexperimente mit *C. acetobutylicum*. Dafür wurde salzhaltiges Medium (300 mM NaCl) zusätzlich mit 1 mM eines kompatiblen Soluts versetzt. Die Wachstumsverläufe (Abbildung 4.7, A) zeigten im Großen und Ganzen kaum Unterschiede. Einzig die Supplementation mit Glycin Betain (GB) resultierte in einer signifikant erhöhten Wachstumsrate (Abbildung 4.7, B). Die stationäre Phase trat bei allen Kulturen nach etwa 23 h ein, wobei die maximale optische Dichte nach 58 Stunden erreicht war. Dabei wies die Kultur mit Prolin als Zusatz die niedrigste (1,39) maximale optische Dichte auf. Die höchste maximale OD erreichten die Kulturen, welche mit Tryptophan (1,87), Arginin (1,98) oder mit GB (2,36) versetzt

waren. Während der stationären Phase blieb die OD im Durchschnitt konstant. Nur bei der mit GB supplementierten Kultur sank die OD sichtbar ab und lag nach 130 h bei 1,24.

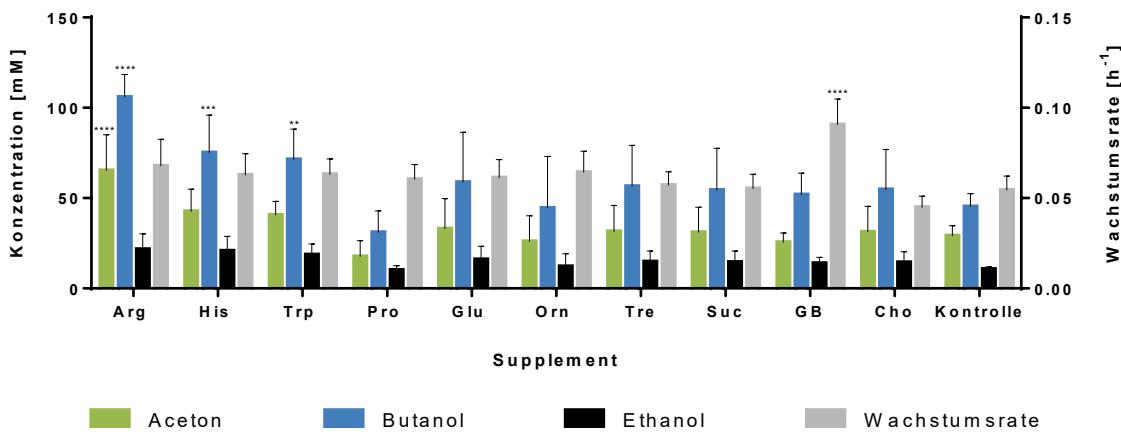


Abbildung 4.8 - Supplementationsexperimente mit *C. acetobutylicum* bei 300 mM NaCl.

Wachstumsraten und finale Lösungsmittelkonzentrationen der supplementierten *C. acetobutylicum*-Kulturen. 50 ml MS-MES, 300 mM NaCl, 1 mM Supplement, 130 h, 37 °C, n = 4, Dunnett's multiple comparison (** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001).

Abbildung 4.8 illustriert die finalen Konzentrationen der Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol, welche von den supplementierten Kulturen gebildet wurden. Allgemein wirkte sich eine Supplementation mit potentiellen kompatiblen Soluten positiv auf die Lösungsmittelbildung aus. Vor allem der Zusatz von der Aminosäure Arginin zeigte den größten Effekt und sorgte für eine signifikant erhöhte Aceton- und Butanolkonzentration. Durchschnittlich verdoppelte sich die Menge der produzierten Lösungsmittel durch die Zugabe von 1 mM Arginin zum salzhaltigen Wachstumsmedium. Auch die Supplementation mit Histidin bzw. Tryptophan resultierte in einer Steigerung der Lösungsmittelproduktion, die jedoch nicht so stark ausfiel, wie bei Arginin. Auch die Produktivitäten konnten durch Supplementation mit kompatiblen Soluten gesteigert werden, wobei erneut der Zusatz von Arginin zur größten Zunahme führte (Abbildung 7.1 C, Anhang). In Abbildung 4.9 A) ist der Einfluss von GB auf das Wachstum von *C. acetobutylicum* noch einmal detailliert dargestellt.

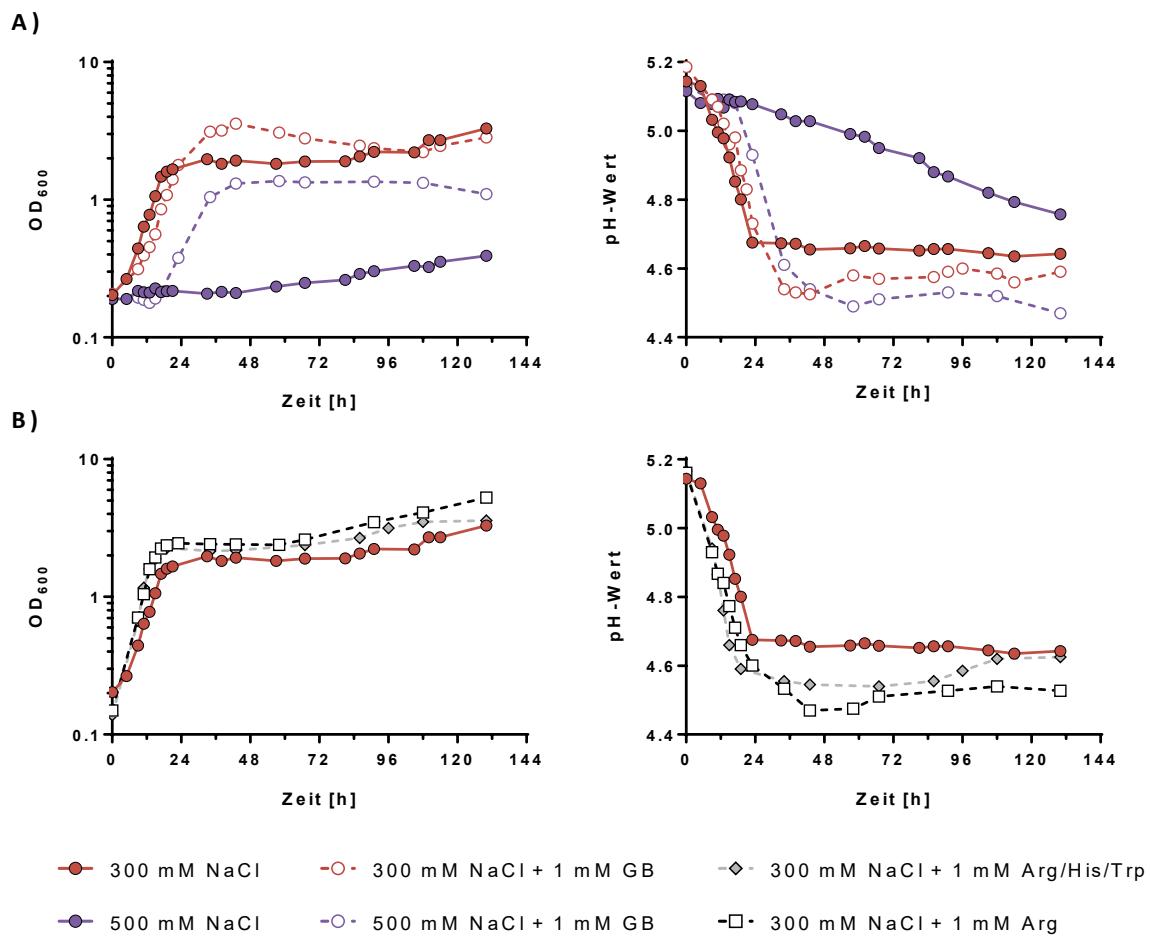


Abbildung 4.9 - Einfluss von GB und Arginin auf das Wachstum von *C. acetobutylicum* unter Salzstress.

(A) Optische Dichte bei 600 nm und pH-Wert während des Wachstums unter 1 mM GB-Supplementation bei 300 mM bzw. 500 mM NaCl im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle. (B) Optische Dichte bei 600 nm und pH-Wert während des Wachstums bei 300 mM NaCl und Supplementation mit 1 mM Arg- bzw. Arg/His/Trp- (je 1 mM) im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle. 200 ml MS-MES, 130 h, 37 °C, $n \geq 2$ (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Im Vergleich zu den Versuchen aus Abbildung 4.7 schien die Supplementierung mit GB bei 300 mM NaCl im Wachstumsmedium die lag-Phase leicht zu verlängern. Nach der exponentiellen Wachstumsphase, mit einer Wachstumsrate von $0,145 \text{ h}^{-1}$ und einer Verdopplungszeit von 4,79 h, konnte die supplementierte Kultur eine maximale OD von 3,56 erreichen. Vergleichend dazu zeigt die Kontrolle ohne GB-Zusatz nach der gleichen Zeit eine OD von nur 1,98 und erreichte die maximale OD von 3,02 erst zum Ende des Wachstumsversuches. Während der stationären Phase war auch bei der supplementierten Kultur zuerst ein Absinken der OD zu beobachten, zum Ende des Versuches stieg diese jedoch wieder auf an und erreichte damit die gleiche finale OD wie die Kontrolle. Überraschenderweise war GB in der Lage, das Wachstum von *C. acetobutylicum* unter 500 mM stark zu verbessern. Im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle wies diese Kultur mit $0,099 \text{ h}^{-1}$ eine achtfach erhöhte Wachstumsrate auf. Nach 58 Stunden war die maximale OD von 1,37 erreicht, welche dann auch bis zum Ende des Wachstumsversuches konstant blieb. Im Vergleich dazu zeigte die Kontrolle nach 58 h eine deutlich geringere OD von 0,38, die während

des weiteren Wachstum lediglich auf 1,1 anstieg. Auch der pH-Wert entsprach unter dem Zusatz von GB eher dem typischen Verlauf ohne Salzstress (vergl. Abbildung 4.1). Während der exponentiellen Wachstumsphase fiel der pH-Wert von etwa 5,2 bei 300 mM Salzstress und GB auf 4,5 ab und stieg dann im Verlauf der stationären Phase leicht an, auf einen finalen Wert von 4,6. Bei 500 mM Salzstress und GB-Zusatz zeigte sich ein ähnlicher pH-Wert-Verlauf. Der minimale Wert von 4,5 wurde hier allerdings etwas später erreicht, wobei der finale Wert mit knapp 4,5 unter dem der unsupplementierten Kontrolle lag.

Die Auswirkungen einer Arginin-Supplementation auf das Wachstum unter 300 mM Salzstress sind in Abbildung 4.9 B) dargestellt. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Kombination der förderlichen Aminosäuren Arginin, Histidin und Tryptophan (vergl. Abbildung 4.8) die positiven Effekte der Supplementation noch steigern könnte. Der Wachstumsverlauf der supplementierten Kulturen ähnelte der Kontrolle ohne Zusatz. Jedoch konnte mit Supplementation eine etwa 20 % schnellere Wachstumsrate und Verdopplungszeit erreicht werden. Dies war bei der Aminosäurekombination, sowie beim alleinigen Zusatz von Arginin der Fall. Nach ca. 17 h gingen die supplementierten Kulturen in die stationäre Phase über, woraufhin die OD bis etwa 58 h konstant blieb. Danach stieg sie weiter an und erreichte am Ende des Wachstumsversuches einen finalen Wert von 5,26 bei Arginin-Zusatz, sowie 3,59 bei der Zugabe der Aminosäurekombination. Im Vergleich dazu erreichte die unsupplementierte Kontrolle nur eine finale OD von 3,29. Der pH-Wertes sank bei den supplementierten Kulturen während der exponentiellen Phase schnellerer und auch auf ein niedrigeres Niveau ab im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle. Während die Aminosäurekombination zu einem minimalen pH-Wert von ca. 4,55 führte, erreichte die Kultur mit Arginin-Zusatz einen Wert von 4,49. Damit wiesen beide supplementierten Kulturen einen niedrigeren pH-Wert als die Kontrolle ohne Zusatz auf. Zum Ende der stationären Phase stieg der pH-Wert wieder leicht an. So zeigte die Kultur mit Arginin den niedrigsten finalen Wert von 4,54, während die Kultur mit der Aminosäurekombination mit 4,64 den gleichen Endwert wie die Kontrolle erreichte.

Der Einfluss von GB und Arginin auf die Bildung der Fermentationsprodukte ist in Abbildung 4.10 (Seite 52) dargestellt. Bei der Betrachtung der Fermentationsprodukte (Abbildung 4.10, A) wurde vor allem deutlich, dass bei einer Supplementierung mit GB bei 300 mM NaCl-Zusatz die Lösungsmittelbildung schon nach 9 h, also wesentlich früher als ohne Supplement, einsetzte. Die finale Butanolkonzentration lag dabei allerdings bei der supplementierten Kultur mit 76 mM nur unwesentlich höher als bei der Kontrolle. Im Gegensatz dazu waren die finale Ethanolproduktion doppelt so hoch und die Acetonkonzentration etwas niedriger als bei der unsupplementierten Kontrolle. Auch bei 500 mM NaCl im Wachstumsmedium konnte die Zugabe von 1 mM GB die Lösungsmittelbildung positiv beeinflussen (Abbildung 4.10, B). Während ohne kompatibles Solut bei 500 mM Salzstress kaum Lösungsmittel detektiert werden konnten, lag bei der supplementierten Kultur eine finale Konzentration von ca. 10 mM Aceton und 14 mM Ethanol, sowie 26 mM Butanol vor.

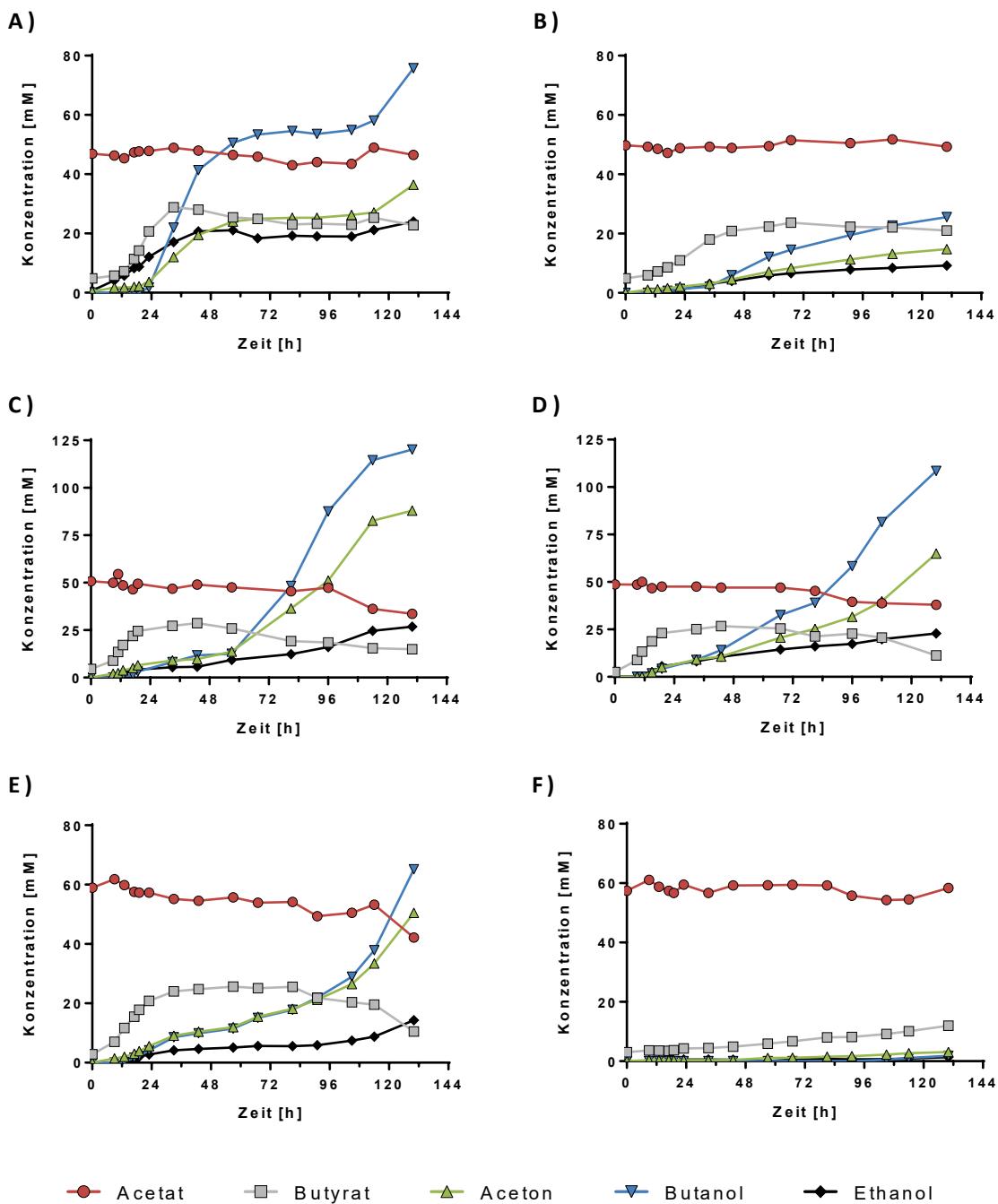


Abbildung 4.10 - Einfluss von GB und Arginin auf die Produktbildung von *C. acetobutylicum* unter Salzstress.

(A) 300 mM bzw. (B) 500 mM NaCl mit 1 mM GB-Supplementation. (C) 1 mM Arginin-, bzw. (D) Arginin/Histidin/Tryptophan-Supplementarion (je 1 mM) bei 300 mM NaCl-Stress. Als Kontrolle dienten unsupplementierte Kulturen unter (A) 300 mM NaCl- bzw. (B) 500 mM NaCl-Stress. 200 ml MS-MES, 130 h, 37 °C, $n \geq 2$ (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Der Zusatz der Aminosäure Arginin zu 300 mM salzhaltigem Medium (Abbildung 4.10, C) zeigte den größten Effekt. Es konnten nach 130 h Wachstum etwa 50 % mehr Lösungsmittel detektiert werden als bei der unsupplementierten Kontrolle. Dabei wurden etwa 88 mM Aceton, 120 mM Butanol und 27 mM Ethanol gebildet. Die Supplementation mit Arginin, Histidin und Tryptophan

zusammen Abbildung 4.10, D) konnte zwar auch eine Steigerung der Lösungsmittelbildung herbeiführen, jedoch fiel diese nicht so stark aus wie bei der alleinigen Zugabe von Arginin. Hier konnten Werte von 65 mM Aceton, 109 mM Butanol und 23 mM Ethanol erreicht werden. Allgemein resultierte die Zugabe der Aminosäuren nicht nur in einer Erhöhung, sondern auch in einer früher einsetzenden Lösungsmittelbildung.

GB kann von einigen Bakterien auch als alleinige Kohlenstoffquelle genutzt werden (Oren 1990). Dementsprechend wurde überprüft, ob *C. acetobutylicum* dazu ebenfalls in der Lage ist. Dafür erfolgte ein Standard-Wachstumsversuch, bei dem Glukose durch 270 mM GB ersetzt wurde (Abbildung 4.11).

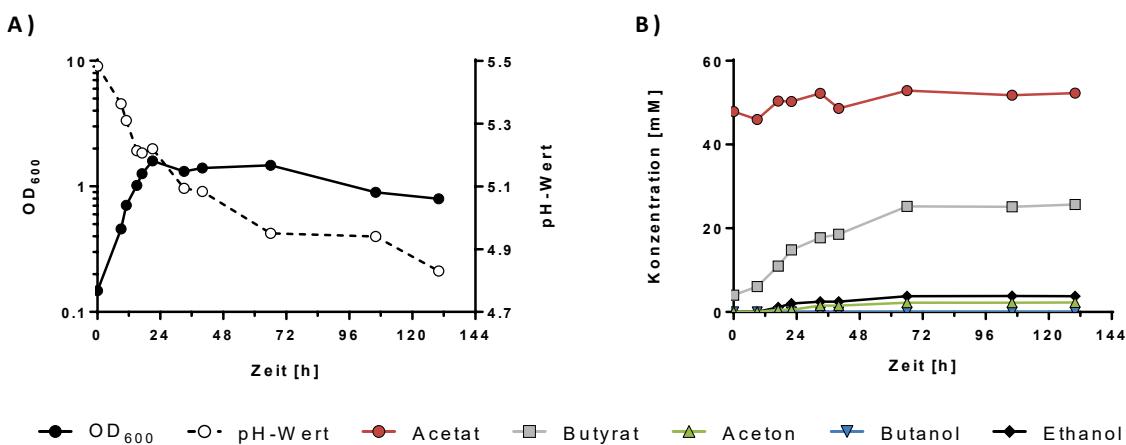


Abbildung 4.11 - Wachstum von *C. acetobutylicum* in MS-MES ohne Glukose mit GB.

(A) optische Dichte bei 600 nm und pH-Wert, sowie (B) Fermentationsprodukte. 200 ml MS-MES, 130 h, 37 °C, ohne Glukose, mit 270 mM GB, n = 3 (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Die Ergebnisse aus Abbildung 4.11 lassen darauf schließen, dass auch *C. acetobutylicum* mit GB statt Glukose wachsen kann. Dabei wurde nach 21 h bei einer Wachstumsrate von 0,127 h⁻¹ und einer Verdopplungszeit von 5,5 h eine maximale OD von 1,6 erreicht. Der pH-Wert nahm während des Wachstums auf GB über den gesamten Verlauf ab und erreichte einen Endwert von 4,8. Allerdings zeigte sich bei der Betrachtung der Produktanalyse, dass unter diesen Bedingungen kaum Lösungsmittel detektiert werden konnten. Einzig Butyrat wurde kontinuierlich während des Wachstums produziert und erreichte nach 130 h eine Konzentration von 26 mM.

4.3 Die *argR*-Mutanten von *C. acetobutylicum*

Während der Supplementationsversuche konnte ein positiver Einfluss von Arginin auf die Lösungsmittelbildung von *C. acetobutylicum* unter Salzstress dokumentiert werden (Abbildung 4.8). Die ebenfalls durchgeführten HPLC-Analysen (Abbildung 4.5) zeigten jedoch, dass unter Salzstress keine Zunahme der intrazellulären Argininkonzentration zu verzeichnen war. Um die Rolle von Arginin bei der Salzstressantwort detaillierter zu untersuchen, wurden nachfolgend *in silico*-Analysen zur Arginin-Biosynthese von *C. acetobutylicum* durchgeführt. Es zeigte sich,

dass sowohl für die Biosynthese, als auch für den Katabolismus und den Transport von Arginin ein bestimmter Repressor wahrscheinlich als Hauptregulator fungiert. Dabei handelt es sich um den Arginin-Repressor ArgR, kodiert von dem Gen *cac2074*. Mittels der RegPrecise-Datenbank (<https://regprecise.lbl.gov/>, Novichkov *et al.* 2013) konnten 16 Gene identifiziert werden, welche ein konserviertes ArgR-Bindemotiv in ihrer Promotorregion aufweisen und demzufolge von ArgR reprimiert werden könnten (Tabelle 1). Die Gene kodieren, wie bereits erwähnt, für die Arginin-Biosyntheseenzyme, sowie für zwei ABC-Transporter und Enzyme der Pyrimidin-Biosynthese.

Tabelle 1 - ArgR-Box Konsensussequenz und Gene des ArgR-Regulons (<http://regprecise.lbl.gov>)

ArgR-Box Konsensussequenz			
Organisation*	Gen	Protein	Annotation
●●▶▶▶	<i>cac0376</i>	Cac0376	N-Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
	<i>cac0377</i>	ArtQ2	Arginin-ABC-Transporter, Permease
	<i>cac0378</i>	ArtM2	Arginin-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein
●●●▶▶	<i>cac0380</i>	Cac0380	Periplasmatisches Aminosäure-Bindepotein
●▶▶	<i>cac3020</i>	ArgJ2	Ornithin-Acetyltransferase/N-Acetylglutamat-Synthase
●●▶▶▶▶	<i>cac3620</i>	Cac3620	Aminosäure-ABC-Transporter, substratbindendes Protein
	<i>cac3619</i>	ArtQ2	Aminosäure-ABC-Transporter, Permease
	<i>cac3618</i>	ArtM2	Aminosäure-ABC-Transporter, ATPase
●▶▶	<i>cac0316</i>	ArgF/I	Ornithin-Carbamoyltransferase
●●●▶▶▶	<i>cac2390</i>	ArgC	N-Acetyl-gamma-glutamyl-phosphat-Reduktase
	<i>cac2391</i>	ArgJ1	Ornithin-Acetyltransferase/N-Acetylglutamat-Synthase
●●●▶▶▶	<i>cac0973</i>	ArgG	Argininosuccinat-Synthase
	<i>cac0974</i>	ArgH	Argininosuccinat-Lyase
●●●▶▶▶	<i>cac2389</i>	ArgB	Acetylglutamat-Kinase
	<i>cac2388</i>	ArgD	Acetylornithin-Aminotransferase
●●▶▶▶	<i>cac2645</i>	CarA	Kleine Untereinheit der Carbamoylphosphat-Synthase
	<i>cac2644</i>	CarB	Große Untereinheit der Carbamoylphosphat-Synthase

*● = ArgR-Box, ▶ = Gen

Da die Supplementation mit Arginin in einer gesteigerten Lösungsmittelbildung unter Salzstress resultierte (Abbildung 4.8), war es daher das Ziel, *C. acetobutylicum* mittels *metabolic engineering* hin zu einer Überproduktion von Arginin zu modifizieren. Die naheliegenste Strategie zielte dabei auf die Inaktivierung des Repressors ArgR mittels Clostron® Insertionsmutagenese. Zum einen sollte der Wegfall des Repressor für eine verstärkte Expression der Arginin-Biosynthesegene sorgen. Zum anderen sollte auch eine Erhöhung des Carbamoylphosphat-Pools, durch die vermehrte Expression des *carAB*-Operons, zur Arginin-Überproduktion beitragen. Um ein umfassendes Bild zur Rolle von ArgR und der Arginin-Biosynthese bei der Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* zu erhalten, wurde zusätzlich auch eine plasmidbasierte Überexpression des Arginin-Repressors

mittels eines pT-Vektorsystems realisiert. Die Auswirkungen des *metabolic engineering* sollten im Anschluss untersucht und die generierten Mutanten phänotypisch charakterisiert werden. Dies umfasste zunächst die Beschreibung des Wachstums und der Produktbildung in Batch-Kulturen (3.5). Anschließend sollten mittels RNA-Seq-Analysen die Auswirkungen der Inaktivierung des Arginin-Repressors auf Transkriptomebene vergleichend zum Wildtyp untersucht werden (3.7.4). Dabei lag der Fokus vor allem auf den Veränderungen des Transkriptoms unter Salzstresseinfluss.

4.3.1 Erzeugung und Verifizierung einer *argR*-Insertionmutante in *C. acetobutylicum*

Einen Ansatz der funktionellen Untersuchung spezifischer Gene bietet ihre gezielte Mutagenese. Heap *et al.* (2007) konnten ein System entwickeln, welches die Konstruktion stabiler Mutanten in *Clostridium*-Spezies mit Hilfe eines mobilen Gruppe-II-Introns ermöglichte. Dieses Clostron® genannte System wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um mittels einer Insertionsmutagenese in das Gen *cac2074* den Arginin-Repressor ArgR zu inaktivieren. Die Zielspezifität des Introns liegt dabei in der Basenpaarung zwischen Intron-RNA und Ziel-DNA begründet und kann durch Veränderungen der Erkennungssequenzen an beliebige Zielgene angepasst werden (3.8.4). Für das Gen *cac2074* wurde die in Tabelle 2 gezeigte Insertionsstelle gewählt, da zum einen ein hoher *Score* auf eine effizientere Insertion hinweist (Perutka *et al.* 2004). Zum anderen, da die Insertionsstelle des Gruppe-II-Intron nah am 5'-Ende des Gens liegt und so der verbleibende, native Genbereich vor der Insertionsstelle minimiert wurde. Das vollständige Ergebnis des Intron-Designs (<http://clostron.com/clostron2.php>, Heap *et al.* 2010) mit den möglichen Insertionsstellen des Gens *argR*-Gens ist in Abbildung 7.11 (Anhang) dargestellt.

Tabelle 2 - Ergebnis der Identifizierung des Intron-Zielortes

Gen	Gengröße (Bp)	Insertionsstelle	Insertionsrichtung	Score
<i>cac2074</i>	453	92/93	<i>antisense</i>	7,341

Anhand der gewählten Insertionsstelle wurden dann vom Computeralgorithmus die entsprechenden intronspezifischen Primer (IBS, EBS1d, EBS2) abgeleitet (Tabelle 4, Anhang). Dabei enthielt der IBS1-Primer eine *Hind*III- und der EBS1d-Primer eine *Bsr*GI-Restriktionsschnittstelle, um die spätere Klonierung des angepassten Introns in den Vektor pMTL007C-E2 (Abbildung 7.7, Anhang) zu ermöglichen. Zunächst musste das Intron mittels SOE-PCR (3.7.5.4) an das Zielgen angepasst werden. Dabei wurde unter Verwendung des Vektors pMTL007 als Matrize ein 350 Bp großes Fragment amplifiziert. Neben den abgeleiteten intronspezifischen Primern kam dabei auch ein universelles Oligonukleotid (EBS-Universal, Tabelle 4, Anhang) zum Einsatz, welches im Gruppe-II-Intron binden sollte. Durch die im Überschuss eingesetzten IBS- und EBS1d-Primer wurde jenes 350-Bp-Fragment am stärksten synthetisiert, welches alle genspezifischen Veränderungen für die

Integration in das Zielgen enthielt. Die Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel (3.7.7.1) und ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

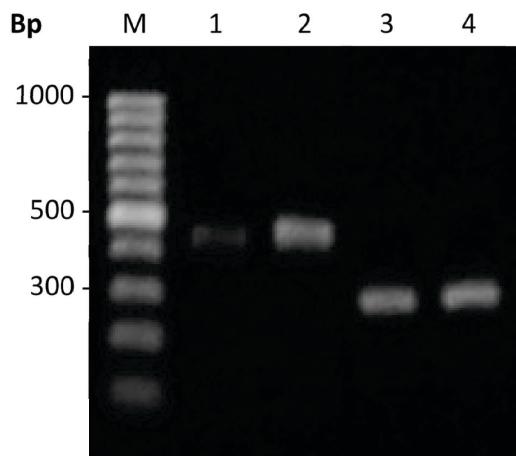


Abbildung 4.12 - PCR-Amplifikate von *cac2074*.

Dargestellt ist ein 1 %iges (w/v) Agarosegel. GeneRuler™ 100 Bp DNA Ladder Plus (Spur M), PCR-Amplifikate von *cac2074* (453 Bp, Spur 1-2), SOE PCR-Ansatz, Fragmente von *cac2074* (350 Bp, Spur 3-4).

Anschließend wurde das angepasste 350-Bp-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt (3.7.7.2) und, ebenso wie der Vektor pMTL007C-E2, einer Hydrolyse mit *Hind*III und *Bsp*1407I unterzogen. Es folgte die Ligation des Fragmentes in den Vektor und die Transformation in *E. coli* DH5 α . Positive Klone konnten mittels Blau-Weiß-Selektion auf LB-Festmedium mit Chloramphenicol und X-Gal identifiziert werden. Die rekombinanten Plasmide wurden isoliert (3.7.2), einer Kontrollrestriktion (*Hind*III, *Bsp*1407I) unterzogen und anschließend in einem 1 %igen Agarosegel (3.7.7.1) aufgetrennt.

In Abbildung 4.13, A ist das Ergebnis der Kontrollrestriktion des rekombinanten pMTL007C-E2-Vektors zu erkennen. Dabei zeigten sich zwei Fragmente im Gel, wobei es sich bei dem größeren Fragment um den linearisierten Vektor mit einer Größe von ca. 8600 Bp handelt. Das kleinere Fragment entspricht dem an das Gen *cac2074* angepasste 350-Bp-Intron. Mit einer nachfolgenden DNA-Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) konnten die Korrektheit der Integration und die Sequenzidentität bestätigt (Abbildung 7.10, Anhang) und anschließend die Konstrukte *in vivo* in *E. coli* ER2275 methyliert (3.7.6.4) werden. Die *in vivo* Methylierung erfolgte dabei über die von pAN-II kodierte Methyltransferase Φ 3TI und wurde nach erneuter Plasmidisolierung (3.7.2) mittels *Fnu*4HI-Restriktion überprüft (Abbildung 4.13 B).

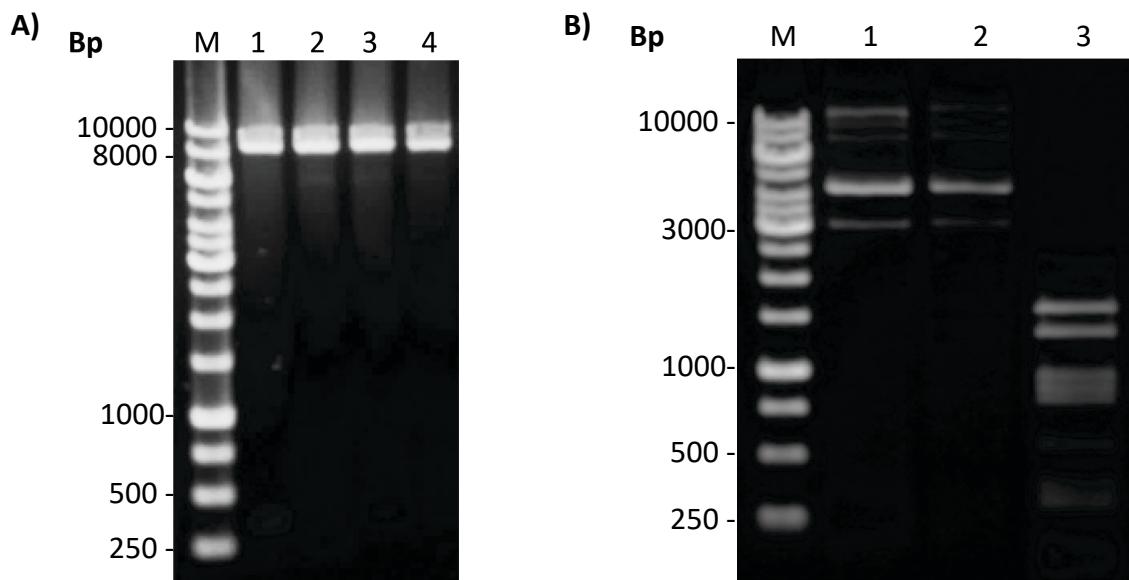


Abbildung 4.13 - Kontrollrestriktion rekombinanter pMTL007C-E2-Plasmide.

Dargestellt sind ein 1 %iges (A) und ein 0,8 %iges (B) Agarosegel. (A) Restriktion mit *Hind*III und *Bsp*1407I, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Spur M), pMTL007C::cac2074_Intron (Spur 1-4). (B) Überprüfung der *in vivo*-Methylierung der Plasmide in *E. coli* ER2275 durch Restriktion von 50 ng Plasmid-DNA mit *Fnu*4HI. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Spur M), pMTL007C::cac2074_Intron pAN-II methyliert (Spur 1-2), pMTL007C::cac2074_Intron unmethyliert (Spur 3).

Bei *Fnu*4HI handelt es sich um ein Isoschizomer von *Cac*824I in *C. acetobutylicum*. Diese Restriktionsendonuklease hydrolysiert nur unmethylierte DNA, nicht aber Φ 3TI-methylierte DNA. Dies ist in Abbildung 4.13 B) illustriert. Als Kontrolle diente das unmethylierte, aus *E. coli* DH5 α isolierte Konstrukt, (Abbildung 4.13 B, Spur 3). In den Spuren 1 und 2 ist kein Verdau zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Methylierung hinweist. Diese Konstrukte konnten für die weitere Elektroporation in *C. acetobutylicum* eingesetzt werden (3.8.3). Die Selektion der Klone auf eine erfolgreiche Transformation erfolgte auf RCA-Festmedium mit Thiamphenicol (3.2.3). Dieses säurestabile Analogon des Chloramphenicols kam bei Arbeiten mit dem säurebildenden *C. acetobutylicum* zum Einsatz, da es von der gleichen plasmidkodierten Resistenzkassette angesprochen wird. Sobald das rekombinante ClosTron®-Plasmid in *C. acetobutylicum* transformiert wurde, sollte das Gruppe-II-Intron konstitutiv exprimiert werden und sich spontan zielgerichtet in das Chromosom einlagern. Dank der RNA-vermittelten Mobilität des Introns und einer speziellen Art von Marker, der sogenannten *erm*RAM-Kassette, entwickelten Klone mit einer erfolgreichen Insertion eine Resistenz gegen das Antibiotikum Erythromycin. So konnte der nächste Selektionsschritt auf RCA mit Erythromycin (3.2.3) erfolgen und die resistenten integranten Kolonien mittels „Colony“-PCR (3.7.5.3) auf das Vorhandensein der gewünschten Insertion untersucht werden. In einer ersten Nachweis-PCR erfolgte der Nachweis der Intron-Insertion unter der Verwendung des genspezifischen *reverse* und des EBS-Universal Primers (Tabelle 6, Anhang , Abbildung 4.15).

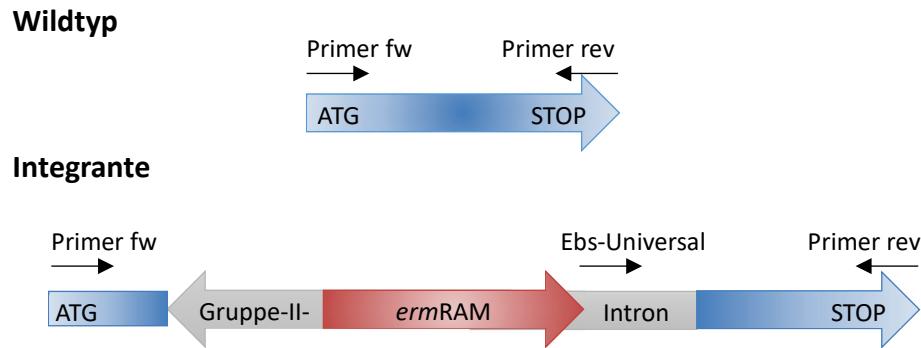


Abbildung 4.14 - Schematische der Integration des Gruppe-II-Introns in das *argR*-Gen.

Der Leserahmen *argR* (blau, 453 bp) ist mit Startpunkt (ATG) und STOP gekennzeichnet. Das Gruppe-II-Intron (grau, 1822 Bp) vermittelt die Erythromycin-Resistenz (rot, 900 Bp).

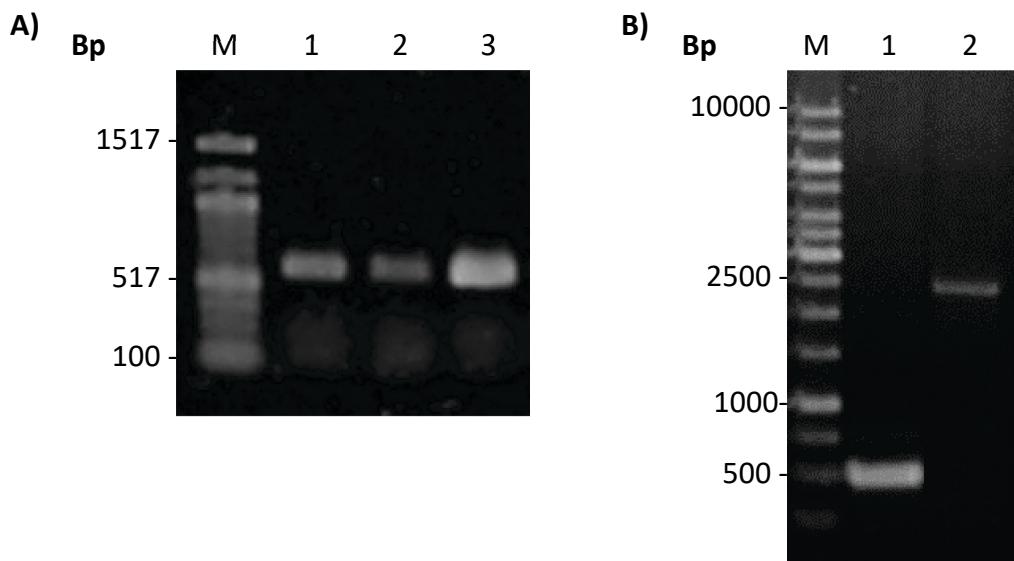


Abbildung 4.15 - Nachweis der Integration des Gruppe-II-Introns in das *argR*-Gen mittels PCR.

Dargestellt sind 0,8 %ige Agarosegele. (B) Nachweis des Intron-Exon-Übergangs für *cac2074*. Quick-Load® Purple100 Bp DNA Ladder (Spur M). (C) Nachweis der gesamten Genregion für *cac2074*. GeneRuler™ 100 Bp DNA Ladder (Spur M), Wildtyp (Spur 1), Integrante (Spur 2).

Die Insertion bei dem *argR*-Gen *cac2074* erfolgte theoretisch 92 Bp nach dem Startcodon des Leserahmens in Antisenserichtung, wobei der gesamte Leserahmen 453 Bp aufwies (Tabelle 2). Durch den *reverse* Primer konnte bis zur Insertionsstelle ein 361 Bp großes Fragment und durch Einsatz des EBS-Universal Primers ein zusätzliches 254-Bp-Fragment amplifiziert werden, sodass ein 615 Bp großes Fragment unter dieser Primerkombination zu erwarten war (Abbildung 4.15, A). Dabei zeigten 24 untersuchte Klone alle ein Fragment auf der erwarteten Höhe. Für die zweite PCR-Überprüfung der spezifischen Insertion wurde die chromosomal DNA der potentiell positiven Klone isoliert (3.7.3). Die isolierte DNA wurde dann für die Amplifikation des gesamten Leserahmens des *argR*-Gens eingesetzt (3.7.5.2). Dabei fanden die genspezifischen *forward* und *reverse* Primer (Tabelle 6, Anhang) Anwendung. Unter dieser Primerkombination sollte, im

Gegensatz zum wildtypischen 453-Bp-Fragment, bei potentiellen Mutanten ein um das Gruppe-II-Intron vergrößertes Fragment amplifiziert werden (Abbildung 4.15, B). Von sechs getesteten Klonen enthielten zwei einen um das Intron vergrößerten Leserahmen des Gens *cac2074*. Das Intron selbst weißt eine Größe von 1822 Bp auf, der Leserahmen des *argR*-Gens nur eine Größe von 453 Bp. Daher war bei der positiven Insertionsmutante ein Fragment von ca. 2275 Bp detektierbar (Abbildung 4.15, B, Spur 2). Um zu verifizieren, dass das Gruppe-II-Intron genspezifisch und auch nur einmal in das Chromosom inserierte, wurde eine positive Insertionsmutante zusätzlich mittels Southern Blot (3.9) verifiziert. Bei vorhergehenden *in silico*-Analysen mit dem annotierten Genom von *C. acetobutylicum* ATCC 824 konnte das Restriktionsenzym *Eco*0190I identifiziert werden, welches je eine Schnittstelle in der Nähe des Zielgens *cac2074*, jedoch nicht im Gen selbst oder im Gruppe-II-Intron aufwies. Anschließend wurden chromosomal DNA vom *C. acetobutylicum* Wildtyp und der *argR*-Mutante spezifisch mit dem Restriktionsenzym *Eco*0190I hydrolysiert. Folglich sollte bei der Entwicklung des Southern Blots (3.9.3) unter Verwendung der Gen-spezifischen Sonde beim Wildtyp ein 6113 Bp großes Fragment und bei der *argR*-Mutante ein 7935 Bp großes Fragment detektiert werden (Abbildung 4.16, A).

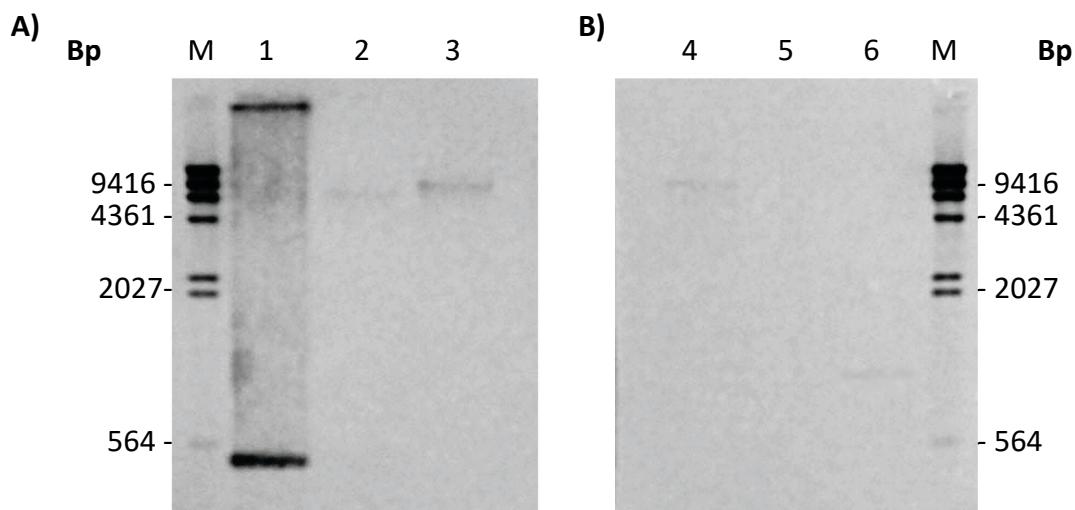


Abbildung 4.16 - Verifikation der *argR*-Insertionsmutante durch Southern Hybridisierung.

Genomische DNA (500 ng) vom *C. acetobutylicum* Wildtyp und der *argR*92a::CT Mutante wurden mit *Eco*0190I hydrolysiert, in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. (A) Nachweis mit Gen-spezifischer Sonde. (B) Nachweis mit *ermRAM*-spezifischer Sonde. DIG DNA Molecular Weight Marker II (Spur M), Positivkontrolle Gen *cac2074* (Spur 1), Wildtyp-DNA (Spur 2+5), *argR*92a::CT-DNA (Spur 3+4), Positivkontrolle *ermRAM* (Spur 6).

Die intronspezifische *ermRAM*-Sonde wurde zur Detektion des Gruppe-II-Introns verwendet. Dementsprechend sollte nur bei der Mutante, nicht aber beim Wildtyp, ein Signal detektiert werden, da nur die Insertionsmutante das Gruppe-II-Intron im Chromosom aufweisen sollte. Dabei war es auch entscheidend nachzuweisen, dass das Gruppe-II-Intron einmalig und nicht mehrfach im Chromosom von *C. acetobutylicum* inseriert vorlag. Als Positivkontrollen für die Sonden wurden die jeweiligen genspezifischen PCR-Fragmente mitgeführt (Abbildung 4.16, B). Basierend auf den

molekularen Analysen zeigte die *argR*-Mutante zweifelsfrei die angestrebte spezifische Integration der *erm*RAM-Kassette in das Gen *cac2074*. Demnach war die ClosTron®-Mutagenese erfolgreich und die generierte Integrante *argR92a::CT* konnte nachfolgend einer wachstumsphysiologischen Charakterisierung unterzogen werden (4.3.3).

4.3.2 ArgR-Überexpression

Zur Überexpression des Arginin-Repressors sollte das entsprechende Gen *cac2074* homolog mittels des pT-Vektorsystems in *C. acetobutylicum* exprimiert werden. Der pThydA-Vektor (Abbildung 7.8, Anhang) wurde als *E. coli* - *C. acetobutylicum* Shuttlevektor für die Überexpression von Proteinen in *C. acetobutylicum* entwickelt (Girbal *et al.* 2005). Dieser Vektor beinhaltet das Gen *hydA* aus *C. acetobutylicum*, welches mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Cfr*9I (*Xma*I) herausgeschnitten (Abbildung 4.17, A) und durch das Gen von Interesse ersetzt werden kann. Die Proteinexpression steht dabei unter der Kontrolle des konstitutiven Thiolase-Promotors (P_{thl}) von *C. acetobutylicum*, welcher eine starke und konstante Expression während des Wachstums garantiert (Tummala *et al.* 1999). In dieser Arbeit der pTc-Vektor genutzt, ein Derivat des pT-Vektors, welcher das Gen für eine Chloramphenicol-Resistenz trägt (Schulz 2013). Mit Hilfe einer PCR (3.7.5.2) konnte das Gen für den Arginin-Repressor (*cac2074*) amplifiziert werden, wobei chromosomal DNA des *C. acetobutylicum* Wildtyps ATCC 824 als Matrize diente (Abbildung 4.12). Das Design der dafür verwendeten Primer erfolgte wie unter 3.7.5.1 beschrieben. Für den *forward*-Primer wurde direkt vor dem Startkodon des Gens eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Zur Erstellung des *reverse*-Primers erfolgte die Einführung einer *Cfr*9I-Restriktionsschnittstelle. In Abbildung 4.12 ist eine erfolgreiche PCR des Gens *cac2074* visualisiert. Das spezifische PCR-Fragment mit einer erwarteten Größe von 453 Bp konnte nachgewiesen werden. Nach der Gelelektrophorese (3.7.7.1) wurde das Fragment aus dem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt (3.7.7.2) und für die Ligation (3.7.6.3) eingesetzt.

Das für die Klonierung erforderliche Plasmid wurde zunächst aus *E. coli* DH5 α durch eine Plasmid-Minipräparation (2.5.1.2) isoliert. Anschließend konnten das Insert (*cac2074*) und der Vektor einem Restriktionsverdau mit *Cfr*9I und *Bam*HI unterzogen werden (2.5.2.1). Der Doppelverdau des pTc-Vektors resultierte dabei in einem 1749 Bp großem *hydA*-Fragment, sowie dem linearisierten Vektor mit einer Größe von 4965 Bp (Abbildung 4.17, A).

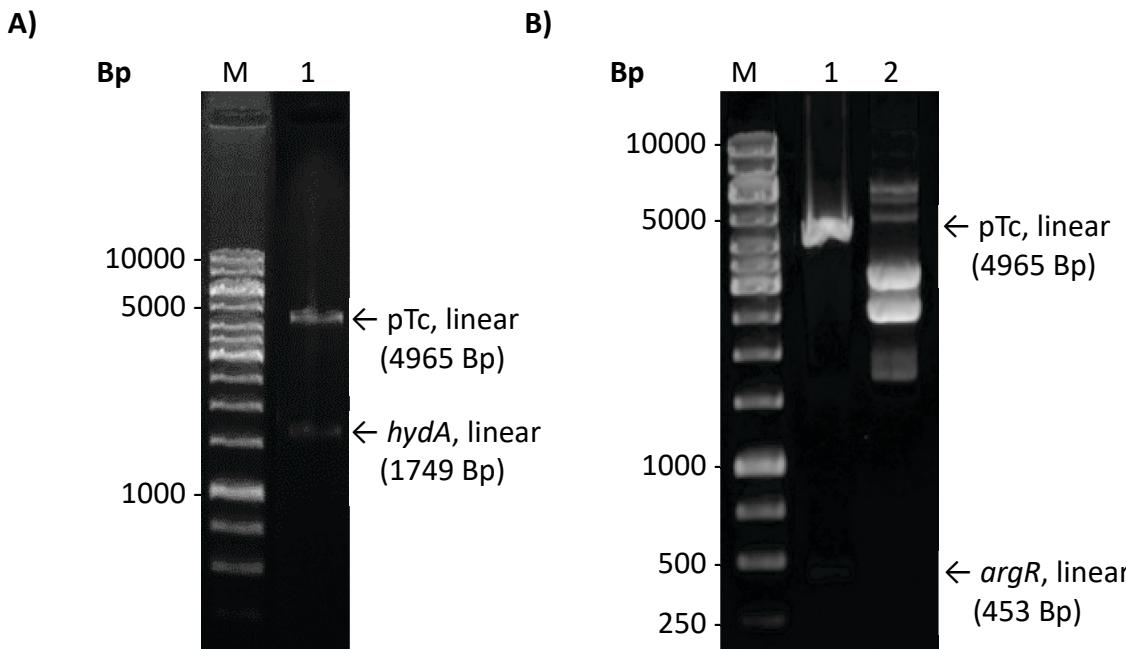


Abbildung 4.17 - Kontrollrestriktion rekombinanter pTc-Plasmide.

Gezeigt sind 0,8 %ige Agarosegele. Die Restriktion erfolgte mit *Bam*HI und *Cfr*9I (*Xma*I). (A) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Spur M), pTc::*hydA* (Spur 1). (B) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Spur M), pTc::*argR* verdaut (Spur 1), pTc::*argR* unverdaut (Spur 3).

Der Vektor wurde außerdem mit einer Phosphatase behandelt (2.5.2.2), um die Selbstligation zu unterbinden. Das restriktierte Insert sowie der dephosphorylierte Vektor wurden nachfolgend aufgereinigt (2.5.3) und für die nachfolgende Ligation (2.5.2.3) eingesetzt. Anschließend fand die Transformation in *E. coli* DH5 α (2.6.3) statt, wobei eine erfolgreiche Transformation in einer plasmidvermittelten Chloramphenicol-Resistenz resultierte. Zur Überprüfung ausgewählter rekombinanter Klone wurden diese nochmals einer Plasmid-Isolation (2.5.1.2) und einer anschließenden Kontrollrestriktion (2.5.2.1) mit den entsprechenden Enzymen unterzogen. Die Auf trennung der Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese (3.7.7.1) zeigte, ob der gewählte Klon ein Plasmid mit dem gewünschten Insert enthielt. Zeigte sich im Gel neben der ca. 5000 Bp großen Bande für den Vektor auch ein ca. 450 Bp großes Fragment des Gens *cac2074* (Abbildung 4.17, B), erfolgte eine anschließende Sequenzierung, um die Korrektheit der Integration zu bestätigen und gleichzeitig mögliche Mutationen auszuschließen. Wenn die erwartete DNA-Sequenz bestätigt werden konnte (Abbildung 7.9, Anhang), wurden die Klone in die Stammsammlung überführt (3.4).

Der generierte Vektor pTc::*argR* musste im Anschluss einer *in vivo*-Methylierung in *E. coli* ER2275 unterzogen werden (3.7.6.4), bevor er für die Transformation in *C. acetobutylicum* (3.8.3) eingesetzt wurde. Die Überprüfung dieser Methylierung erfolgte nach erneuter Plasmidisolierung (3.7.2) mittels *Fnu*4HI- Restriktion (Abbildung 4.18, A).

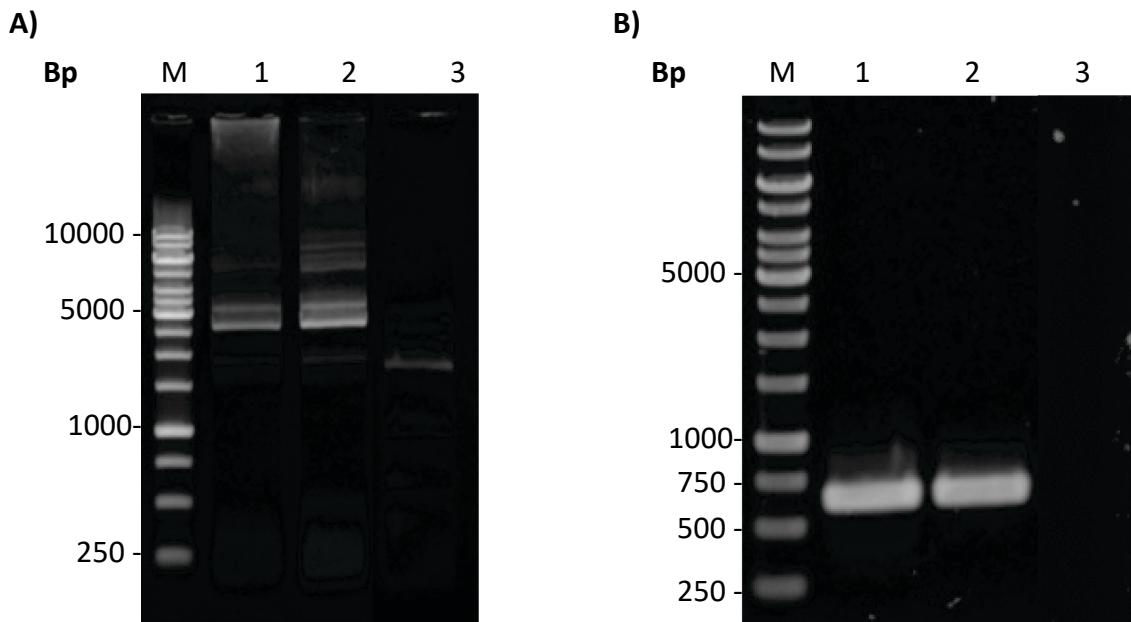


Abbildung 4.18 - Methylierung und Transformation des Plasmids pTc::argR.

Gezeigt sind 0,8 %ige Agarosegele. (A) Überprüfung der *in vivo*-Methylierung der Plasmide in *E. coli* ER2275 durch Hydrolyse von 50 ng Plasmid-DNA mit *Fnu*4HI. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Spur M), pTc::argR und pAN-II methyliert (Spur 1+2), pTc::argR unmethyliert (Spur 3). (B) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Spur M), Colony-PCR von *C. acetobutylicum* pTc::argR mit pT-spezifischen Primern (Spur 1+2), PCR mit *C. acetobutylicum* WT-DNA und pT-spezifischen Primern (Spur 3).

Abbildung 4.18 zeigt, dass die in *E. coli* ER2275 elektroporierten Plasmide erfolgreich methyliert werden konnten, denn nur die Kontrolle (Abbildung 4.18, A, Spur 3) wurde von *Fnu*4HI erkannt und abgebaut. Die erfolgreich methylierten Plasmide wurden für die Transformation in *C. acetobutylicum* eingesetzt (3.8.3). Die Verifizierung rekombinanter Klone (i. d. R. ca. 50 Klone pro 200 µl Elektroporationsansatz) erfolgte im Anschluss mittels Colony-PCR mit pT-spezifischen Primern (Tabelle 6, Anhang). Diese Primer waren in der Lage, den in *C. acetobutylicum* transformierten pTc::argR-Vektor als Matrize zu nutzen und ein 580 Bp-Fragment zu amplifizieren. Nur Klone, die das entsprechende Plasmid aufgenommen hatten, zeigten demnach eine Bande auf der entsprechenden Höhe im Agarosegel (Abbildung 4.18, B). Der rekombinante *C. acetobutylicum* pTc::argR-Stamm (Überexpressionsmutante) konnten anschließend wachstumsphysiologisch charakterisiert (3.5) und im Hinblick auf das Wachstum unter Salzstress analysiert werden.

4.3.3 Wachstumsphysiologische Charakterisierung der argR-Mutanten

Die Insertionsmutante *argR*92a::CT sowie die Überexpressionsmutante pTc::argR konnten erfolgreich generiert und molekular bestätigt werden (4.3.1, 4.3.2). Dem schloss sich eine phänotypische Charakterisierung der Mutanten an. Zunächst wurde das Wachstumsverhalten in Batch-Kulturen mit salzfreiem Minimalmedium beschrieben. Anschließend erfolgte das Wachstum in Minimalmedium mit 300 mM NaCl. Die Wachstumsverläufe vergleichend zum Wildtyp sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

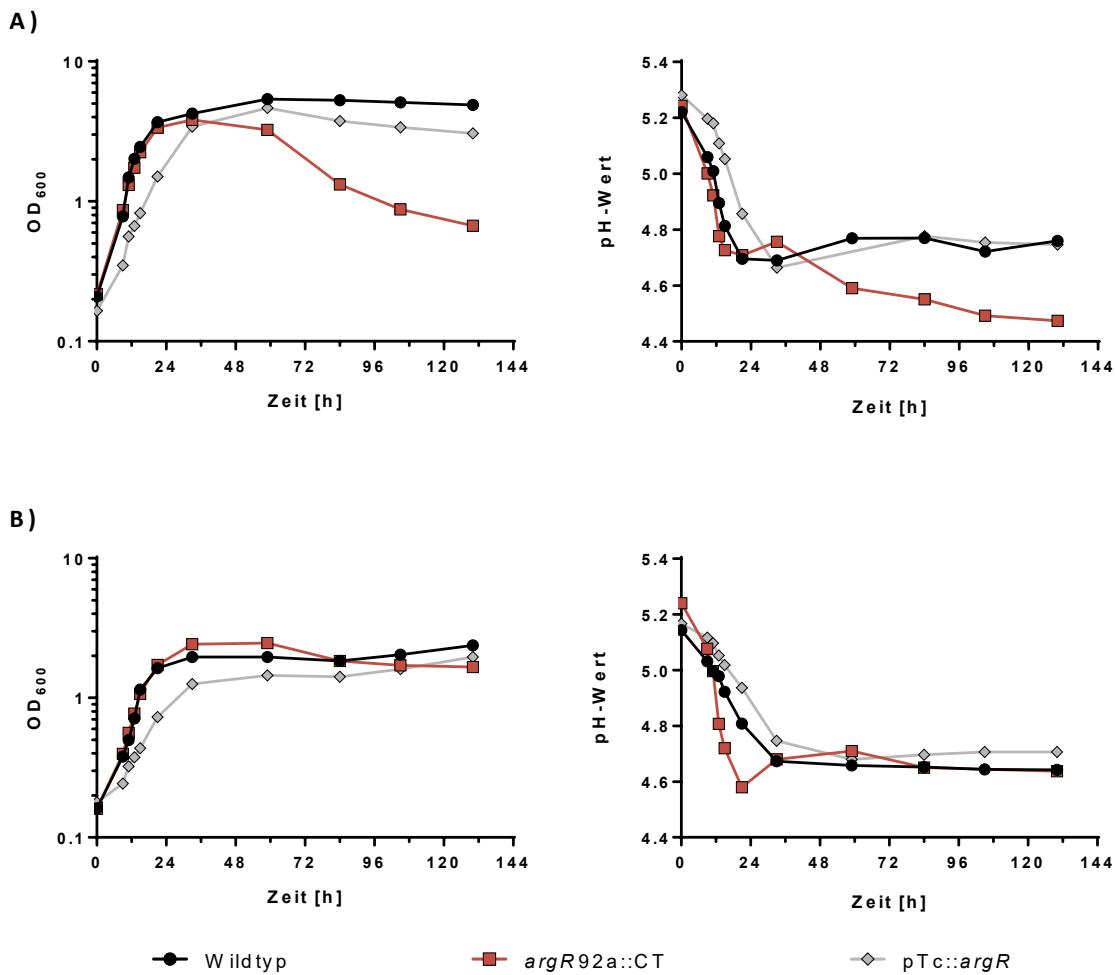


Abbildung 4.19 - Wachstum der *C. acetobutylicum*-Mutanten.

Optische Dichte bei 600 nm und pH-Wert des Wachstums (A) ohne Salz bzw. (B) mit 300 mM NaCl. 200 ml MS-MES, Antibiotikazusatz bei *argR92a::CT* (Ery) und *pTc::argR* (Chl), 130 h, 37 °C, n = 3 (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

In Abbildung 4.19 ist gut zu erkennen, dass sich die Insertionsmutante in der exponentiellen Wachstumsphase wie der Wildtyp verhält. Beide Kulturen zeigten in salzfreiem Medium eine Wachstumsrate von $0,164 \text{ h}^{-1}$ und traten nach ca. 21 h in die stationäre Phase ein. Während die optische Dichte beim Wildtyp nach 21 h 3,7 betrug und in der stationären Phase bis auf 4,9 nach 130 h anstieg, zeigte sich bei der Insertionsmutante ein gänzlich anderes Bild. Die maximale OD wurde nach etwa 24 h mit 3,4 erreicht. In der stationären Phase nahm die OD allerdings stark ab und lag nach 130 h bei einem Wert von 0,7. Die Überexpressionsmutante wies eine verminderte Wachstumsrate von $0,103 \text{ h}^{-1}$ auf und ging erst nach ca. 33 h in die stationäre Phase über. Die finale OD nach 130 h lag mit 3,1 unter der des Wildtyps, aber über der Insertionsmutante.

Auch bei 300 mM NaCl zeigte die Überexpressionsmutante ein vermindertes Wachstum im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen. Die Wachstumsrate während der exponentiellen Phase war sehr gering mit nur $0,057 \text{ h}^{-1}$. Die finale und damit auch maximale OD erreichte hier einen Wert von etwa 2. Im Vergleich dazu zeigten Wildtyp und Insertionsmutante ein schnelleres Wachstum.

Die Insertionsmutante wies dabei jedoch eine etwas höhere Wachstumsrate von $0,179 \text{ h}^{-1}$ vergleichend zum Wildtyp mit $0,147 \text{ h}^{-1}$ auf. Die maximale OD erreichte die Insertionsmutante mit 2,5 nach etwa 24 h. Während der stationären Phase sank die OD wieder ab und erreichte einen finalen Wert von 1,7. Der Wildtyp zeigte bei 300 mM NaCl-Stress am Ende des Wachstumsversuches einen leichten Anstieg der OD, sodass die finale und damit maximale OD nach 130 h bei 2,4 lag. Allgemein zeigte sich ein vermindertes Wachstum der Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildtyp, sowohl mit als auch ohne Salzstress. Die Insertionsmutante hingegen zeigte interessanterweise bei 300 mM NaCl im Medium ein etwas schnelleres Wachstum als in salzfreiem Medium. Auch konnte unter Salzstress kein so starker Rückgang der optischen Dichte beobachtet werden, wie es bei salzfreiem Medium der Fall war.

Hinsichtlich des pH-Wert-Verlaufes zeigte die Überexpressionsmutante Ähnlichkeiten zum Wildtyp. Während der exponentiellen Wachstumsphase sank der pH-Wert in salzfreiem Medium von 5,28 auf 4,66 ab, nahm über die Zeit der stationären Phase wieder zu und erreichte nach 130 h einen Wert von 4,75. Der pH-Wert der Wildtypkultur sank von einem Ausgangswert von 5,24 in der exponentiellen Phase auf 4,7 ab, stieg dann während der stationären Phase leicht an und erreichte am Ende des Wachstumsversuches einen Wert von 4,76. Auch bei der Insertionsmutante zeigte sich in salzfreiem Medium während der exponentiellen Wachstumsphase ein Absinken des pH-Wertes von 5,24 auf zunächst 4,7. Nach einem kurzen Ansteigen des pH-Wertes zu Beginn der stationären Phase sank dieser jedoch anschließend weiter ab und erreichte nach 130 h einen Wert von 4,47. Die Zugabe von 300 mM NaCl zum Wachstumsmedium hatte beim Wildtyp ein etwas stärkeres Absinken des pH-Wertes zur Folge. Von 5,14 sank der Wert während der exponentiellen Wachstumsphase auf 4,68 ab. Über die stationäre Phase blieb der pH-Wert größtenteils auf diesem Niveau und erreichte am Ende des Wachstums einen Wert von 4,64 zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigte die Insertionsmutante ein schnelleres Absinken des pH-Wertes von 5,24 auf 4,58 nach 19 h. Nachfolgend stieg der pH-Wert dieser Kultur wieder an, sodass am Ende des Wachstumsversuches wie beim Wildtyp ein Wert von 4,64 detektiert werden konnte. Bei der Überexpressionsmutante war der pH-Wert auch unter Salzstress stets höher als der des Wildtyps. Ausgehend von 5,17 sank der pH-Wert während des exponentiellen Wachstums auf 4,75 und auch während der stationären Phase war ein weiteres Absinken des pH-Wertes zu verzeichnen, sodass nach 130 h ein Wert von 4,7 erreicht wurde.

Der Verlauf des pH-Wertes resultierte aus den von *C. acetobutylicum* gebildeten Fermentationsprodukten, die mittels Gaschromatographie (3.5.5) detektiert werden konnten. Die Unterschiede im Fermentationsspektrum der Mutanten vergleichend zum Wildtyp, sowie unter Salzstress sind in Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21 aufgezeichnet.

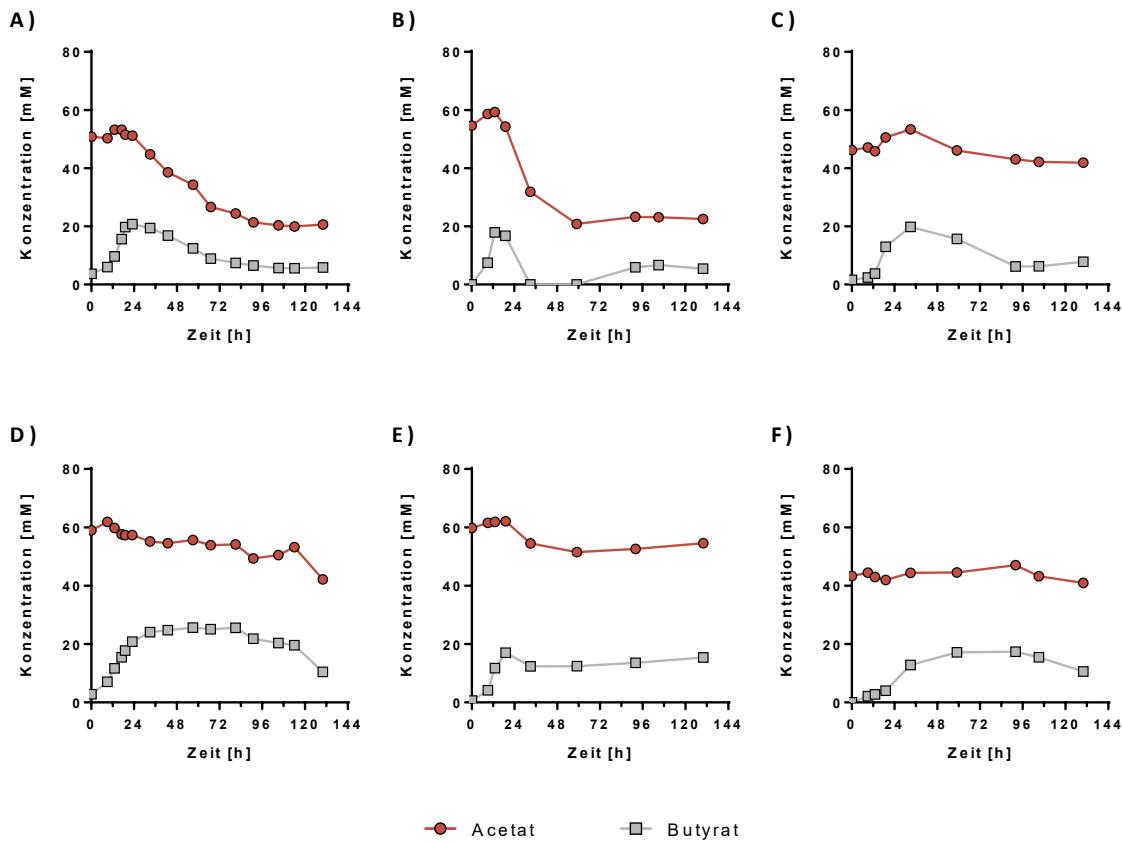


Abbildung 4.20 - Bildung der Säuren der *C. acetobutylicum*-Mutanten.

Säureproduktion in salzfreiem Medium (A-C) und in Medium mit 300 mM NaCl (D-E). (A) und (D) Wildtyp. (B) und (E) *argR92a::CT*. (C) und (F) *pTc::argR*. 200 ml MS-MES, Antibiotikazusatz bei *argR92a::CT* (Ery) und *pTc::argR* (Chl), 130 h, 37 °C, n = 4 (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Die Analyse der Fermentationsprodukte vom Wildtyp in salzfreiem Medium, sowie bei 300 mM NaCl wurden bereits unter 4.1 ausführlich erläutert. Zusammenfassend zeigte sich beim Wildtyp ohne NaCl-Zugabe (Abbildung 4.20, A) die Abnahme der Acetatkonzentration von ca. 51 mM auf 21 mM sowie eine Butyratproduktion bis zu 21 mM in der exponentiellen Wachstumsphase und deren Rückgang auf 6 mM im weiteren Wachstumsverlauf. Unter 300 mM Salzstress (Abbildung 4.20, D) zeigte der Wildtyp eine erhöhte Konzentration und verminderte Reassimilation der Säuren. Die Butyratproduktion erreichte nach der exponentiellen Phase eine Konzentration von 25 mM. Ohne den Einfluss von Salzstress zeichnete sich die Insertionsmutante durch eine schnellere Acetatabnahme innerhalb der Transitionsphase im Vergleich zum Wildtyp aus (Abbildung 4.20, B). Von 55 mM fiel die Konzentration bereits nach 60 h Wachstum auf 21 mM ab und blieb bis zum Ende des Versuches nach 130 h auf diesem Niveau. Butyrat wurde in der exponentiellen Phase bis zu 18 mM gebildet und nachfolgend ebenfalls sehr rasch wieder reassimiliert, sodass es während der Transitionsphase nicht mehr detektiert werden konnte. Nach etwa 60 h stieg die Butyratkonzentration wieder leicht an und erreichte nach 130 h einen Wert von 5 mM. Die Zugabe von 300 mM NaCl zum Wachstumsmedium führte auch bei der Insertionsmutante zu einer erhöhten Konzentration und verminderten Reassimilation der Säuren (Abbildung 4.20, E). Die

Acetatkonzentration sank während der stationären Phase von 60 mM auf 55 mM ab. Während der exponentiellen Wachstumsphase konnten 17 mM Butyrat produziert werden, die während der stationären Phase nur teilweise reassimiliert wurden, sodass nach 130 h noch 15 mM Butyrat im Medium detektiert werden konnten. Beim Vergleich der Überexpressionsmutante mit dem Wildtyp zeigte sich im Allgemeinen eine geringere Acetatkonzentration, sowohl in salzfreiem (Abbildung 4.20, C), als auch in salzhaltigem Medium (Abbildung 4.20, F). Diese lag ohne NaCl zwischen 46 und 42 mM und bei 300 mM NaCl zwischen 43 mM und 41 mM. Hinsichtlich der Butyratproduktion verhielt sich die Überexpressionsmutante wie der Wildtyp. In der exponentiellen Phase konnten in salzfreiem Medium 20 mM Butyrat produziert werden, die wieder während der stationären Phase aufgenommen wurden, sodass eine Endkonzentration von 8 mM detektiert werden konnte. Unter 300 mM NaCl-Zugabe zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Es wurden zunächst etwa 17 mM Butyrat gebildet, die dann teilweise wieder reassimiliert wurden, bis nach 130 h noch 11 mM Butyrat im Medium vorlagen.

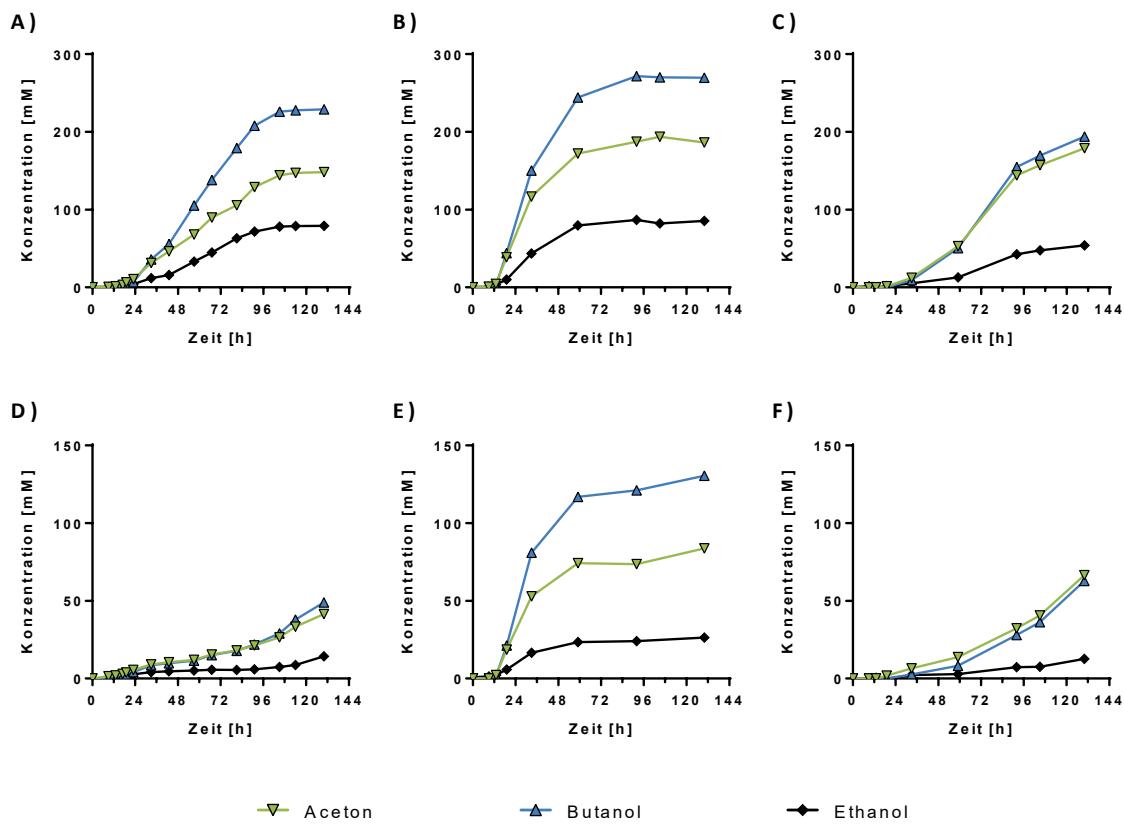


Abbildung 4.21 - Bildung der Lösungsmittel der *C. acetobutylicum*-Mutanten.

Lösungsmittelproduktion in salzfreiem Medium (A-C) und in Medium mit 300 mM NaCl (D-E). (A) und (D) Wildtyp. (B) und (E) *argR92a::CT*. (C) und (F) *pTc::argR*. 200 ml MS-MES, Antibiotikazusatz bei *argR92a::CT* (Ery) und *pTc::argR* (Chl), 130 h, 37 °C, n = 4 (aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Die Unterschiede der Lösungsmittelbildung der Mutanten vergleichend zum Wildtyp, sowie unter Salzstress sind in Abbildung 4.21 aufgezeichnet. Abbildung 4.21 A) verdeutlicht, dass beim Wildtyp

nach ca. 17 h Wachstum setzte die Solventogenese einsetzte, in der 150 mM Aceton, 230 mM Butanol und 80 mM Ethanol gebildet wurden. Die Produktion der Lösungsmittel fiel bei 300 mM NaCl sehr gering aus, sodass nur Konzentrationen von 49 mM Butanol, 41 mM Aceton und 14 mM Ethanol erreicht werden konnten.

Die Insertionsmutante zeigte den größten Unterschied zum Wildtyp bei der Lösungsmittelproduktion, die hier schon nach 13 h einsetzte. Bereits in salzfreiem Medium (Abbildung 4.21, B) konnten mit 186 mM Aceton, 270 mM Butanol und 86 mM Ethanol wesentlich höhere Mengen produziert werden als beim Wildtyp. Auch unter 300 mM Salzstress (Abbildung 4.21, E) wurden schon nach 13 h die ersten Lösungsmittel detektiert. So produzierte die Insertionsmutante mit 179 mM Aceton, 194 mM Butanol und 54 mM Ethanol die vierfache Menge an Lösungsmitteln unter Salzstress, verglichen mit dem Wildtyp. Bei der Überexpressionsmutante war die Lösungsmittelbildung ohne Salzstress im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Abbildung 4.21, C). Sie setzte erst nach 33 h Wachstum ein und produzierte in salzfreiem Medium 179 mM Aceton, 194 mM Butanol und 54 mM Ethanol. Damit war nur die Endkonzentration von Aceton etwas höher als die des Wildtyps. Unter Salzstress zeigte auch die Überexpressionsmutante einen Rückgang der Lösungsmittelproduktion und erreichte Endkonzentrationen wie der Wildtyp (Abbildung 4.21, F). Es konnten nach 130 h Wachstum 67 mM Aceton, 63 mM Butanol und 13 mM Ethanol detektiert werden.

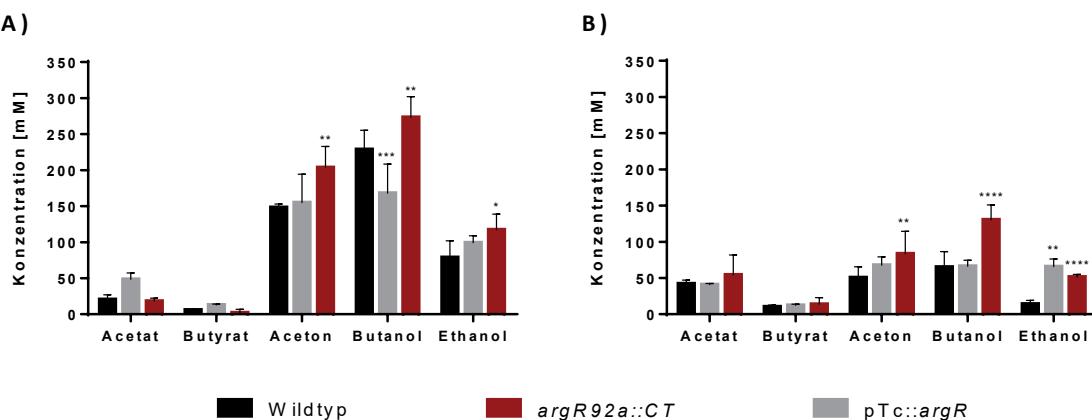


Abbildung 4.22 - Finales Produktspektrum der *C. acetobutylicum*-Mutanten.

Fermentationsprodukte nach 130 h Wachstum in salzfreiem Medium (A) und mit 300 mM NaCl (B). 200 ml MS-MES, Antibiotikazusatz bei *argR92a::CT* (Ery) und *pTc::argR* (Chl), 130 h, 37 °C, n = 4, Dunnett's multiple comparison (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001).

Abbildung 4.22 veranschaulicht noch einmal die finale Konzentration der Fermentationsprodukte nach 130 h Wachstum. Die *argR*-Insertionsmutante zeigte eine signifikant erhöhte Lösungsmittelbildung im Vergleich zum Wildtyp, sowohl in salzfreiem als auch in Medium mit 300 mM NaCl. Im Gegensatz dazu konnte bei der Überexpressionsmutante in salzfreiem Medium eine signifikant verminderte Butanolkonzentration detektiert werden.

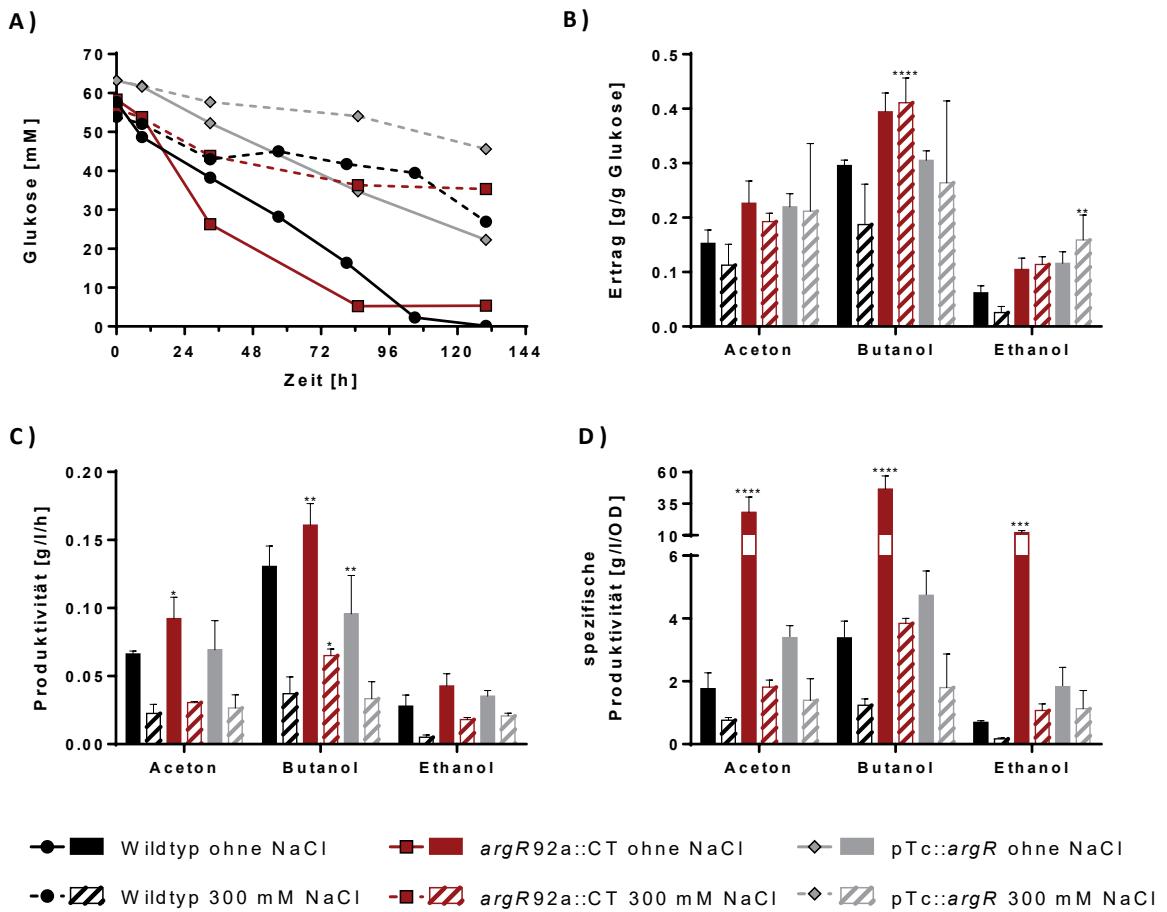


Abbildung 4.23 - Lösungsmittelproduktivitäten der *C. acetobutylicum*-Mutanten.

(A) Glukoseverbrauch, (B) Lösungsmittel ertrag, (C) Produktivität und (D) spezifische Produktivität beim Wachstum der Insertionsmutante *argR92a::CT* und der Überexpressionsmutante *pTc::argR* im Vergleich zum Wildtyp ohne NaCl bzw. mit 300 mM NaCl. 200 ml MS-MES, Antibiotikazusatz bei *argR92a::CT* (Ery) und *pTc::argR* (Chl), 130 h, 37 °C, n = 3, Dunnett's multiple comparison (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001, aus Übersichtlichkeitsgründen wurde bei A auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet).

Abbildung 4.23 visualisiert die Produktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Allgemein zeigte sich auch bei den beiden Mutanten eine negative Auswirkung von 300 mM Salzstress auf die Produktivitäten, welcher bei der Insertionsmutante jedoch nicht so stark ausfiel, wie beim Wildtyp. Es zeigte sich, dass vor allem diese Mutante in salzfreiem Medium und auch bei 300 mM NaCl wesentlich höhere Lösungsmittelproduktivitäten als der Wildtyp aufwies. Vor allem die biomassespezifische Produktivität erreichte bei der Insertionsmutante in salzfreiem Medium im Vergleich zum Wildtyp das bis zu 16-Fache.

Die Überexpressionsmutante zeigte eine ähnliche Produktivität wie der Wildtyp. Unterschiede bestanden in einer geringeren Butanolproduktivität in salzfreiem Medium, bzw. in einer leicht erhöhten Ethanolproduktivität unter Salzstress. Allerdings konnte diese Mutante sowohl in salzfreiem Medium, als auch unter Salzstress, eine höhere biomassespezifische Produktivität erreichen als der Wildtyp.

Hinsichtlich des Ertrages wiesen die Mutanten allgemein höhere Werte nach 130 h auf, als der Wildtyp. Dabei zeigte vor allem die Insertionsmutante Erträge von 0,227 g Aceton, 0,395 g Butanol und 0,105 g Ethanol je Gramm Glukose auf, die sich nach der Zugabe von 300 mM NaCl zum Wachstumsmedium hinsichtlich Butanols und Ethanol sogar noch erhöhten. So wurden noch 85 % (0,193 g/g Glukose) des ursprünglichen Acetonertrages erreicht, aber der Butanol- (0,411 g/g Glukose) und Ethanolertrag (0,113 g/g Glukose) stiegen auf ca. 104 % bzw. 109 % an. Auch bei der Überexpressionsmutante konnte bezüglich des Ethanolertrages eine Steigerung unter Salzstress festgestellt werden.

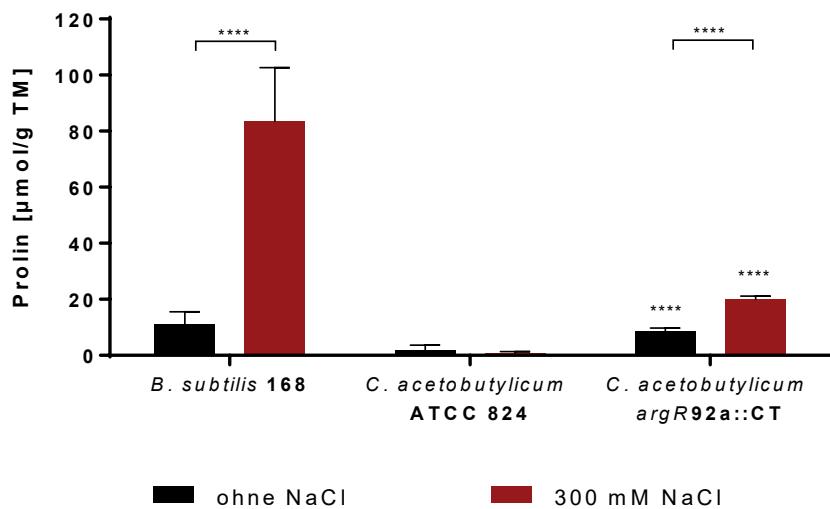


Abbildung 4.24 - Intrazelluläre Prolin-Konzentration der Insertionsmutante.

Intrazellulärer Prolin-Gehalt nach Wachstum von *C. acetobutylicum* und *argR92a::CT* bzw. *B. subtilis* 168 in Minimalmedium mit oder ohne Zugabe von 300 mM NaCl, $n \geq 4$, Holm-Sidak's multiple t-test (**** $p \leq 0,0001$).

Um eine mögliche Verknüpfung von Arginin- und Prolin-Biosynthese zu überprüfen, wurde der intrazelluläre Prolin-Gehalt der Insertionsmutante bestimmt (3.6.3). Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Prolin-Pools der Mutante, sowohl unter normalen Wachstumsbedingungen, als auch unter Salzstress im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 4.24). Die Insertionsmutante wies beim Wachstum ohne Salzstress eine intrazelluläre Prolin-Konzentration von 8,7 $\mu\text{mol/g TM}$ auf. Somit war selbst ohne Salzstress die Prolin-Konzentration um ein Vierfaches höher als beim Wildtyp. Die Zugabe von 300 mM NaCl zum Wachstumsmedium resultierte in einer weiteren Erhöhung des Prolin-Gehaltes auf 20 $\mu\text{mol/g TM}$, was etwa eine 20-fache Steigerung verglichen mit dem Wildtyp ausmacht.

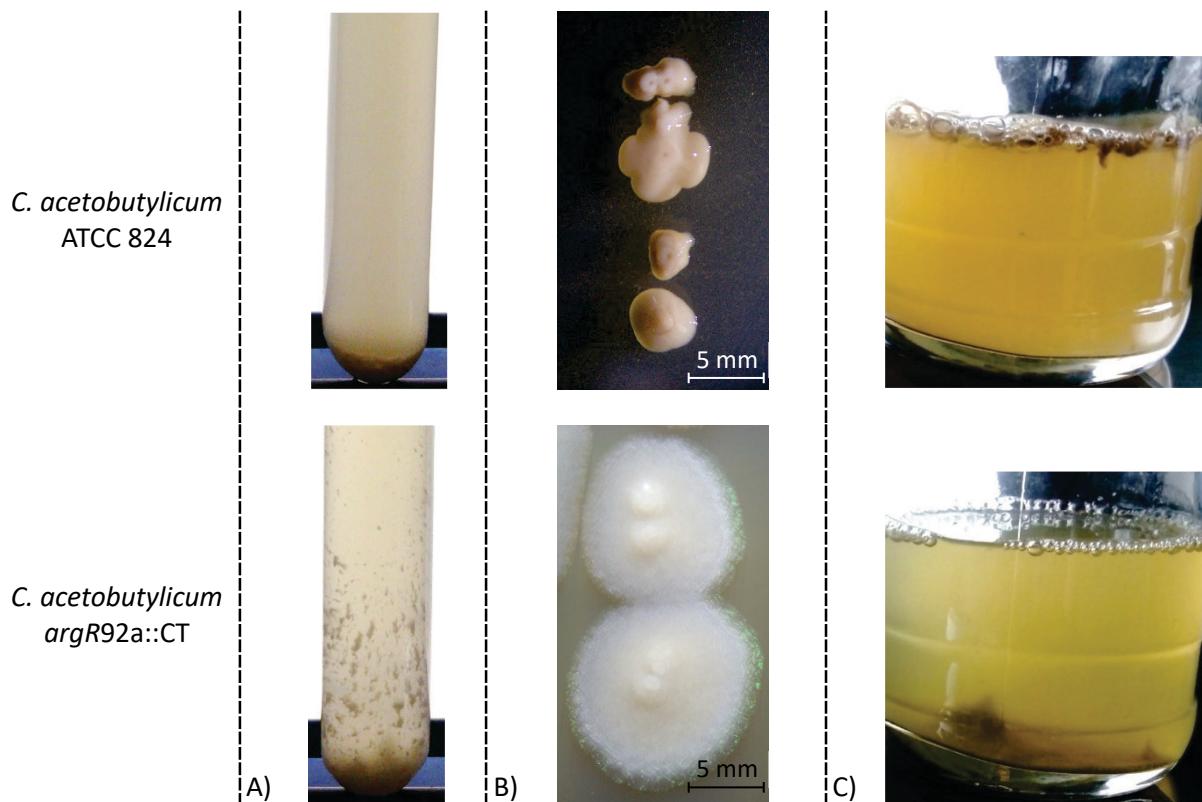


Abbildung 4.25 - Makroskopischer Vergleich von Insertionsmutante und Wildtyp.

Dargestellt ist die Insertionsmutante *argR92a::CT* vergleichend zum Wildtyp ATCC 824. (A) Biofilmbildung in CGM ohne NaCl nach 24 h. (B) Koloniemorphologie auf CGA ohne NaCl nach 24 h. (C) Wachstum und Clumping in MS-MES ohne NaCl nach 48 h. Antibiotikazusatz bei *argR92a::CT* (Ery).

Eine weitere Besonderheit zeigte die Insertionsmutante bei der morphologischen Betrachtung des Wachstums (Abbildung 4.25). Beim Wachstum in flüssigem Komplexmedium (Abbildung 4.25, A) zeigte die Mutante nach 24 h vermehrte Biofilmbildung an den Hungatewänden. In Minimalmedium (Abbildung 4.25, B) war nach ca. 28 h ein *clumping*-Effekt bei der Insertionsmutante zu beobachten, was ein starkes Absinken der optischen Dichte im Verlauf der stationären Phase zur Folge hatte. Auch die Koloniemorphologie von der Insertionsmutante unterschied sich deutlich von der des Wildtyps. Während der Wildtyp auf CGM-Agar kleine, glänzende gelbliche Kolonien bildete, zeigten die weißen Kolonien der Mutante eine eher matte Oberfläche und einen dreifach größeren Durchmesser. Auffallend war auch der glänzende Rand der Mutantenkolonien, der scheinbar von einem Kanalgeflecht durchzogen war.

4.4 Transkriptomanalyse von *C. acetobutylicum* unter Salzstress

Die Insertionsmutante *argR92a::CT* konnte erfolgreich generiert und molekular bestätigt werden (4.3.1). Mittels RNA-Seq-Analysen (3.7.4) sollten nachfolgend die theoretisch vorhergesagten Auswirkungen der Inaktivierung des Arginin-Repressors (4.3) auf Transkriptomebene vergleichend zum Wildtyp überprüft und gegebenenfalls bestätigt werden. Auch die Aufdeckung weitere Effekte

des *metabolic engineerings* auf Gene außerhalb des Arginin-Stoffwechsels konnte damit ermöglicht werden. Der Fokus lag dabei vor allem auf den Veränderungen des Transkriptoms von Wildtyp und Insertionsmutante unter Salzstresseinfluss.

4.4.1 Enrichment-Analysen mittels STRING

Für einen ersten Überblick über die Gesamtheit des Transkriptoms von Wildtyp und Insertionsmutante kam die STRING-Datenbank (<https://string-db.org/>, Szklarczyk *et al.* 2019) zum Einsatz. Diese Datenbank ist eine Sammlung aller öffentlich zugänglichen Informationen zu Protein-Protein-Interaktionen und ermöglicht, diese zu bewerten und durch rechnerische Vorhersagen zu ergänzen. So konnte der gesamte RNA-Seq-Datensatz als ein globales Netzwerk der direkten (physikalischen) und indirekten (funktionellen) Interaktionen visualisiert werden. Enrichment-Analysen und ein hierarchisches Clustering ermöglichen nachfolgend die Hervorhebung von statistisch signifikanten Stoffwechselwegen und funktionellen Subsystemen im Interaktionsnetzwerk. Allerdings waren einige Gene des pSOL1-Plasmids nicht in der STRING-Datenbank implementiert, weswegen diese bei den Analysen nicht mit einbezogen werden konnten. Die funktionelle Interpretation der Enrichment-Analysen erfolgte über die *Gene Ontology* (GO) Klassifizierung, bei der die Genprodukte entsprechend der molekularen Funktion und der zugehörigen biologischen Prozesse kategorisiert werden (Tabelle 11, Anhang). Mittels REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>, Supek *et al.* 2011) wurden redundante GO-Klassen entfernt und die verbleibenden Kategorien graphisch dargestellt. Die Enrichment-Analyse des Salzstresstranskriptoms von *C. acetobutylicum* ist in Abbildung 4.26 visualisiert.

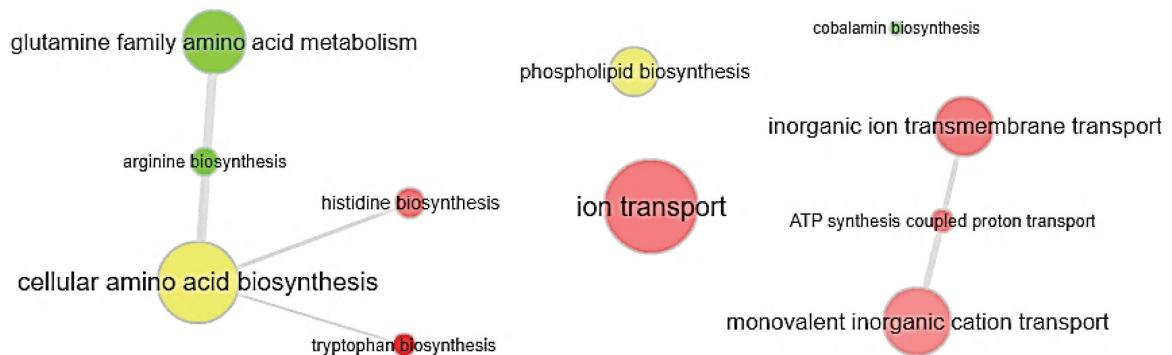


Abbildung 4.26 - Enrichment-Analyse des Salzstress-Transkriptoms von *C. acetobutylicum*.

Visualisierung nicht-redundanter GO-Kategorien mittels REVIGO (semantische Ähnlichkeit < 0,7). Die zugrundeliegende Gene (Transkriptlevel erhöht, rot; verringert, grün; heterogen, gelb) wurden generellen (große Kreise) bzw. spezifischen (kleine Kreise) Kategorien zugeordnet, wobei Verbindungen zwischen Kategorien über Linien angezeigt werden.

Vor allem die Aminosäure-Biosynthesewege traten bei *C. acetobutylicum* unter Salzstresseinfluss mit signifikanter Häufigkeit auf. Dabei wiesen die dazugehörigen Gene sowohl erhöhte, als auch verringerte Transkriptlevel auf (Abbildung 7.12, Anhang). Die Biosynthesegene der aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tryptophan, zeigten die höchsten Transkriptlevel. Im Gegensatz dazu

waren die Biosynthesegene der Glutamin-Familie, hier vor allem Arginin, durch verringerte Transkriptlevel gekennzeichnet. Auch die Cobalamin-Biosynthese zählte zu den häufig auftretenden Stoffwechselwegen und unter Salzstress zeigten die entsprechenden Gene verminderte Transkriptlevel. Hohe Transkriptlevel sind vor allem in den Klassen des Ionentransports zu finden. Besonders die Cluster des anorganischen Ionentransports, gekoppelt mit der ATP-Synthese zeigen eine Anreicherung unter Salzstress. Dazu zählten zum einen die Gene des *kdpABC*-Systems, welche für den Kaliumimport zuständig ist. Zum anderen waren in dieser Gruppe zahlreiche protonen- bzw. natriumabhängige ATP-Synthasen, sowie ABC-Transporter zu finden. Auch die Phospholipid-Biosynthese zählte zu den signifikant angereicherten GO-Klassen, wobei Gene mit erhöhten und verringerten Transkriptleveln in dieser Kategorie zu finden waren.

Bei der Insertionsmutante zeigte sich unter Salzstress eine große Anzahl an signifikant angereicherten Stoffwechselwegen, weshalb eine geringere semantische Ähnlichkeit zur Entfernung redundanter Kategorien gewählt wurde (Abbildung 4.27).

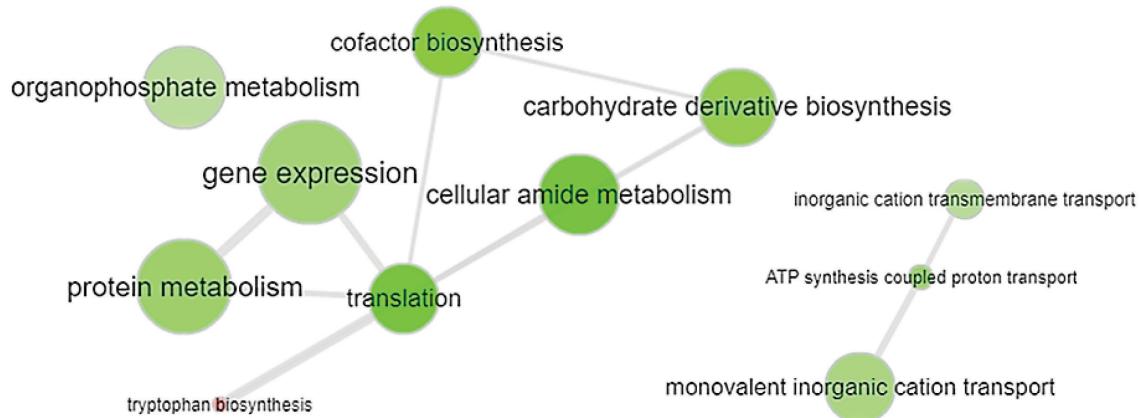


Abbildung 4.27 - Enrichment-Analyse des Salzstress-Transkriptoms der Insertionsmutante.

Visualisierung nicht-redundanter GO-Kategorien mittels REVIGO (semantische Ähnlichkeit < 0,4). Die zugrundeliegende Gene (Transkriptlevel erhöht, rot; verringert, grün; heterogen, gelb) wurden generellen (große Kreise) bzw. spezifischen (kleine Kreise) Kategorien zugeordnet, wobei Verbindungen zwischen Kategorien über Linien angezeigt werden.

Das einzige Gencluster mit verstärkter Transkription unter Salzstress war hier die Tryptophan-Biosynthese (Abbildung 7.12, Anhang). Alle weiteren Stoffwechselwege wiesen verminderte Transkriptlevel der entsprechenden Gene auf. Dazu zählte zum einen die GO-Kategorien des Anionentransports und der dazugehörigen ATP-Synthese. Wie beim Wildtyp waren auch hier z. B. das *kdpABC*-System und die ATP-Synthasen in dieser Kategorie vertreten, wobei sie bei der Insertionsmutante unter Salzstress allerdings verminderte Transkriptlevel aufwiesen. Innerhalb der Cofaktor-Biosynthese waren vor allem Gene der Cobalamin- und Biotin-Biosynthese zu finden. Viele Gene aus dieser Kategorie zählten außerdem zum Kohlenhydrat-Stoffwechsel, wie z. B. die Gene der Glykolyse. Auffallend waren auch die signifikant angereicherten GO-Kategorien Genexpression, Translation und Protein-Metabolismus. Alle diese Kategorien beinhalten die Gene des Nukleotidstoffwechsels, besonders die der Purin- und Pyrimidin-Biosynthese, welche durchgehend niedrige Transkriptlevel unter Salzstress zeigten.

Neben den einzelnen Salzstressantworten von Wildtyp und Mutante sollten auch die Auswirkungen der Inaktivierung des Arginin-Repressors visualisiert werden. Dafür wurden die Transkriptlevel der Gene des Wildtyp denen der Insertionsmutante gegenübergestellt. Der Vergleich der Transkriptome ohne Stresseinwirkung resultierte in einer großen Anzahl signifikant angereicherter GO-Klassen, sodass bei REVIGO eine maximale semantische Ähnlichkeit von 0,4 zur Redundanzberechnung eingestellt wurde. Die entsprechenden GO-Kategorien sind in Abbildung 4.28 dargestellt.

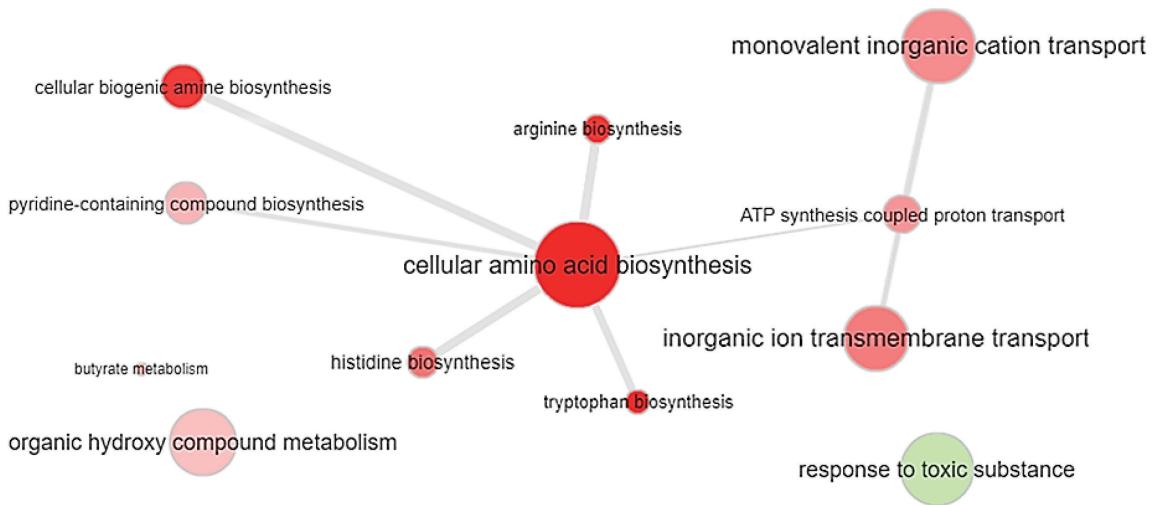


Abbildung 4.28 - Enrichment-Analyse des Transkriptoms von Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp.

Visualisierung nicht-redundanter GO-Kategorien mittels REVIGO (semantische Ähnlichkeit < 0,4). Die zugrundeliegende Gene (Transkriptlevel erhöht, rot; verringert, grün) wurden generellen (große Kreise) bzw. spezifischen (kleine Kreise) Kategorien zugeordnet, wobei Verbindungen zwischen Kategorien über Linien angezeigt werden.

Vor allem die Aminosäure-Biosynthese ist bei der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp mit wesentlich höheren Transkriptleveln vertreten. Die Biosynthesen von Arginin, Tryptophan und Histidin waren dabei besonders angereichert. Auch die GO-Kategorien des Anorganischen Ionentransports zeigten neben dem Kaliumtransportsystem *kdpABC* und den Genen zur protonen- bzw. natriumabhängigen ATP-Synthese auch einige ABC-Transporter zur Aminosäureaufnahme. Das Cluster des Butyratmetabolismus und der Stoffwechselprozesse organischer Hydroxyverbindungen zeigten ebenfalls eine signifikante Anreicherung mit erhöhten Transkriptleveln. Diese GO-Kategorien umfassen hier vor allem die Gene zur Synthese von Butyrat und dessen Umwandlung zu Butanol. Als einzige angereicherte Kategorie mit einer verringerten Transkription war hier die Reaktion auf toxische Substanzen zu detektieren (Abbildung 7.12, Anhang).

Des Weiteren sollten die Unterschiede der Salzstressantworten von Insertionsmutante vergleichend zum Wildtyp analysiert werden. Dafür erfolgte die Gegenüberstellung der Transkriptlevel unter Salzstresseinwirkung (Abbildung 4.29).

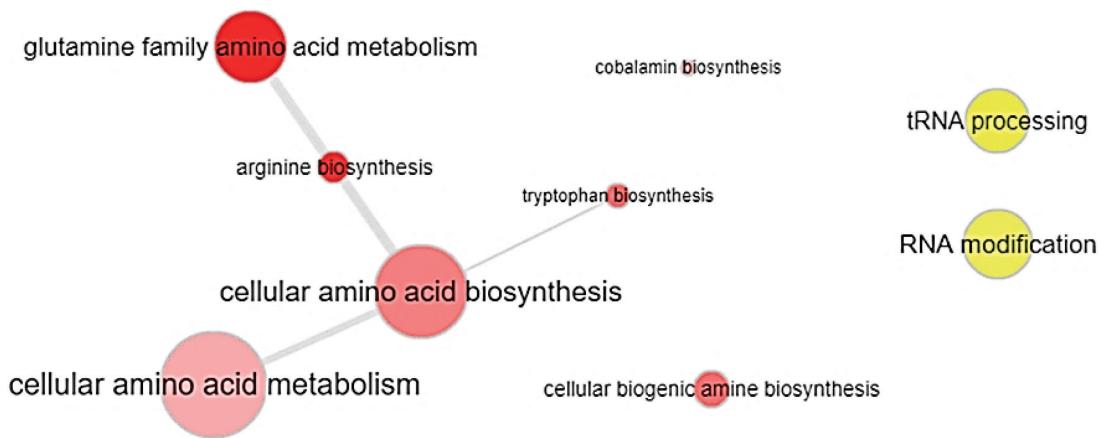


Abbildung 4.29 - Enrichment-Analyse des Salzstress-Transkriptoms von Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp

Visualisierung nicht-redundanter GO-Kategorien mittels REVIGO (semantische Ähnlichkeit $< 0,7$). Die zugrundeliegende Gene (Transkriptlevel erhöht, rot; verringert, grün; heterogen, gelb) wurden generellen (große Kreise) bzw. spezifischen (kleine Kreise) Kategorien zugeordnet, wobei Verbindungen zwischen Kategorien über Linien angezeigt werden.

Im Vergleich zum Wildtyp enthielt das Salzstresstranskriptom der Insertionsmutante signifikant auftretende Stoffwechselwege, wobei vor allem Aminosäure-Biosynthesen erhöhte Transkriptlevel aufwiesen. Insbesondere die Arginin- und Tryptophan-Biosynthese zeigte hohe Transkriptlevel und eine starke Anreicherung. Auch die Gene der Cobalamin-Biosynthese gehörte zu den angereicherten Stoffwechselwegen. Die Transkriptlevel dieser Klassen waren bei der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp auch unter Salzstress erhöht (Abbildung 7.12, Anhang). Auch Gene der RNA-Stoffwechselprozesse lagen in den Clustern RNA-Modifizierung und tRNA-Prozessierung mit signifikanter Häufigkeit im Transkriptom vor.

4.4.2 Klassifikation der differentiell exprimierten Gene

Neben einer Gesamtübersicht über die generierten Transkriptome und den signifikant angereicherten Stoffwechselwegen, sollten zur Auswertung außerdem die differentiell exprimierten Gene (DEGs) betrachtet werden. Diese Gene zeigten eine log2-fache Änderung der Expression von $\geq 2,0$ bzw. $\leq -2,0$, einen Wahrscheinlichkeitswert von $\geq 0,9$ und einem angepassten P-Wert von $\leq 0,05$. Die Einteilung der DEGs erfolgte über die COG-Klassifikation (*Cluster of Orthologous Groups*, COG) für Proteine, welche einen funktionellen Überblick über die Produkte der DEGs erlaubt (Tatusov *et al.* 2000, Tabelle 11, Anhang). Die Transkriptveränderungen einiger Gene ausgewählter COG-Klassen sind außerdem in Abbildung 7.12 (Anhang) zu finden.

C. acetobutylicum besitzt 3848 proteinkodierenden Gene, wovon sich 3672 auf dem Chromosom und 176 auf dem Megaplasmid pSOL1 befinden. Die Kultivierung des Wildtyps in Medium mit 300 mM NaCl veränderte die Transkription von 369 Genen, wobei 154 DEGs eine erhöhte und 215 DEGs eine Reduktion der Expression zeigten (Abbildung 4.30).



Abbildung 4.30 - DEGs des Salzstress-Transkriptoms von *C. acetobutylicum*.

Die DEGs wurden nach dem COG-Klassifikationsschema gruppiert und als prozentualer Anteil zur Gesamtanzahl der DEGs visualisiert.

Die größten Veränderungen traten innerhalb des COG G (Kohlenhydrattransport und -metabolismus, 10 % der hochregulierten bzw. 7 % der herunterregulierten Gene) auf. Innerhalb der dort 10 % hochregulierter DEGs konnten vor allem Phosphotransferase-Systeme für verschiedene Zucker, sowie biofilmrelevante Gene zur EPS-Bildung identifiziert werden. Zu letzteren zählt auch die Betamannanase (*cac0332*), welche die stärkste Erhöhung der Transkriptmenge unter Salzstress aufwies. Auch in den Gruppen E (Aminosäuretransport und -metabolismus, 7 % bzw. 7 %) und H (Coenzymtransport und -metabolismus, 1 % bzw. 9 %) war eine erhöhte Anzahl an DEGs zu verzeichnen. Vor allem in Gruppe E konnten unter Salzstress einer erhöhte Transkriptmenge von Aminosäure- und ABC-Transporter-Genen detektiert werden. Dabei waren insbesondere die Transkriptlevel des Prolin/GB ABC-Transportsystems (*cac2849-50*) unter Salzstress bis zu 20fach erhöht. Des Weiteren zählte das Oligopeptid-Transportersystem Opp (*cac3641-44*) zu den ABC-Transportern mit bis zu sechsfach erhöhten Transkriptleveln. Auch die Tryptophan-Synthase (*cac3157-58*), welche für die Bildung von Tryptophan aus Serin und Indol verantwortlich ist, zeigte unter Salzstress eine achtfache Erhöhung der Transkriptmenge. Interessanterweise fielen die Transkriptlevel von einem Großteil der Arginin-Biosynthesegene (*argBD*, *argF/I*, *argGH*) unter Salzstress zwischen vier- bis siebenfach niedriger aus. Die in der Gruppe H zwischen fünf- bis achtfach herunterregulierten Gene konnten der Cobalamin-Biosynthese zugeordnet werden. Auch in Gruppe R (Nur allgemeine Funktionsvorhersage) waren 7 % der herunterregulierten DEGs zu finden. Neben dieser Gruppe, mit nur bedingt annotierten Genfunktionen, kodierte der größte Teil (55 % der hochregulierten Gene und 35 % der herunterregulierten Gene) für Proteine, deren Funktion bisher noch nicht beschrieben bzw. einem COG zugeordnet werden konnte. Die am stärksten verminderten Transkriptlevel traten bei Genen

der Stickstoff-Fixierung (*cac0253-57*) auf, wobei das Level der Nitrogenase-Transkripte um das mehr als 30-Fache niedriger war.

Bei der Insertionsmutante zeigten sich unter Salzstress insgesamt 118 DEGs, von denen 48 DEGs erhöhte und 70 DEGs verminderte Transkriptlevel aufwiesen (Abbildung 4.31).

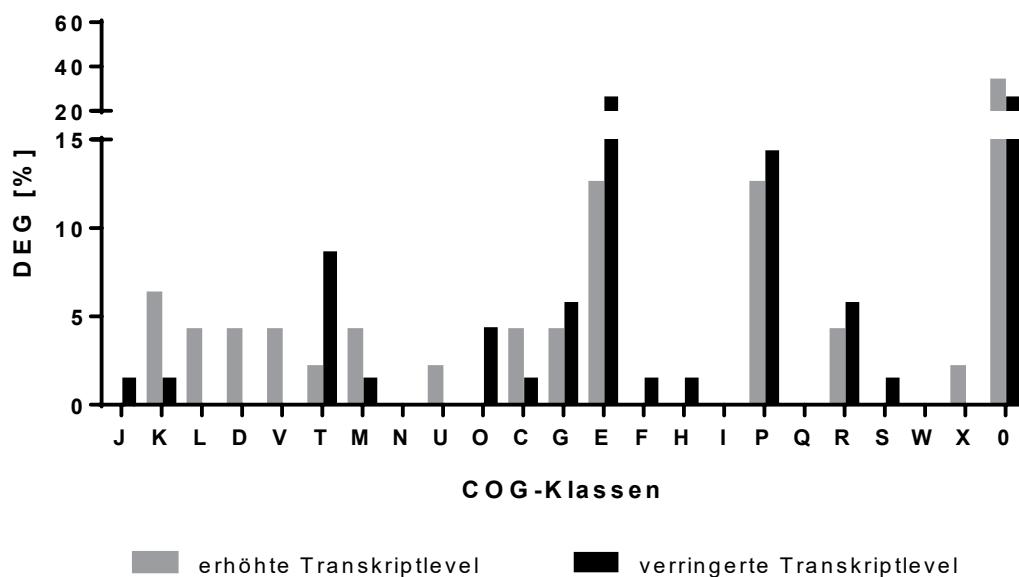


Abbildung 4.31 - DEGs des Salzstress-Transkriptoms von der Insertionsmutante.

Die DEGs wurden nach dem COG-Klassifikationsschema gruppiert und als prozentualer Anteil zur Gesamtanzahl der DEGs visualisiert.

Die größten Veränderungen traten innerhalb der COGs T (Mechanismen der Signaltransduktion, 2 % bzw. 9 %), E (Aminosäuretransport und -metabolismus, 13 % bzw. 26 %) und P (Anorganischer Ionentransport und -stoffwechsel, 13 % bzw. 14 %) auf. Doch auch hier waren die Gene ohne annotierte COG-Klassifikation die größte Gruppe (33 % der hochregulierten Gene und 26 % der herunterregulierten Gene). Erhöhte Transkriptlevel zeigten in Gruppe E Gene der Aminosäure- und ABC-Transporter. Dabei waren auch hier die des Prolin/GB ABC-Transportsystems (*cac2849*, *cac2850*) unter Salzstress 10fach erhöht. Ebenso konnte das Oligopeptid-Transportersystem Opp (*cac3641-44*) mit vierfach erhöhten Transkriptmengen detektiert werden. Innerhalb der Gruppe P waren erhöhte Level von ABC-Transporter-Genen zu finden, besonders ein Natrium/Protonen/Kalium-Antiporter (*cac0444*) zeigte unter Salzstress eine 20fach erhöhte Transkriptmenge. Zu den am stärksten verminderten Gentranskripten zählten zum einen die der Stickstoff-Fixierung (*cac0253-57*) der Gruppe T und P, insbesondere die Nitrogenasegene der Gruppe P. Zum anderen zeigten die DEGs der Gruppe E eine starke Verringerung ihrer Transkriptlevel, wozu die Gene des Ethanolaminabbaus (*cac2717-19*), sowie an der Membranhomöostase beteiligen ABC-Transporter (*cac3634*, *cac3637-38*) zählten. Interessanterweise zeigte auch ein putativer Arginin-ABC-Transporter (*cac0376-78*) unter Salzstress um bis zu sechsfach verminderte Transkriptlevel.

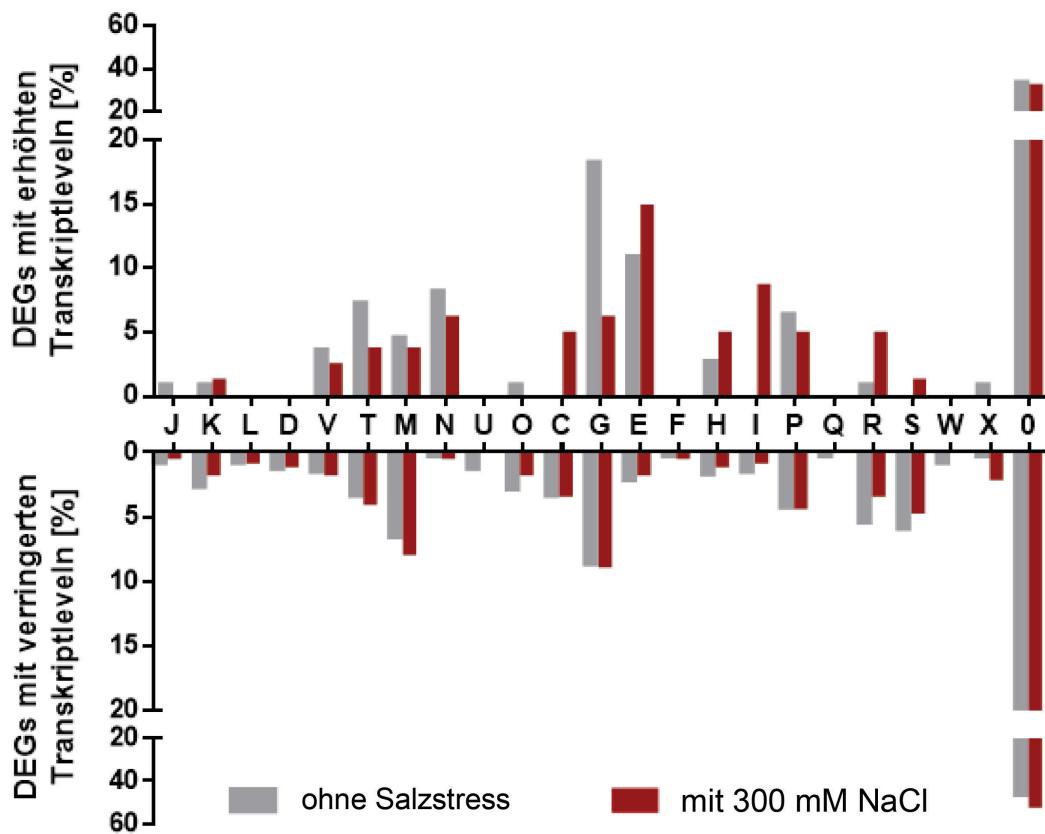


Abbildung 4.32 - DEGs des Transkriptoms von der Insertionsmutante verglichen zum Wildtyp.

Die DEGs wurden nach dem COG-Klassifikationsschema gruppiert und als prozentualer Anteil zur Gesamtanzahl der DEGs visualisiert. Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp ohne Stress bzw. mit 300 mM NaCl-Stress.

Neben dem Einfluss von Salzstress auf die Veränderung der Genexpression war es auch ein Ziel, den Einfluss der *argR*-Inaktivierung auf das Transkriptom zu untersuchen. In Bezug zum Wildtyp zeigte die Insertionsmutante insgesamt 541 DEGs, wovon 110 DEGs erhöhte und 431 DEGs verminderte Transkriptlevel aufwiesen (Abbildung 4.32, A). Dabei traten die größten Veränderungen in den COGs T (Mechanismen der Signaltransduktion, 7 % der hochregulierten bzw. 3 % der herunterregulierten Gene), G (Kohlenhydrattransport und -metabolismus, 18 % bzw. 9 %), E (Aminosäuretransport und -metabolismus, 10 % bzw. 2 %), M (Zellwand/Membran/Hüllengen, 5 % bzw. 7 %), N (Zellmotilität, 8 % bzw. 0,2 %) und P (Anorganischer Ionentransport und -stoffwechsel, 6 % bzw. 4 %) auf. Zu den hochregulierten Genen der Gruppe T und N zählten neben allgemeinen Stresssensorproteinen (*cac1412-13*), vor allem Chemotaxis- und Flagellingene. In den Gruppen G und M fanden sich insbesondere erhöhte Transkriptlevel bei den biofilmrelevanten EPS-Genen und Phosphotransferase-Systemen. Dazu zählte z. B. die bereits erwähnte Betamannanase (*cac0332*) mit einem 16fach erhöhten Transkriptlevel. Die Gene des Ammonium- und Stickstoff-Metabolismus der Gruppe P waren auch bei der Insertionsmutante vergleichend zum Wildtyp hochreguliert. Innerhalb der Gruppe P fanden sich außerdem auch DEGs des Cationen-Effluxes (*cac1094*, *cac2137*) mit stark verminderten Transkriptmengen.

Das Salzstresstranskriptom der Insertionsmutante verglichen mit dem des Wildtyps offenbarte Unterschiede in den jeweiligen Salzstressantworten (Abbildung 4.32, B). So zeigte die Insertionsmutante unter Salzstress stark erhöhte Transkriptlevel der Flagellingene (*cac1555*, *cac1634*) und des Kationen-Effluxes (*cac3444*, *cac3295*). Die größte Veränderung der Transkriptmengen trat in den COG-Klassen E (Aminosäuretransport und -metabolismus, 15 % der hochregulierten bzw. 2 % der herunterregulierten Gene), G (Kohlenhydrattransport und -metabolismus, 6 % bzw. 8 %), M (Zellwand/Membran/Hüllen-Biogenese, 4 % bzw. 8 %) und I (Lipidtransport und -stoffwechsel, 9 % bzw. 1 %) auf. Innerhalb der Klasse E fielen besonders die Gene der Arginin- (*argF/I*, *argGH*, *argBD*, *argCJK*, *carAB*, *argJ2*) und Tryptophan-Biosynthese (*cac3158-52 = trpBFCD*, *pabA*) mit zwei- bis vierfach erhöhten Transkriptleveln auf. Zur COG-Klasse G zählten im Bereich der Gene mit sech- bis achtfach verringerten Transkriptleveln zahlreiche Phosphotransferasesysteme für die Aufnahme von z. B. Fruktose (*cac1457-59*) oder Lactose (*cac2964-65*), sowie andere Kohlenhydrat-ABC-Transporter (*cac0662-66*). Bis zu sechsfach erhöhte Transkriptlevel zeigten in dieser Gruppe putative Glycosyltransferasen (*cac1997*, *cac2007*) und Zellwandenzyme (*cac1079*, *cac2807*). Interessanterweise zählten auch zu den Genen mit niedrigeren Transkriptleveln in Gruppe M zahlreiche Glycosyltransferasen (*cac3049-52*, *cac2907*, *cac2911*) und zellwandassoziierte Enzyme (*cap0118-19*, *cac1876*, *cac2057*, *cac2621*). Innerhalb der Gruppe I finden sich Gene des Fettsäurestoffwechsels mit erhöhten Transkriptleveln (*cac2008-09*, *cac2011-12*, *cac2014*, *cac2016*, *cac2019*).

5 Diskussion

Während die Erdölreserven immer weiter abnehmen und die Sorge um die Klimaerwärmung einen neuen Höhepunkt erreicht, liegt der Fokus der Forschung auf dem Einsatz alternativer Verfahren zur Kraftstoffherstellung. Um den weiter steigenden Energiebedarf der Menschheit zu decken, bietet die Nutzung nachwachsender Rohstoffe für die biotechnologische Produktion von Kraftstoffen und Plattformchemikalien einen vielversprechenden Ansatz (Wang *et al.* 2017; González-González *et al.* 2018; BP p.l.c. 2019).

Das Bakterium *C. acetobutylicum* ist ein vielversprechender und gut erforschter Kandidat zur fermentativen Produktion dieser Stoffe. Zum einen ist es in der Lage, die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol zu produzieren. Zum anderen ermöglicht seine genetische Zugänglichkeit die Konstruktion von Produktionsstämmen, die durch z. B. erhöhte ABE-Ausbeuten in der Lage sind, durchaus mit der Petrochemie zu konkurrieren. Neben der beständigen Optimierung und Modifizierung von *C. acetobutylicum* durch *metabolic engineering* ist es jedoch auch notwendig, die Substratnutzung- und verwertung zu verbessern (Dürre 2008; Papoutsakis 2008; Xu *et al.* 2017). In den letzten Jahren wurde vor allem die Forschung bezüglich nachwachsender Biomasse intensiviert, die zum einen nicht mit der Nahrungsmittelproduktion konkurriert und zum anderen für die mikrobielle Produktion von Chemikalien genutzt werden kann (Mussatto 2016). Die Kultivierung von Algenbiomasse wird dabei aufgrund von vielen Vorteilen als zukunftsträchtig empfunden. Neben der Flexibilität der von den Algen produzierten Speicherstoffe sind die geringen Kultivierungskosten und leichtere Aufarbeitung der Biomasse zu nennen (González-González *et al.* 2018; Karim *et al.* 2020). Nichtsdestotrotz existiert seit Anbeginn der ABE-Fermentation das Problem der hemmenden Wirkung von Salzen auf die Produktausbeute (Maddox *et al.* 1995). Vor allem bei der Nutzung aufgearbeiteter Pflanzenbiomasse, aber auch die Kultivierung von Algen in Meerwasser resultiert in nicht zu vernachlässigenden Salzkonzentrationen in der zur Fermentation eingesetzten Biomasse (González-González *et al.* 2018). Es ist also von fundamentalem Interesse, die Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* genauer zu untersuchen und deren Schlüsselgene bzw. -stoffe zu identifizieren. So kann schlussendlich *metabolic engineering* eingesetzt werden, um die Ausbeuten der ABE-Fermentation unter Salzstress zu erhöhen und so den Einsatz von Pflanzen- und Algenbiomasse ertragreich zu machen.

5.1 Salzstress beeinflusst das Wachstum und die ABE-Bildung

Wie bereits erwähnt, ist das Problem der hemmenden Wirkung von Salz auf die ABE-Fermentation schon lange bekannt. Erste Vermutungen zu diesem Problem äußerte Qureshi bereits 1992, als es bei der Kultivierung von *C. acetobutylicum* mit Molkepermeat trotz Prozessoptimierung zum Abbruch der Fermentation kam. Schon damals lag der Verdacht auf der hohen Konzentration von Mineralsalzen im Molkepermeat, welche während der Fermentation akkumuliert und so möglicherweise die Lösungsmittelbildung störten. In weiterführenden Studien konnten

Maddox *et al.* (1995) diesen Verdacht bestätigen. Beim Wachstum von *C. acetobutylicum* in halbsynthetischem Medium resultierten 30 g/l (ca. 500 mM) Natriumchlorid in einer kompletten Wachstumsinhibition und dem Rückgang der ABE-Produktion um bis zu 80 %. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Salzstress resultierten in einer wesentlich drastischeren Inhibition von *C. acetobutylicum*. Besonders hinsichtlich der ABE-Produktion waren bei 500 mM NaCl nur noch ca. 2 % der ursprünglichen ABE-Menge (Abbildung 4.2) zu detektieren. Schon die Zugabe von ca. 300 mM zeigte hier einen Rückgang der ABE-Produktion auf ca. 25 %, während bei Maddox noch 40 % der Lösungsmittel produziert wurden. Die Vermutung liegt nahe, dass die in dieser Arbeit beobachtete stärkere Inhibition von *C. acetobutylicum* durch NaCl auf unterschiedliche Kultivierungsmedien zurückzuführen sind. Bisherige Studien zur Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* wurden in Komplex- oder halbsynthetischen Medien durchgeführt (Maddox *et al.* 1995; Zhao *et al.* 2016). Der dabei verwendete Hefeextrakt beinhaltet jedoch zahlreiche Aminosäuren, die unter Umständen von *C. acetobutylicum* als kompatible Solute genutzt werden könnten (Whatmore *et al.* 1990). Wie bereits in der Einleitung beschrieben (2.2.1) kann die Akkumulation von kompatiblen Soluten einen positiven Einfluss auf das Wachstum unter Salzstress haben. In dieser Arbeit wurde Wert daraufgelegt, *C. acetobutylicum* keine externen kompatiblen Solute zur Verfügung zu stellen, was die stärkere Inhibition von Wachstum und ABE-Bildung in Minimalmedium erklärt. Zhao untersuchte das Wachstum von *C. acetobutylicum* bei 200 mM NaCl in CGM unter der Nutzung von Xylose als Kohlenstoffquelle. Bezuglich der negativen Effekte von Salz auf die Biomassebildung zeigte sich in dieser Arbeit ein stärkerer Rückgang der OD im Vergleich zu den Werten von Zhao. Auch der beschriebene Rückgang der ABE-Produktion konnte in den hier durchgeführten Wachstumsversuchen beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollkultur konnten Zhao eine Abnahme der ABE-Ausbeute von -35,14 % Aceton, -33,37 % Butanol und -22,95 % Ethanol beobachten. In den hier durchgeführten Wachstumsversuchen mit Minimalmedium und Glukose zeigte sich bei 200 mM NaCl ebenfalls ein Rückgang der ABE-Ausbeute (-26,18 % Aceton, -40,76 % Butanol, -59,27 % Ethanol). Die Verschiebung der Fermentation unter Salzstress in Richtung Säurebildung, wie sie schon lange in der Literatur beschrieben ist (Hartmanis und Gatenbeck 1984; Maddox *et al.* 1995), zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuchen (Abbildung 4.2). Interessanterweise sind die hier generierten Ergebnisse zur Säureproduktion konträr zu denen von Zhao. Während in den dort durchgeführten Experimenten 200 mM NaCl die Bildung von Acetat verstärkten, zeigte sich in dieser Arbeit zusätzlich erhöhte Butyratkonzentrationen bei 100-300 mM NaCl. Diese waren bei 200 mM NaCl im Wachstumsmedium am höchsten und erklären den niedrigen pH-Wert dieser Kultur (Abbildung 4.2). Der wissenschaftliche Konsens zur Erklärung der gehemmten Lösungsmittelbildung unter Salzstress fokussiert sich auf die Acetoacetyl-CoA/Acyl-CoA-Transferase CtfAB (Hartmanis und Gatenbeck 1984; Zhao *et al.* 2016). Dieses Enzym ist für die Umwandlung von Acetat und Butyrat in Acetyl-CoA und Butyryl-CoA verantwortlich (Abbildung 2.5), und es soll durch Natriumionen gehemmt werden (Hartmanis und Gatenbeck 1984). Aufgrund hoher Natriumkonzentration im Wachstumsmedium kommt es unweigerlich auch zu einer erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration und damit zur Hemmung von CtfAB. Folglich können die

Zellen die Säuren nicht mehr in Lösungsmittel umwandeln, was zu einer Säureakkumulation führt. Dementgegen sprechen allerdings die erhöhten Acetonproduktivitäten und -erträge bei 100-200 mM NaCl (Abbildung 4.3), da CtfAB auch für die Bildung der Aceton-Vorstufe Acetoacetat verantwortlich ist. Obwohl Hartmanis und Gatenbeck (1984) zu dem Schluss kamen, dass Natriumionen die CtfAB hemmen, konnten Wiesenborn *et al.* (1989) zeigen, dass bei geringen Natriumkonzentrationen (100 mM) noch über 90 % der Aktivität zu verzeichnen war. Es kann also davon ausgegangen werden, dass erst Konzentrationen über 200 mM einen Effekt auf dieses Enzym haben. Wie bereits erwähnt, scheinen geringe Salzkonzentrationen (100-200 mM) die Acetonproduktion sogar zu begünstigen. Vor allem bei den Langzeitkultivierungen (Abbildung 4.4) zeigt sich dieser Effekt deutlich. Nach 443 h Wachstum waren die maximalen Acetonkonzentrationen um 32,17 % (100 mM NaCl) bzw. 14,83 % (200 mM NaCl) erhöht im Vergleich zur salzfreien Kontrolle. Dementsprechend scheint Salzstress bis 300 mM langfristig eher die Butanolbildung zu inhibieren als die Acetonproduktion. Wie bereits erwähnt, wird die Lösungsmittelbildung durch das Enzym CtfAB initiiert, indem Coenzym A von Acetoacetyl-CoA entweder auf Acetat oder Butyrat übertragen wird (Andersch *et al.* 1983; Hartmanis und Gatenbeck 1984; Wiesenborn *et al.* 1989). Das bei dieser Reaktion gebildete Acetoacetat dient als Substrat für die Acetoacetat-Decarboxylase (Adc, *cap0165*), welche für die Acetonbildung verantwortlich ist (Abbildung 2.5). Die Favorisierung der Aceton- gegenüber der Butanol- und Ethanolproduktion liegt möglicherweise in den niedrigen pH-Werten und hohen Säurekonzentrationen der mit 100-300 mM NaCl gestressten Kulturen begründet (Abbildung 4.1). Es ist bekannt, dass zum einen CtfAB Acetat mit einer höheren Rate umwandelt als Butyrat (Wiesenborn *et al.* 1989). Zum anderen induzieren hohe Säurekonzentrationen die Genexpression von *ctfAB* und *adc*, wodurch nicht nur die Umwandlung der Säuren in die Lösungsmittelvorstufen, sondern auch die Produktion von Aceton gefördert wird (Alsaker *et al.* 2010). Die Aktivität der Adc ist bei niedrigen pH-Werten am größten (Andersch *et al.* 1983), wodurch es möglicherweise in den salzgestressten Kulturen mit niedrigen pH-Werten zu einer gesteigerten Acetonproduktion kommt. Eine interessante Besonderheit, die ebenfalls einen Beitrag zur Acetonproduktion liefern könnte, ist die nicht-enzymatische Decarboxylierung von Acetoacetat (Han *et al.* 2011). Bei der Untersuchung von Adc-negativen Mutanten von *C. beijerinckii* konnten Han *et al.* (2011) trotzdem eine annähernd wildtypische Acetonproduktion beobachten. Daher untersuchten sie die Decarboxylierung von Acetoacetat auf nicht-enzymatischem Weg unter Fermentationsbedingungen und konnten zeigen, dass bei sauren pH-Werten bis zu 86 mM Aceton innerhalb von 72 h erzeugt wurden (Han *et al.* 2011). Die nicht-enzymatische Decarboxylierung von Acetoacetat kann folglich vor allem bei Langzeitkultivierungen unter niedrigen pH-Werten (Abbildung 4.4) einen nicht zu vernachlässigenden Teil zur Acetonkonzentration beisteuern.

Eine weitere interessante Beobachtung der Langzeitkultivierung ist die Zunahme der biomassespezifischen Produktivität bei 400 und 500 mM NaCl. Diese erreicht nach 443 h sogar ein ähnliches Level wie bei 300 mM NaCl (Abbildung 4.4). Trotz der Nutzung von Komplexmedium weisen auch neuere Studien (Zhao *et al.* 2016) darauf hin, dass die Schwellenwertkonzentration von NaCl im Medium bei ca. 200 mM liegt. Sowohl *C. beijerinckii* als auch *C. acetobutylicum*

zeigten laut Literatur keine negativen Effekte hinsichtlich der biomassespezifischen Produktivität bis zu dieser NaCl-Konzentration (Qureshi *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2016). In der Veröffentlichung von Zhao *et al.* (2016) werden die maximalen spezifischen Produktivitäten verglichen. Betrachtet man die in dieser Arbeit beobachteten maximalen Produktivitäten unter Salzstress, können Übereinstimmungen zu den Literaturwerten erkannt werden (Abbildung 5.1).

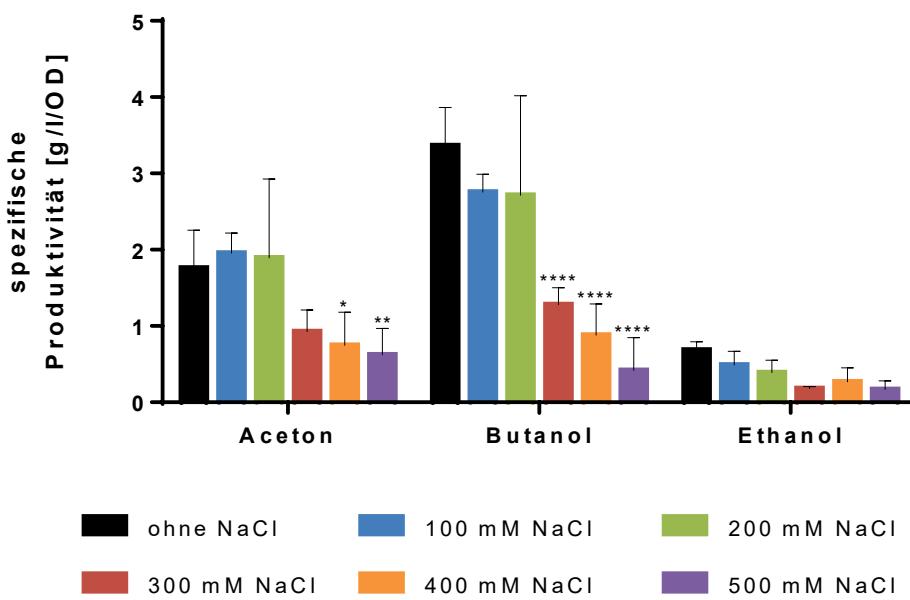


Abbildung 5.1 - Maximale spezifische Produktivitäten von *C. acetobutylicum* bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

Die Berechnung der maximalen spezifischen Produktivitäten erfolgte wie bei Zhao *et al.* (2016) beschrieben. $n = 4$, Dunnett's multiple comparison (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

So ist erst bei 300 mM NaCl im Medium ein signifikanter Rückgang der maximalen spezifischen Produktivitäten zu erkennen. Zhao postulieren, dass die relativ konstanten spezifischen Lösungsmittelproduktivitäten bei niedrigen Salzkonzentrationen auf das NADP⁺/NADPH-Verhältnis zurückzuführen sind. Sie konnten nachweisen, dass sowohl bei salzgestressten als auch ungestressten Zellen dieses Verhältnis über den gesamten Wachstumsverlauf unverändert war. Bei *C. acetobutylicum* sind NADP⁺/NADPH vor allem an der Lösungsmittelbildung beteiligt und steuern enzymatische Reaktionen wie z. B. die der Acetaldehyd-Dehydrogenase, Butyraldehyd-Dehydrogenase, Ethanol-Dehydrogenase und Butanol-Dehydrogenase (Liu *et al.* 2013). Die konstanten biomassespezifischen Lösungsmittelproduktivitäten bei geringen Salzkonzentrationen lassen den Schluss zu, dass die Verringerung der Lösungsmittelausbeute teilweise auch auf den Rückgang der Biomasse unter Salzstress zurückzuführen ist. Ein Hinweis darauf bietet die Kultivierung von *C. acetobutylicum* bei 200 mM NaCl (Abbildung 4.1). Die maximale spezifische Produktivität, verglichen mit 300 mM NaCl (Abbildung 5.1) ist dort vermutlich auf die starke Zunahme der Lösungsmittelkonzentration in der Kultivierungszeit von 80 h bis 90 h zurückzuführen (Abbildung 4.2). Zu dieser Zeit des Wachstums bei 200 mM NaCl ist auch ein erneuter Anstieg der OD und des pH-Wertes zu beobachten (Abbildung 4.1). Durch die Zunahme

der Biomasse bei gleicher spezifischer Produktivität kommt es folglich auch zur erhöhten Lösungsmittel-bildung. Warum es gerade nach 80 h zu einer Art Wachstumsschub kam, ist schwer nachzuvollziehen. Anscheinend kam es zuerst zur Lyse der Zellen, da ab ca. 24 h die OD der Kultur zu sinken begann. Ein Grund für die auftretende Zellyse bei der Kultivierung mit 200 mM Salzstress könnte der sehr niedrige pH-Wert nach 24 h Wachstum sein (Abbildung 4.1). Im Vergleich zu den anderen Kulturen erreichte die Kultivierung mit 200 mM NaCl den niedrigsten pH-Wert (unter 4,5) und lag damit in einem kritischen Bereich. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (2.3.1), können ab diesem Wert die undissoziierten Säuren im Medium ungehindert durch die Zellmembran in das Zytoplasma zurückdiffundieren und zum Zusammenbruch des transmembranen Protonengradienten führen (Dürre 2011). Die Lyse der Zellen und der Rückgang der OD nach 24 h ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen. Nach 80 h stieg der pH-Wert wieder über 4,5 und begünstigte damit das erneute Wachstum. In der Literatur ist dieses Wachstumsverhalten bei *C. acetobutylicum* unter 200 mM NaCl-Stress bisher nicht beschrieben. Allerdings zeigte sich bei *C. ljungdahlii* unter NaCl-stress ein ähnliches Muster (Philips *et al.* 2017), wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie in dieser Arbeit. Auch bei der Kultivierung von *C. acetobutylicum* mit 300 mM NaCl konnte die nach ca. 80 h beobachtet werden, wobei die Zunahme der OD und der Lösungsmittel nicht so stark war wie bei 200 mM NaCl (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3). Außerdem ging hier dem Anstieg keine sichtbare Zellyse voraus, da die OD zwischen 30 h und 80 h Inkubationsdauer konstant blieb. Möglicherweise ist der Rückgang der OD auch auf eine spontane Autolyse zurückzuführen. Dieses Phänomen kann häufig bei Batch-Kultivierungen von *C. acetobutylicum* beobachtet werden und äußert sich in einem drastischen Rückgang der OD kurz nach Erreichen der stationären Phase (Croux *et al.* 1992; Liu *et al.* 2015). Die dafür verantwortlichen Enzyme, die Autolysine, können die Zellwand von Bakterien abbauen und Regulieren damit u.a. das Zellwachstum, den Peptidoglykanumsatz, oder die Biofilmbildung (Vollmer *et al.* 2008). Auch in *C. acetobutylicum* sind diese Proteine untersucht und beschrieben worden (Croux *et al.* 1992; Liu *et al.* 2015). Liu *et al.* (2015) konnten dabei zeigen, dass die spontane Massenautolyse selektiv nur bei den Zellen einsetzt, die metabolisch inaktiv sind. Sie spekulieren, dass metabolisch inaktive Zellen durch Autolysine lysiert werden, um deren Nährstoffe für aktive Zellen freizusetzen. Vor allem die von den lysierten Zellen freigesetzten Aminosäuren und Zucker könnten dabei einen positiven Effekt auf das Wachstum unter Salzstress haben, indem sie als kompatible Solute genutzt werden (Empadinhas und da Costa 2008).

5.2 Die Rolle von kompatiblen Soluten bei der Salzstressreaktion

Mikroorganismen reagieren auf osmotischen Stress hauptsächlich durch die Akkumulation osmotisch aktiver Stoffe, entweder durch Aufnahme aus dem Medium oder durch Neusynthese. Diese niedermolekularen, organischen kompatiblen Solute sind in der Lage, den externen osmotischen Druck auszugleichen, der sonst zur Dehydrierung, zum Verlust des Zellturgors und folglich zum Zelltod führen könnte (Taiz 1984; Whatmore und Reed 1990; Rojas *et al.* 2017). Als kompatible Solute werden vor allem Zucker, Polyole und Aminosäuren genutzt. Da ihre

Neusynthese in der Regel energieaufwändig ist und unter Stressbedingungen die Energie vermehrt für Reparaturmechanismen eingesetzt werden muss (Hoffmann und Bremer 2016), wird die Aufnahme aus der Umwelt bevorzugt. Dort können kompatible Solute beim Absterben von Organismen oder bei Ausflussprozessen freigesetzt werden, wodurch sie zugänglich werden und über hochaffine Transportsysteme in die Zelle aufgenommen werden können (Empadinhas und da Costa 2008). Bei *C. acetobutylicum* ist noch nichts über die Nutzung von kompatiblen Soluten unter Salzstress bekannt. Dementsprechend galt es herauszufinden, welche Stoffe einen positiven Effekt auf das Wachstum haben und ob sich diese auch positiv auf die ABE-Fermentation unter Salzstress auswirken. Weiterhin sollte die intrazelluläre Aminosäurezusammensetzung von *C. acetobutylicum* und deren Veränderung unter dem Einfluss von NaCl Aufschluss über die vorrangig akkumulierten kompatiblen Solute geben.

Mittels HPLC-Analysen konnte der Aminosäurepool von *C. acetobutylicum* unter normalen Bedingungen, sowie unter verschiedenen Salzkonzentrationen, betrachtet werden. Den größten Teil dieses Pools nahmen Alanin und Glutamat ein, wobei der Anteil an Glutamat mit zunehmendem Salzstress sukzessive anstieg (Abbildung 4.5). Diese Beobachtung deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Salzstressanpassung anderer Bakterien (Empadinhas und da Costa 2008).

Als erster Schritt in der Salzstressantwort wird Kalium akkumuliert, um den Einstrom von Natriumionen entgegenzuwirken (Booth und Higgins 1990; Whatmore und Reed 1990; Hoffmann und Bremer 2016). Die daraus resultierende überschüssige positive Ladung wird in der Regel nicht mit Chlorid ausgeglichen, wie es z. B. bei extrem halophilen Organismen der Fall ist. Stattdessen erfolgt der Ausgleich fast vollständig durch organische Anionen wie z. B. Glutamat (Booth und Higgins 1990), was den Anstieg der Konzentration dieser Aminosäure unter Salzstress erklärt. Der hohe Grundanteil dieser Aminosäure am Pool, auch unter normalen Wachstumsbedingungen, ist wahrscheinlich auf die Rolle von Glutamat als Stickstoffquelle zurückzuführen (Amador-Noguez *et al.* 2011). So nimmt Glutamat z. B. bei ungestressten *B. subtilis*-Zellen bis zu 75 % des Aminosäurepools ein (Whatmore *et al.* 1990). Auch *C. acetobutylicum* kann in der exponentiellen Wachstumsphase Glutamat bis zu 35 % ausmachen. Im Verlauf des Wachstums wird Glutamat dann sukzessive durch Alanin ersetzt (Amador-Noguez *et al.* 2011). Beim Modellorganismus *B. subtilis* zeigte sich, dass bei geringem Salzstress (200 mM NaCl) die Akkumulation von Kaliumionen ausreicht, um den Turgor wiederherzustellen. Dementsprechend konnte bei dieser Salzkonzentration keine Erhöhung der kompatiblen Solute detektiert werden, jedoch eine signifikante Erhöhung der Kaliumkonzentration (Whatmore *et al.* 1990). Das würde erklären, warum bei *C. acetobutylicum* die Glutamatkonzentration erst ab 300 mM NaCl merklich ansteigt (Abbildung 4.5). Für die Akkumulation von Kaliumionen stehen *C. acetobutylicum* zwei Transportsysteme zur Verfügung (Treuner-Lange und Dürre 2005). Zum einen den KcsA-Kanal, welcher sich durch Kaliumselektivität und einen pH-abhängigen Transport auszeichnet. Zum anderen das Kdp-System, welches als Hauptsystem für die Kalium-Akkumulation in *C. acetobutylicum* unter Osmostress gilt (Treuner-Lange *et al.* 1997). Die Inaktivierung des Kdp-Systems von *C. acetobutylicum* resultierte in vermindertem Wachstum unter Salzstress, was die Rolle dieses Systems in der initialen Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* unterstreicht (Potratz

2017). In dieser Arbeit zeigten der Wildtyp und die Insertionsmutante im Transkriptom jedoch verringerte Transkriptlevel der Gene für die Kaliumaufnahme. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Kaliumakkumulation der erste unmittelbare Schritt in der Salzstressantwort ist. Innerhalb der ersten Stunden unter Salzstress wird Kalium aufgenommen, nach 3-4 h wird dieses allerdings durch andere kompatible Solute ersetzt (Whatmore *et al.* 1990; Kempf und Bremer 1998). Die verminderten Transkriptlevel lassen sich daher durch die bereits abgeschlossene Kaliumakkumulation erklären, da das Transkriptom erst nach ca. 13 h Wachstum unter Salzstress bestimmt wurde (3.7.4). Die Kaliumaufnahme war zu dem Zeitpunkt schon abgeschlossen zugunsten der Akkumulation von kompatiblen Soluten.

Die Aminosäure Alanin nimmt einen großen Teil des Aminosäurepools von *C. acetobutylicum* ein. Die Nutzung von Alanin als kompatibles Solut ist eher ungewöhnlich, jedoch konnte die schützende Wirkung vor Salzstress schon bei einigen Organismen dokumentiert werden (Killham und Firestone 1984; Shahjee *et al.* 2002; Saum *et al.* 2009; Chun *et al.* 2012; Saum *et al.* 2013). Obwohl der Aminosäurepool von *C. acetobutylicum* zu einem großen Teil aus Alanin besteht (bis zu 36 %), ist die Nutzung dieser Substanz als kompatibles Solut zur Salzstressabwehr eher unwahrscheinlich. Zwar ist ein Anstieg des Alaninanteils im Pool bis zu einer Salzkonzentration von 300 mM zu erkennen, bei 400 mM und 500 mM NaCl liegt er jedoch unter 20 % (Abbildung 4.5). Alanin ist eher mit dem zellulären Primärstoffwechsel assoziiert und beeinflusst das Zellwachstum (Liu *et al.* 2016a). Es konnte allerdings auch schon gezeigt werden, dass Alanin von *C. acetobutylicum* unter Butanolstress akkumuliert wird, wobei der metabolische Hintergrund noch nicht eingehend geklärt ist (Wang *et al.* 2016).

5.2.1 Prolin und GB in der Salzstressantwort von *C. acetobutylicum*

Die prominentesten Vertreter unter den kompatiblen Soluten sind Prolin und GB. Beide Stoffe können in sehr hohen Konzentrationen akkumuliert werden, ohne sich negativ auf den Metabolismus auszuwirken. (Empadinhas und da Costa 2008; Hoffmann und Bremer 2011). Der Modellorganismus *B. subtilis* nutzt z. B. statt Glutamat Prolin als osmotische Schutzsubstanz und kann bei 400 mM NaCl-Stress bis zu 700 mM Prolin akkumulieren, was 80 % seines Aminosäurepools ausmacht (Whatmore *et al.* 1990). Dabei ist Prolin das einzige kompatible Solut, welches *B. subtilis* *de novo* synthetisieren kann. Zwar sind Enzyme für die Oxidation von Cholin zu GB vorhanden, jedoch kann *B. subtilis* selbst kein Cholin synthetisieren und muss es erst aus der Umwelt aufnehmen (Whatmore *et al.* 1990; Boch *et al.* 1994; Hoffmann und Bremer 2016). Die Nutzung und Akkumulation der beiden beschriebenen kompatiblen Solute unter Salzstress sollte auch für *C. acetobutylicum* überprüft werden. Dafür wurde der Prolin- und GB-Gehalt der Zellen über ein photometrisches Assay bestimmt (3.6.3, 3.6.4). Wie erwartet, war *B. subtilis* in der Lage unter Salzstress hohe Mengen an Prolin zu akkumulieren, jedoch konnten bei *C. acetobutylicum* nur sehr geringe Prolinkonzentrationen detektiert werden (Abbildung 4.6). Beim Vergleich in der Literatur beschriebener Werte zeigt sich, dass unter normalen Wachstumsbedingungen in Minimalmedium *B. subtilis* im Vergleich zu *C. acetobutylicum* eine 16-fach höhere Prolinkonzentration im Aminosäurepool aufweist (Whatmore *et al.* 1990; Amador-Noguez *et al.* 2011;

Brill *et al.* 2011). In dieser Arbeit konnten ähnliche Verhältnisse nachgewiesen werden, wobei hier *B. subtilis* nur etwa das Sechsfache an Prolin akkumulierte, verglichen mit *C. acetobutylicum*. Wird *B. subtilis* 300 mM NaCl Stress ausgesetzt, so kann der intrazelluläre Prolingehalt um das Acht- bis Zehnfache zunehmen (Brill *et al.* 2011; Hoffmann *et al.* 2013). Hinsichtlich der Aminosäuregehalte von *C. acetobutylicum* unter Salzstress gibt es bisher noch keine Studien. Die hier generierten Ergebnisse lassen aber darauf schließen, dass *C. acetobutylicum* Prolin als kompatibles Solut zumindest nicht durch *de novo*-Synthese akkumuliert.

Hinsichtlich der Nutzung von GB als osmotische Schutzsubstanz ist *B. subtilis* gut untersucht, bei *C. acetobutylicum* ist jedoch noch nichts darüber bekannt. Wie bereits erwähnt, kann *B. subtilis* GB nur akkumulieren, wenn es selbst oder seine Vorläufermoleküle im Medium vorhanden sind. Wenn *B. subtilis* GB zur Verfügung steht, kann es über spezifische Transporter aufgenommen werden und erreicht eine hohe Grundkonzentration von 160 mM. Wird *B. subtilis* zusätzlich 300 mM NaCl-Stress ausgesetzt, steigt der GB-Gehalt weiter an auf etwa 280 mM (Hoffmann *et al.* 2013; Hoffmann und Bremer 2016). Auch in den hier durchgeführten Experimenten mit *C. acetobutylicum* konnte ein ähnliches Verhalten beobachtet werden (Abbildung 4.6). Ebenfalls trat die Akkumulation erst auf, wenn dem Medium extern GB zugesetzt wurde. Für *C. acetobutylicum* konnte demnach die Aufnahme und Akkumulation von GB in dieser Arbeit bestätigt werden. Dabei waren die Grundkonzentration und diejenige unter Salzstress jedoch wesentlich geringer als bei *B. subtilis*. Die hier generierten Ergebnisse unterstreichen den Status von GB als universelles kompatibles Solut, das von Bakterien und Archaeen bis zu Algen und halotoleranten Pflanzen zur Salzstressabwehr genutzt wird (Empadinhas und da Costa 2008; Hagemann 2011; Hoffmann *et al.* 2013).

GB kann neben der Schutzfunktion auch als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, sowie als Methylgruppendonator eine Rolle spielen (Möller *et al.* 1986; Hoffmann und Bremer 2011; Wargo 2013; Zou *et al.* 2016). Dementsprechend ermöglichte eine Betrachtung des Wachstumsverhaltens von *C. acetobutylicum* unter der Zugabe von GB weitere Einblicke hinsichtlich seiner protektiven Wirkung. Außerdem bietet das Wissen über den Aminosäurepool unter Salzstress (Abbildung 4.5) die Möglichkeit, ausgewählte Osmolyte zu supplementieren und so möglicherweise die Salzstresstoleranz zu erhöhen. Von zahlreichen Aminosäuren und kompatiblen Soluten ist zudem bekannt, dass sie eine protektive Wirkung hinsichtlich verschiedenster Stressoren zeigen oder wachstumsfördernde Eigenschaften aufweisen (Masion *et al.* 1987; Hoffmann und Bremer 2011; Zaprasis *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016a). Daher wurden in dieser Arbeit Supplementierungsexperimente mit verschiedensten Aminosäuren und kompatiblen Soluten durchgeführt, um die ABE-Fermentation und das Wachstum von *C. acetobutylicum* unter Salzstress zu fördern (4.2.2, Abbildung 7.1. Anhang). Trotz der Nutzung einer breiten Auswahl an Aminosäuren, deren Vorläufermolekülen sowie den Zuckern Trehalose und Saccharose, zeigte sich nur bei zwei untersuchten Stoffen eine positive Auswirkung auf *C. acetobutylicum* unter Salzstress (Abbildung 4.8). Die Zugabe von GB resultierte in einer höheren Wachstumsrate, hatte aber keinen Einfluss auf die gebildeten Lösungsmittel. Die Supplementierung mit Arginin zeigte zwar keine Auswirkungen auf das Wachstum, erhöhte jedoch die Ausbeute an

Lösungsmitteln signifikant. Auch die spezifische Produktivität war unter Arginin-Zugabe erhöht (Abbildung 7.1. C, Anhang). Den größten Effekt zeigte GB bei höheren Salzkonzentrationen. So konnte die Zugabe von 1 mM GB zu Medium mit 500 mM NaCl die Wachstumsrate von *C. acetobutylicum* um das Achtfache steigern (Abbildung 4.9, A). Dies unterstreicht noch einmal die wichtige Rolle von GB unter Salzstressbedingungen (da Costa *et al.* 1998; Hoffmann und Bremer 2011; Klähn und Hagemann 2011) und es ist interessant, dass auch *C. acetobutylicum* in der Lage ist, davon zu profitieren. Wie bereits erwähnt besitzt *B. subtilis* Enzyme, um aus Cholin GB selbst zu synthetisieren (Boch *et al.* 1994; Hoffmann und Bremer 2016) und die Supplementation mit Cholin resultiert in erhöhter Salztoleranz (Hoffmann und Bremer 2011). Für *C. acetobutylicum* konnte dieses Phänomen nicht bestätigt werden, da die Zugabe von 1 mM Cholin zum salzhaltigen Wachstumsmedium keinerlei Effekt zeigte (Abbildung 4.8). Dies deckt sich mit *in silico*-Analysen, denn in *C. acetobutylicum* sind die entsprechenden Enzyme zur Synthese von GB aus Cholin nicht annotiert und es existieren auch keine homologen Gensequenzen. Auch die Fütterung mit externem Prolin resultierte in keiner Steigerung des Wachstums und der Fermentation (Abbildung 4.8). Dass Prolin trotzdem von *C. acetobutylicum* aufgenommen werden kann und auch als Schutzsubstanz agiert, konnte allerdings schon beobachtet werden (Driessen *et al.* 1988; Liao *et al.* 2019a). Da *C. acetobutylicum* für Prolin jedoch nur eine geringe Aufnahmefähigkeit zeigt (Driessen *et al.* 1988), muss eventuell mit höheren Konzentrationen als 1 mM supplementiert werden um Effekte zu erzielen. Neuste Studien zeigten, dass die Zugabe von ca. 17 mM exogenem Prolin die Toleranz von *C. acetobutylicum* gegenüber Inhibitoren auf Lignocellulose-Basis wirksam verbessern kann und gleichzeitig das Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) niedrig hält (Liao *et al.* 2019a). Auch die Zunahme des Prolingehalts unter Butanolstress konnte bei *C. acetobutylicum* bereits beobachtet werden (Wang *et al.* 2016). Da Prolin erwiesenermaßen zur Verbesserung der Toleranz gegenüber osmotischem, oxidativem und Butanolstress beitragen kann (Takagi 2008; Mahipant *et al.* 2017; Wang *et al.* 2016; Liao *et al.* 2019a), ist es nicht auszuschließen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Prolinkonzentration auch zu einer verbesserten Salztoleranz bei *C. acetobutylicum* führt.

GB kann von einigen Mikroorganismen auch als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle genutzt werden (Möller *et al.* 1986; Wargo 2013; Zou *et al.* 2016). Daher galt es zu überprüfen, ob *C. acetobutylicum* GB ebenfalls anderweitig verwerten kann. Dafür erfolgte die Kultivierung in Minimalmedium, dem statt 60 g/l Glukose 30 g/l GB zugesetzt wurden (Abbildung 4.11). Die generierten Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass *C. acetobutylicum* in diesem Medium in der Lage ist zu wachsen. Zwar konnte keine Lösungsmittelproduktion beobachtet werden, die Synthese von Butyrat und Acetat fand jedoch statt. Wahrscheinlich ist das Wachstum in diesem Fall auf Acetat zurückzuführen, da der Abbau von GB durch *C. acetobutylicum* bisher nicht beobachtet wurde (Möller *et al.* 1986). Allerdings stellt sich die Frage, wie unter diesen Bedingungen Reduktionsäquivalente generiert werden, wenn diese nicht durch die Glycolyse bereitgestellt werden können. Einen möglichen Erklärungsansatz könnte hier die erst seit kurzem in *C. acetobutylicum* detaillierter untersuchte [NiFe]-Hydrogenase (*cap0143-46*) bieten (Germane *et al.* 2018). Ursprünglich wurde diese Hydrogenase in die Gruppe der

membranassoziierten Hydrogenasen zur Wasserstoffsaufnahme (Gruppe 1) eingeordnet. [NiFe]-Hydrogenasen dieser Gruppe verbindet die H₂-Oxidation mit der Energiegewinnung über den Protonengradienten (Vignais 2008; Calusinska *et al.* 2010). Neueste Studien von Germane *et al.* (2018) zeigten allerdings, dass die [NiFe]-Hydrogenase von *C. acetobutylicum* nicht nur die H₂-Oxidation mit Elektronentransport verbindet, sondern auch in der Lage ist, diese an eine intrazelluläre NAD⁺-Reduktion zu koppeln. Demnach könnte diese Hydrogenase bei der NADH-Bildung beim Wachstum auf Acetat eine Rolle spielen, jedoch müssten weitere Arbeiten die Funktion von GB unter diesen Wachstumsbedingungen untersuchen.

5.2.2 Arginin als Schutzsubstanz unter Stresseinwirkung

Im Vergleich zu GB zeigte die Zugabe von Arginin nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum und die Biomassebildung unter Salzstress (Abbildung 4.8, Abbildung 4.9, B). Die Lösungsmittelproduktion bei 300 mM NaCl wies jedoch eine signifikante Steigerung von bis zu 50 % auf (Abbildung 4.10, C). Auch die spezifische Produktivität konnte mehr als verdoppelt werden. Diese drastischen Veränderungen durch eine Arginin-supplementierung können mehrere Ursachen haben. Es ist bekannt, dass die Argininbiosynthese und der -transport unter verschiedenen Stressbedingungen eine wichtige Rolle spielen (Xu *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013; Zaprasis *et al.* 2015; Gundlach *et al.* 2018). So konnten Gundlach *et al.* (2018) zeigen, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von positiv geladenen Aminosäuren das Wachstum von *B. subtilis* unter extremer Kaliumlimitierung ermöglichen kann. Dies konnte zum einen bei der externen Zugabe von Arginin und zum anderen bei der Erhöhung der Argininbiosyntheseaktivität beobachtet werden. Arginin ist somit in der Lage, die zelluläre Funktion von Kalium, wie z. B. die Pufferung der negativen Ladung von Nukleinsäuren, zumindest teilweise zu ersetzen. Kalium nimmt auch in der Salzstressantwort eine wichtige Rolle ein und wird im ersten Schritt vermehrt akkumuliert, um den Zellturgor zu erhalten (Whatmore *et al.* 1990; Gundlach *et al.* 2018). Bei der Hefe *Candida glabrata* konnte sogar eine Präferenz für Arginin gegenüber Prolin als kompatibles Solut unter Salzstress beobachtet werden (Xu *et al.* 2011). Folglich könnte Arginin bei *C. acetobutylicum* ebenfalls eine Schutzfunktion übernehmen und die externe Zugabe von Arginin zu salzhaltigem Medium den Bakterien einen Vorteil verschaffen.

Auch die Schutzwirkung von Arginin gegen Säure- und Lösungsmittelstress ist untersucht und bestätigt worden (Wang *et al.* 2013; Cheng *et al.* 2016). So konnte bei *C. acetobutylicum* eine verstärkte Expression der Argininbiosynthese- und -transportgene, sowohl unter Butyrat, als auch unter Butanolstress beobachtet werden (Wang *et al.* 2013). Dabei scheint Arginin auch bei der Aufrechterhaltung der Zellwand- und Plasmamembranintegrität eine gewisse Rolle zu spielen, da es durch eine spezifische Molekularstruktur und viele Wasserstoffbrückenbindungen einen wirksamen Schutz für Proteine, DNA und Phospholipide vermittelt (Morita *et al.* 2002; Cheng *et al.* 2016). Ein Grund für auftretende Zellschäden bei Lösungsmittelstress sind vor allem die Bildung von ROS (Cheng *et al.* 2016; Liao *et al.* 2019a) und Arginin besitzt exzellente antioxidative Eigenschaften (Lass *et al.* 2002). Auch Salzstress hat Auswirkungen auf die

Eigenschaften der Zellwand und Zytoplasmamembran und kann so zu oxidativem Stress führen (Petersohn *et al.* 2001; Steil *et al.* 2003; Weber *et al.* 2006; Wood 2011). Zusätzlich konnte bei *C. acetobutylicum* gezeigt werden, dass die an der ROS-Entgiftung beteiligten Rubrerythrine nicht nur unter oxidativem, sondern auch unter Salzstress verstärkte Transkriptlevel aufweisen, was auf eine Verknüpfung der beiden Stressantworten hindeutet (Hillmann *et al.* 2006; Riebe *et al.* 2009). Dementsprechend vermittelt Arginin bei *C. acetobutylicum* möglicherweise nicht nur einen besseren Schutz vor den Auswirkungen von Salzstress, sondern hilft zusätzlich beim Abbau des durch die ABE-Fermentation auftretenden Metabolitstresses (Alsaker *et al.* 2010; Venkataraman *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016).

Da die Supplementierung mit Arginin hinsichtlich der Lösungsmittelbildung unter Salzstress die besten Ergebnisse erzielte (Abbildung 4.8), sollte der Einfluss dieser Aminosäure auf den Metabolismus und die Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* genauer untersucht werden.

5.3 Die Rolle der Arginin-Biosynthese in der Salzstressantwort von *C. acetobutylicum*

Die Arginin-Biosynthese besteht aus acht enzymatischen Schritten ausgehend von Glutamat. Die so genannten „Recyclingform“ der Arginin-Biosynthese, wie sie auch von *C. acetobutylicum* genutzt wird, ist gekennzeichnet durch eine bifunktionale Ornithin-Acetyltransferase (*argJ*), die Reaktion von N-Acetylornithin zu Ornithin katalysiert (Abbildung 5.2, Seite 90). Wenn das Verhältnis von Glutamat zu Ornithin im intrazellulären Aminosäurepool kleiner als drei ist, kann die Arginin-Biosynthese auch rückwärts ablaufen und so zur Glutamatproduktion beitragen (Senger und Papoutsakis 2008). Der Hauptregulator der Biosynthese, des Transports und des Katabolismus von Arginin in Bakterien ist der Arginin-Repressor (*ArgR*), welcher in *C. acetobutylicum* von dem Gen *cac2074* kodiert wird. Dieser bindet an spezifische Erkennungssequenzen, den ARG-Boxen, die vermehrt in den *upstream*-Regionen der entsprechenden Operone zu finden sind. Das Regulon von *ArgR* besteht in *C. acetobutylicum* aus 17 Genen, welche in neun Operonen organisiert sind (<http://regprecise.lbl.gov>, Makarova *et al.* 2001, Tabelle 1).

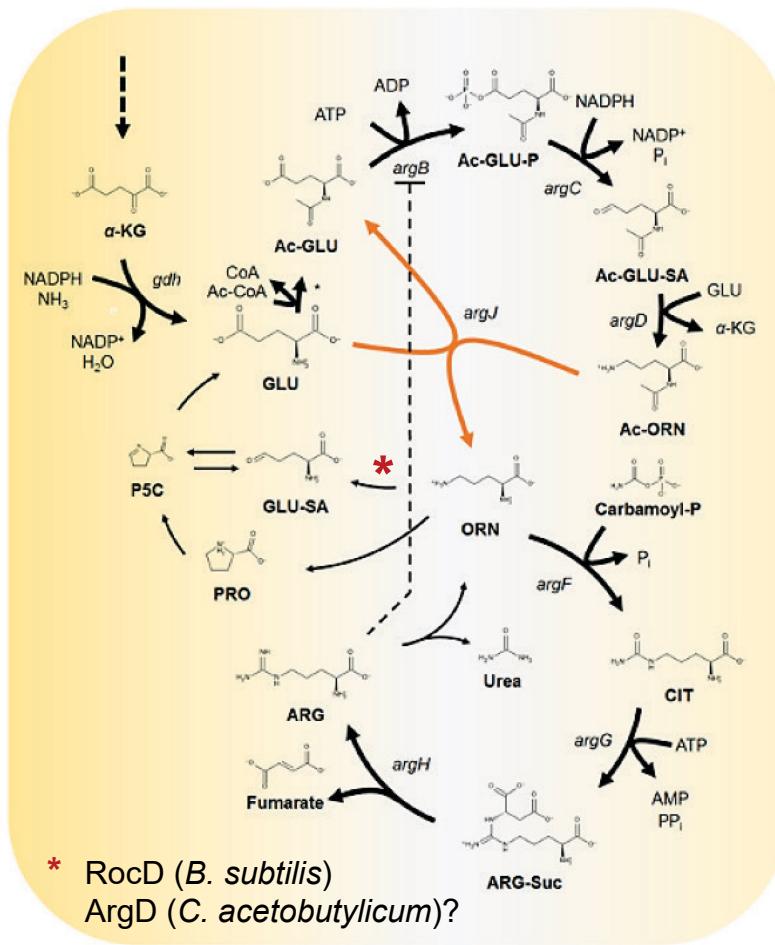


Abbildung 5.2 - Die „Recyclingform“ der Arginin-Biosynthese (Shin und Lee 2014, mod.).

Ac-GLU, N-Acetylglutamat; Ac-GLU-P, N-Acetylglutamyl-5-phosphat; Ac-GLU-SA, N-Acetylglutamate-5-Semialdehyd; ARG-Suc, L-Argininosuccinat; GLU-SA, L-Glutamat-5-Semialdehyd; P5C, 1-Pyrrolin-5-Carboxylat.

Da die Supplementation mit Arginin in einer gesteigerten Lösungsmittelbildung unter Salzstress resultierte (Abbildung 4.8), sollte *C. acetobutylicum* mittels *metabolic engineering* zu einer Überproduktion von Arginin modifiziert werden. Zahlreiche Ansatzpunkte dafür sind bereits in anderen Mikroorganismen untersucht und beschrieben worden (Shin und Lee 2014). In dieser Arbeit umfasste die gewählte Strategie die Inaktivierung des Repressors ArgR durch das Clostron® Insertionsmutagenesesystem (Heap *et al.* 2007). In der Theorie führt der Wegfall des Repressor zu einer verstärkten Expression der Arginin-Biosynthesegene, sowie zu einer Erhöhung des Carbamoylphosphat-Pools, durch die vermehrte Expression des *carAB*-Operons (Shin und Lee 2014). Die Inaktivierung von ArgR erfolgte durch die Insertion eines Gruppe-II-Introns in den Leserahmen des kodierenden Gens *cac2074*. Durch die Integration kommt es zu einer Unterbrechung und Verschiebung des Leserahmens, wodurch die Bildung funktionstüchtiger Proteine in der Regel nicht mehr möglich ist (Heap *et al.* 2007). Nach der Verifizierung der konstruierten Mutanten folgte die physiologische Charakterisierung durch Wachstumsversuche in Minimalmedium, mit oder ohne Zugabe von 300 mM NaCl als Stressor (Abbildung 4.19). In salzfreiem Medium zeigte die Insertionsmutante ein ähnliches Wachstum wie der Wildtyp,

allerdings nahm die OD nach ca. 48 h stark ab. Bei 300 mM NaCl-Zugabe war ein verbessertes Wachstum der Insertionsmutante zu erkennen und das Absinken der OD fiel weniger drastisch aus. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpressionsmutante ein schlechteres Wachstum, sowohl in salzfreiem Medium als auch unter NaCl-Stress.

5.3.1 Inaktivierung von ArgR hat Einfluss auf die Biofilm-Bildung

Das starke Absinken der OD bei der Insertionsmutante ist auf andere Mechanismen zurückzuführen, als der OD-Rückgang beim Wildtyp unter 200 mM NaCl-Stress. So konnte bei der Insertionsmutante nach 48 h ein *clumping*-Effekt beobachtet werden, bei dem große Schleimablagerungen am Boden und an den Wänden der Kulturgefäße zu erkennen waren (Abbildung 4.25). Ein Ausstreichen dieses Schleims auf CGM-Agar resultierte im Wachstum zahlreicher Kolonien (Daten nicht gezeigt), was auf die Vitalität der Zellen im Schleim hinweist. Auch die Koloniemorphologie der Insertionsmutante unterschied sich deutlich von der des Wildtyps (Abbildung 4.25). Diese Art der Koloniemorphologie ist bei *C. acetobutylicum* bisher noch nicht beschrieben. Allerdings sind Ähnlichkeiten des hier beobachteten kristallinen Kanalgeflechts der Insertionsmutante mit der Biofilmbildung von *B. subtilis* zu erkennen (Branda *et al.* 2001; Oppenheimer-Shaanan *et al.* 2016; Yan *et al.* 2016). Biofilme sind Bakterienpopulationen, die von einer Matrix umschlossen sind und aneinander und/oder an Oberflächen bzw. Grenzflächen haften (Costerton *et al.* 1995). Die Matrix besteht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), hauptsächlich Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren und Lipide, welche die Zellen vor Umwelteinflüssen schützt (Costerton *et al.* 1995; Abee *et al.* 2011). Auch von *C. acetobutylicum* ist bekannt, dass es in der Lage ist, Biofilme zu bilden (Zhuang *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018) und vor allem unter Butanolstress vermehrt EPS produziert (Liu *et al.* 2016b; Wallenius *et al.* 2016). Dabei besteht die EPS von *C. acetobutylicum* zum Großteil aus Heteropolysacchariden, zusammengesetzt aus Rhamnose-, Glukose- und Mannoseeinheiten (Wallenius *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018). Des Weiteren wurde eine große Vielfalt von Proteinen identifiziert, die möglicherweise als Adhäsine fungieren und die Interaktion mit der Umwelt ermöglichen (Liu *et al.* 2018). Vor allem die hier generierte Insertionsmutante zeigte eine erhöhte Schleimproduktion, die auf eine verstärkte EPS-Bildung schließen lässt. Diese Vermutung wird durch die Transkriptomdaten bestätigt (4.4.2), denn neben zahlreichen Glycosyltransferasen ist vor allem die Betamannanase (*cac0332*), ein Enzym des Mannosemetabolismus, unter den Genen mit der stärksten Transkripterhöhung. Auch der Wildtyp zeigte unter Salzstress erhöhte Transkriptlevel der biofilmrelevanten Gene (Abbildung 7.12, Anhang). Dazu zählten neben zellwandorganisierenden Enzymen auch Gene, die mit *Quorum sensing* bzw. Adhäsion verbunden sind. Während Gene für die Pilin-Synthese verminderte Transkriptlevel zeigten, waren die der Flagellengene erhöht, sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Insertionsmutante. Beide Oberflächenstrukturen können an der Biofilmbildung beteiligt sein, indem sie die Anheftung an Oberflächen unterstützen, oder die Rekrutierung von planktonischen Zellen in den bestehenden Biofilm ermöglichen. Welche Strukturen dabei vorrangig zum Einsatz kommen, scheint zum einen

Organismen- zum anderen aber auch Oberflächenspezifisch zu sein (Houry *et al.* 2010; Abee *et al.* 2011; Philips *et al.* 2017; Liu *et al.* 2018). Allgemein zeigte sich jedoch ein Vorteil von Flagellen bei der Biofilmbildung in statischen Kulturen (Houry *et al.* 2010), was mit den hier generierten Ergebnissen übereinstimmt. Inwiefern die Biofilmbildung von *C. acetobutylicum* eine direkte Schutzreaktion auf die erhöhten Salzkonzentrationen ist, bleibt zu diskutieren. Zumindest scheint die Salzstressantwort z. B. bei *B. subtilis* oder *C. ljungdahlii* teilweise mit der Biofilmbildung co-reguliert zu sein (Winkelmann *et al.* 2013; Hoffmann und Bremer 2016; Philips *et al.* 2017). Winkelmann *et al.* (2013) gehen allerdings davon aus, dass schon die Biofilmbildung allein die Zellen unter osmotischen Stress setzt, aufgrund der vermehrten Bildung der EPS, und daher Gene der Salzstressantwort verstärkt exprimiert werden. Zumindest ermöglicht *C. acetobutylicum* die Bildung der EPS den Schutz vor Metabolitstress, wie z. B. durch Säuren und Lösungsmittel (Alsaker *et al.* 2010; Wallenius *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018), was den Zellen auf jeden Fall einen Vorteil bei der ohnehin energieaufwendigen Salzstressantwort verschafft.

5.3.2 Auswirkungen von Salzstress und ArgR-Inaktivierung auf die Sporulation

Bei *B. subtilis* ist die Biofilmbildung direkt der Phase der Sporulation vorgelagert. Der Hauptregulator der Sporulation, Spo0A, aktiviert zuerst biofilmassoziierte Gene, bevor er die irreversible Umwandlung der vegetativen Zelle zur Spore einleitet (Higgins und Dworkin 2012; Hoffmann und Bremer 2016). Wie bereits in der Einleitung erwähnt (2.3.1) zählt auch *C. acetobutylicum* zu den Mikroorganismen, die unter ungünstigen Umweltbedingungen resistente Sporen bilden (Long *et al.* 1984; Dürre 2014). Möglicherweise ist die Biofilmbildung von *C. acetobutylicum* ebenfalls mit der Sporulation gekoppelt. In der Einleitung wurde bereits erläutert (2.2.2), dass *B. subtilis* unter Salzstress keine Sporulation durchführt (Ruzal und Sanchez-Rivas 1998; Hoffmann und Bremer 2016). Auch in dieser Arbeit konnte bei *C. acetobutylicum* unter Salzstress keine Sporenbildung beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse, denn die Sporulationsgene zeigten durchgehend verringerte Transkriptlevel (Abbildung 7.12, Anhang). Interessanterweise waren diese Gene auch bei der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp ohne Salzstress durch verringerte Transkriptlevel gekennzeichnet. Bei der Insertionsmutante konnten während der Kultivierung in Minimalmedium ohne Salz kaum Sporen beobachtet werden. Die Inaktivierung des Arginin-Repressors scheint sich demnach negativ auf die Transkription der Sporulationsgene von *C. acetobutylicum* auszuwirken. Bei der Insertionsmutante konnten neben fehlenden Sporen auch kaum *clostridial stage*-Zellen beobachtet werden, weshalb die Sporulation schon in einem sehr frühen Stadium gehemmt bzw. die Granuloseakkumulation beeinträchtigt sein muss. Da die Transkriptomanalyse mit Zellen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt wurde, kann bezüglich der Sporulation nur spekuliert werden. Die sporenspezifischen Gene werden erst beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase (Transitionsphase) verstärkt exprimiert um die Solventogenese und Sporulation einzuleiten (Jones *et al.* 2008; Ren *et al.* 2012). Auffallend waren dennoch die stark verringerten Transkriptlevel der sporenspezifischen Sigmafaktoren, insbesondere *sigK*, der Insertionsmutante im Vergleich zum

Wildtyp. Zumindest dieser Sigmafaktor wird schon in der exponentiellen Wachstumsphase von *C. acetobutylicum* exprimiert und eine Inaktivierung führt zur Blockierung der Sporulation und Solventogenese (Al-Hinai *et al.* 2014). Möglicherweise liegt die ausbleibende Sporulation der Insertionsmutante darin begründet. Allerdings widersprechen diese Beobachtungen der starken Lösungsmittelbildung der Mutante, denn diese ist bei *C. acetobutylicum* eng mit der Sporulation verknüpft. So ist z. B. der Hauptregulator der Sporulation, Spo0A, gleichzeitig für die Expression der Lösungsmittelgene zuständig (Jones *et al.* 2008; Al-Hinai *et al.* 2015; Xu *et al.* 2017). Höchstwahrscheinlich werden geringere Mengen an aktiviertem Spo0A für die Initiierung der Solventogenese benötigt, als für die Sporulation. So zeigt *B. subtilis* z. B. eine langsame Zunahme an aktiviertem Spo0A während des Wachstums, wobei die Sporulation erst ab einer höheren Schwellkonzentration ausgelöst wird (Fujita und Losick 2005). In *C. acetobutylicum* sind drei sog. *Orphan*-Histidin-Kinasen (Cac3319, Cac0903, Cac0323) bekannt, welche Spo0A durch Phosphorylierung aktivieren (Steiner *et al.* 2011; Dürre 2014). Die Inaktivierung von Cac3319 resultierte z. B. in einer signifikant erhöhten Butanoltoleranz und -produktion sowie einem Rückgang der Sporenbildung (Steiner *et al.* 2011; Xu *et al.* 2017). Bei der Insertionsmutante zeigte sich in dieser Arbeit ein signifikant reduziertes Transkriptlevel von *cac0903* im Vergleich zum Wildtyp. Steiner *et al.* (2011) identifizierten die von diesem Gen kodierte Histidin-Kinase als die dominanteste bezüglich der Sporulationsinitiation und eine Inaktivierung dieses Gens resultierte ebenfalls in einem Rückgang der Sporenanzahl. Vermutlich wird bei der Insertionsmutante durch die verringerte *cac0903*-Expression genügend Spo0A für die Solventogenese, jedoch zu wenig für die Sporulation aktiviert. Dies würde wie beschrieben zur Bildung der Lösungsmittel unter gleichzeitigem Ausbleiben der Sporulation führen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Unterbrechung der Sporulationskaskade nach der Aktivierung von Spo0A. So konnte Jones (2011) zeigen, dass die Inaktivierung des sporenspezifischen Sigmafaktors SigF die Sporulation in einem frühen Stadium blockiert, jedoch keinen Einfluss auf die Lösungsmittelbildung aufweist. Da *sigF* in der Insertionsmutante signifikant geringere Transkriptlevel aufwies, wäre dies eine denkbare Erklärung für die ausbleibende Sporulation. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wird dem Agr-System von *C. acetobutylicum* zugeschrieben. Dieses *Quorum Sensing*-System ist an der zelldichteabhängigen Regulation der Granulose- und Sporenbildung beteiligt und die Inaktivierung seiner Komponenten führt ebenfalls zur Blockierung der Sporulation, ohne einen Einfluss auf die Lösungsmittelbildung zu haben (Steiner *et al.* 2012). Allerdings ist noch nicht bekannt, wie genau das Agr-System in die Sporulationskaskade von *C. acetobutylicum* integriert ist. Interessanterweise resultierte die Inaktivierung des Arginin-Repressors in einer starken Verringerung (bis zu 500fach) der Transkriptlevel der Gene *cac0078-79* des Agr-Systems. Die entsprechenden Genprodukte sind für die Bildung des Signalmoleküls des Systems zuständig. Bei extrazellulärer Akkumulation würde dieses Signalmolekül durch ein Zweikomponentensystem erfasst werden und mittels Aktivierung des Response-Regulators AgrA die Expression verschiedener Gene regulieren (Boles und Horswill 2008). Ein fehlendes Signal des Agr-Systems bei der Insertionsmutante könnte zumindest die zelldichteabhängige Aktivierung der Sporulation unterbinden. Erwähnenswert ist auch, dass eine Inaktivierung des Agr-Systems bei *Staphylococcus aureus* zu einer verstärkten Biofilmbildung

führte (Boles und Horswill 2008). Wie bereits erwähnt (5.3.1), zeichnete sich auch die Insertionsmutante durch Biofilmbildung aus, was eventuell auch auf die verringerten Transkriptlevel im Agr-System zurückgeführt werden kann.

5.3.3 Verstärkung der Lösungsmittelbildung durch ArgR-Inaktivierung

Die Insertionsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp nicht nur eine stärkere, sondern auch eine früher einsetzende Lösungsmittelbildung in salzfreiem und salzhaltigem Medium (Abbildung 4.22). Dementsprechend müsste schon in der exponentiellen Wachstumsphase genügend aktiviertes Spo0A vorliegen, um die Expression der Lösungsmittelgene zu aktivieren. Die Betrachtung der Transkriptomdaten zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptleveln der Solventogenese-Gene verglichen mit dem Wildtyp. Die verstärkte Lösungsmittelbildung der Mutante muss also anderweitig begründet sein. Trotz intensiver Forschung bezüglich der Solventogenese und Sporulation von *C. acetobutylicum* ist das genaue Zusammenspiel und die Regulation dieser beiden Wachstumsaspekte noch nicht eindeutig geklärt (Dürre 2008; Al-Hinai *et al.* 2015; Xu *et al.* 2017; Li *et al.* 2020). Obwohl die Spo0A-Aktivierung für die Solventogenese als notwendig erachtet wird, gibt es Hinweise auf weitere Spo0A-unabhängige Regulatoren und Proteine, die sich positiv auf die Lösungsmittelbildung auswirken (Steiner *et al.* 2012; Xue *et al.* 2016; Xu *et al.* 2017; Xu *et al.* 2018). Inwieweit diese bei der Lösungsmittelbildung der Insertionsmutante eine Rolle spielen, müsste in gezielten weiterführenden Arbeiten untersucht werden. So ist z. B. bekannt, dass die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* durch eine Erhöhung der intrazellulären ATP- und NADH-Konzentration signifikant verbessert werden kann (Liao *et al.* 2019b; Li *et al.* 2020). Zhao *et al.* (2016) konnten bei ihrer Untersuchung des Metaboloms von *C. acetobutylicum* einen geringeren ATP-Bedarf der Zellen unter Salzstress beobachten, was vermutlich auf die verminderte Stoffwechselaktivität zurückzuführen ist. Außerdem zeigten salzgestresste Zellen eine Akkumulation an NADH, jedoch geringere Konzentrationen von NADP⁺ und NADPH. Zhao *et al.* (2016) vermuten, dass Salzstress die Aktivität der Hydrogenasen von *C. acetobutylicum* beeinflusst und so die NADH-Bildung verstärkt. Eine Hemmung der Hydrogenasen führt nachweislich zu einem Anstieg der NADH-Konzentration und verstärkt dadurch die Lösungsmittelbildung (Meyer und Papoutsakis 1989; Wietzke und Bahl 2012). Die hier generierten Transkriptomdaten zeigten verringerte Transkriptlevel der Hydrogenase-Gene zum einen unter Salzstress (bis zu 16fach), zum anderen beim Vergleich der Insertionsmutante mit dem Wildtyp (bis zu 500fach). Möglicherweise können in der Insertionsmutante, aufgrund der stark verringerten Transkriptmengen der Hydrogenasen, die überschüssigen Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse nicht über die Wasserstoffbildung verbraucht werden. Demnach würden andere Stoffwechselwege, wie z. B. die Solventogenese diese Aufgabe übernehmen, wodurch die Alkoholbildung begünstigt werden kann (Girbal *et al.* 1995; Wietzke und Bahl 2012; Liao *et al.* 2019b). Die schnelle Reassimilierung der Säuren sowie die verfrüht einsetzende Solventogenese der Insertionsmutante unterstützen diese Vermutung (Abbildung 4.22). Nimbalkar *et al.* (2019) postulieren außerdem, dass Tryptophan als Vorläufer für

die *de novo*-Synthese von NADPH genutzt werden kann und so den Stoffwechselfluss Richtung Butanol verstärkt. Jedoch ist dieser Weg der Tryptophan-Nutzung in *C. acetobutylicum* weitgehend uncharakterisiert und bisher konnten die dafür erforderlichen Enzyme noch nicht identifiziert werden (Senger und Papoutsakis 2008; Liao *et al.* 2019b).

Weiterhin spielt auch die Stickstoffquelle und -verfügbarkeit bei der Lösungsmittelbildung von saccharolytischen Clostridien eine Rolle (Chen *et al.* 2001; Stutz *et al.* 2007). Die Nutzung organischer Stickstoffquellen wird dabei favorisiert, wobei unter Limitierung häufig Ammonium durch die Biosynthese von Glutamat und Glutamin als organischer Stickstoff fixiert wird (Stutz *et al.* 2007). Die Transkriptomdaten aus dieser Arbeit zeigten, dass die Gene des Stickstoffmetabolismus beim Wildtyp und der Insertionsmutante unter Salzstress verminderte Transkriptlevel aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigte die Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp höhere Transkriptlevel der entsprechenden Gene (Abbildung 7.12, Anhang). Die Insertionsmutante könnte demnach effizienter als der Wildtyp anorganischen Stickstoff als Aminosäuren fixieren, was sich vorteilhaft auf die Lösungsmittelbildung auswirken würde. Einen negativen Einfluss von Salzstress auf die Stickstoffassimilierung würde die Insertionsmutante durch die verstärkt ablaufende Aminosäure-Biosynthese entgegenwirken, was die verbesserte Lösungsmittelbildung verglichen zum Wildtyp erklärt.

5.3.4 Aminosäure-vermittelte Stresstoleranz der Insertionsmutante

Neben der Lösungsmittelbildung spielt vor allem auch die Toleranz gegenüber diesen toxischen Substanzen eine wichtige Rolle. Butanol und andere organische Lösungsmittel können sich in die Phospholipidschicht der Zellmembran einlagern und stören so zahlreiche membranassoziierte Funktionen, wie z. B. den Zucker- und Aminosäuretransport oder den Energietstoffwechsel (Papoutsakis 2008; Alsaker *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013). Viele Studien deuten darauf hin, dass eine Veränderung der Membranzusammensetzung, sowie die Hochregulation von Genen der Zellwandbiosynthese, von Effluxpumpen oder Hitzeschockproteinen (HSPs) zu einer besseren Butanol-Toleranz beitragen können (Alsaker *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013; Xu *et al.* 2017). Interessanterweise weisen die Ergebnisse der entsprechenden Transkriptomstudien (Alsaker *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013) Übereinstimmungen mit den hier generierten Transkriptomdaten auf, nicht nur bezüglich der Salzstressantwort, sondern auch hinsichtlich der Arginin-Biosynthese. So zeigte der Wildtyp unter Salzstress erhöhte Transkriptlevel einiger HSPs, sowie in den GO-Kategorien des Ionentransports und der ATP-Synthese (Abbildung 4.26). Dies war auch ohne Stresseinwirkung bei der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen (Abbildung 4.28). Differentiell exprimierte Gene fanden sich auch in der COG-Klasse M (Zellwand/Membran/Hüllen-Biogenese) der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Vor allem die Membranzusammensetzung kann als Reaktion auf verschiedene Stressoren angepasst werden. So werden z. B. als Reaktion auf Salzstress vermehrt ungesättigte Fettsäuren und Cardiolipin eingebaut (López *et al.* 2000; Gandhi und Shah 2016). Für *C. acetobutylicum* ist bekannt, dass Cyclopropan-Fettsäuren unter Säurestress vermehrt produziert werden (Alsaker und Papoutsakis 2005; Alsaker *et al.* 2010) und unter

Lösungsmittelstress der Ethanolaminphosphat-Gehalt ansteigt (Tian *et al.* 2013). Beide Modifizierungen werden zur Verringerung der Membranfluidität genutzt und verhindern wahrscheinlich das Eindringen unerwünschter Moleküle zum Schutz der Zellen vor ungünstigen Bedingungen (Tian *et al.* 2013; Sandoval und Papoutsakis 2016). Die Cyclopropan-Fettsäuresynthese zeigt in den hier generierten Transkriptomdaten erhöhte Level, sowohl unter Salzstress, als auch bei der Insertionsmutante. Im Gegensatz dazu sind die Transkriptmengen der Ethanolamin-Synthesegene nur in der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht, während sie unter Salzstress geringer ausfallen. Inwieweit sich diese Unterschiede auf den Ethanolaminphosphat-Gehalt der Membran auswirken, müsste eine genaue Untersuchung der Membran-zusammensetzung zeigen. Zumindest kann die erhöhte Lösungsmittelbildung der Insertionsmutante auf eine veränderte Membranzusammensetzung und damit möglicherweise stärkere Butanol-Toleranz zurückzuführen sein.

Einen besonderen Stellenwert unter Salzstress nimmt der Aminosäuremetabolismus ein. Insbesondere die Histidin- und Tryptophan-Biosynthese zeigten bereits unter Säure- sowie Lösungsmittelstress erhöhte Transkriptlevel (Alsaker *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013). Dies konnte auch unter Salzstress, sowie bei der Insertionsmutante beobachtet werden (4.4.1). Vor allem die Tryptophan-Biosynthesegene zeigten durchgehend um bis zu 32fach erhöhte Transkriptmengen (Abbildung 7.12, Anhang). Diese beiden Aminosäuren spielen eine Rolle bei verschiedenen Stressantworten. So konnte bei verschiedenen Organismen gezeigt werden, dass vor allem unter Säure- und Lösungsmittelstress die entsprechenden Biosynthesewege verstärkt ablaufen und eine Supplementation mit Histidin oder Tryptophan die Stresstoleranz und Fermentationsausbeute erhöhen kann (Hirasawa *et al.* 2007; Horinouchi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013; Reeve und Reid 2016). Die in dieser Arbeit generierten Transkriptomdaten lassen den Schluss zu, dass diese Aminosäuren auch eine Rolle in der Salzstressantwort spielen (4.4.1). Der molekulare Mechanismus hinter der Histidin-Tryptophan-vermittelten Stresstoleranz ist bisher jedoch nicht genau untersucht (Hirasawa *et al.* 2007; Horinouchi *et al.* 2010; Reeve und Reid 2016). Zumindest in Bezug auf die Histidinbiosynthese ist bekannt, dass sie einen Beitrag zur Säuretoleranz leistet. So können durch die Aktivität der Histidinol-Dehydrogenase (*hisD*) intrazelluläre Protonen verwertet und damit der intrazelluläre pH-Wert erhöht werden (Reeve und Reid 2016). Tryptophan spielt wiederum in der Biofilmbildung und bei der Bildung von *Quorum sensing*-Peptiden eine wichtige Rolle (Domka *et al.* 2007). Auch bei *C. acetobutylicum* konnte eine verstärkte Tryptophanbiosynthese unter Biofilmbildung beobachtet werden (Liu *et al.* 2016b). Wie zuvor erläutert, scheint die Biofilmbildung ebenfalls eine Reaktion von *C. acetobutylicum* auf Salzstress zu sein und auch die Insertionsmutante zeichnete sich durch eine verstärkte Biofilmbildung aus. Dementsprechend kann dies eventuell auf die verstärkte Tryptophanbiosynthese zurückzuführen sein. Doch nicht nur die Biofilmbildung vermittelt eine Schutzwirkung unter Salzstress. Auch Tryptophan, sowie Arginin selbst scheinen einen positiven Einfluss auf die Stresstoleranz von *C. acetobutylicum* zu haben (Wang *et al.* 2013), wobei der molekulare Mechanismus ebenfalls nicht bekannt ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die Rolle dieser Aminosäuren bei der Membranstabilität spielen. Durch seinen biphasischen Fermentationsmetabolismus ist

C. acetobutylicum Säure- und Lösungsmittelstress ausgesetzt (Dürre 2011). Wie bereits erwähnt, erhöht Säure- und Lösungsmittelstress die Membranfluidität, sodass *C. acetobutylicum* mit einer Veränderung der Membranzusammensetzung entgegensteuert (Alsaker und Papoutsakis 2005; Alsaker *et al.* 2010; Tian *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016). Auch hinsichtlich Salzstress konnte z. B. bei *B. subtilis* gezeigt werden, dass die Membranfluidität verringert wird, um dem Verlust von kompatiblen Soluten entgegenzuwirken und eine Barriere gegen hohe Ionenkonzentrationen aufzubauen (López *et al.* 2000; López *et al.* 2006). Für Tryptophan und Arginin ist bekannt, dass sie eine wichtige Ankerfunktion bei der Stabilisierung von Membranproteinen übernehmen, wobei Arginin gleichzeitig auch eine Schlüsselaminoäure in Ionenkanälen darstellt (Jesus und Allen 2013; Li *et al.* 2013; Armstrong *et al.* 2016). Die erhöhten Transkriptlevel der Tryptophanbiosynthese unter Salzstress könnte ein Hinweis darauf sein, dass *C. acetobutylicum* vermehrt Tryptophan nutzt, um die Stabilisierung der Membranproteine unter Salzstress zu gewährleisten. Auch diesbezüglich wäre die Insertionsmutante im Vorteil, da verglichen mit dem Wildtyp auch ohne Salzstress höhere Transkriptlevel der entsprechenden Gene vorliegen. Eine interessante Hypothese lässt sich außerdem im Hinblick auf die hydratisierenden Eigenschaften von Arginin aufstellen (Kanwa *et al.* 2020). Es konnte *in situ* gezeigt werden, dass Arginin in hoher Konzentration Lipiddoppelschichten verformen kann, indem es eine erhebliche Mengen Wasser sowie Lipidkopfgruppen in den Kohlenwasserstoffkern der Membran transportiert (Li *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2018; Kanwa *et al.* 2020). Da Salzstress mit einem Verlust von Wasser einhergeht (Wood 2011), könnte Arginin dem Verlust von Wasser entgegenwirken, indem es die Hydrathülle von Proteinen schützt und die Dehydratisierung der Membran verhindert (Morita *et al.* 2002; Armstrong *et al.* 2016; Cheng *et al.* 2016; Kanwa *et al.* 2020). Dies würde erklären, warum die Insertionsmutante mit einer verstärkten Arginin-Biosynthese unter Salzstress ein besseres Wachstum zeigt als der Wildtyp.

5.3.5 Verknüpfung der Aminosäure-Biosynthesen in *C. acetobutylicum*

Die Inaktivierung des Arginin-Repressors resultierte nicht nur in erhöhten Transkriptleveln der Arginin-Biosynthesegene, sondern auch der anderer Aminosäure-Biosynthesen, besonders Histidin und Tryptophan. Die Transkriptomdaten der Insertionsmutante zeigen daher deutlich, dass die Aminosäure-Biosynthesewege enzymatisch und regulatorisch verknüpft sind (Abbildung 4.28, Abbildung 7.12, Anhang). Vor allem bei Pilzen ist die sogenannte *cross-pathway* Kontrolle verbreitet, bei der ein Mangel oder Ungleichgewicht einer einzigen Aminosäure die Genexpression mehrerer anderer Aminosäure-Biosynthesewege aktiviert (Carsiotis und Jones 1974; Sachs 2013). Die bei Pilzen wie z. B. *Neurospora crassa* oder *Saccharomyces cerevisiae* auftretende Co-Regulierung von Arginin-, Histidin- und Tryptophan-Biosynthese war teilweise auch bei *B. subtilis* zu beobachten (Roth und Nester 1971; Koo *et al.* 2017). Hinsichtlich des Zusammenspiels der Regulation von Aminosäure-Biosynthesen konnte z. B. für *E. coli* ein genomweites Netzwerk der beteiligten Regulons rekonstruiert werden (Cho *et al.* 2011; Sander *et al.* 2019). Dabei nahm interessanterweise ArgR eine Schlüsselposition ein. So konnten Cho *et al.* (2011) nicht nur eine

große Anzahl an Zielgenen unter direkter ArgR-Kontrolle identifizieren, sondern auch viele Regulons unter indirekter ArgR-Kontrolle. Neben der direkten Repression von Genen der Arginin- und Histidin-Biosynthese lagen bei *E. coli* demnach auch die Biosynthesen der verzweigtkettigen Aminosäuren, sowie die von Tryptophan, Phenylalanin und Serin unter indirekter Kontrolle durch ArgR. Die direkte Kontrolle der Arginin-, Histidin- und Tryptophanbiosynthese durch ArgR bei *C. acetobutylicum* konnte in dieser Arbeit mit Blick auf die Transkriptomdaten bestätigt werden (Abbildung 7.12, Anhang). Die Gene dieser Aminosäuren zeigten in der Insertionsmutante durchgehend erhöhte Transkriptlevel. Auch die Lysin- und Serin-Biosynthesegene waren mit erhöhten Transkriptleveln zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Cho *et al.* (2011) zeigten die hier generierten Transkriptomdaten allerdings ein entgegengesetztes Verhalten bezüglich des Zusammenhangs zwischen ArgR und den verzweigtkettigen Aminosäuren. Bei der Insertionsmutante wiesen die Gene der Leucin- und Isoleucin-Biosynthese niedrigere Transkriptlevel auf im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise wird in *C. acetobutylicum* der entsprechende Regulator Lrp (*cac1464*) unabhängig von ArgR gebildet, im Gegensatz zur Situation in *E. coli* (Cho *et al.* 2011).

Eine weitere interessante Besonderheit ist die Verknüpfung der Arginin- und Prolin Biosynthese, wie sie in verschiedenen Mikroorganismen zu beobachten ist (Cunin *et al.* 1986; Xu *et al.* 2007; Zaprasis *et al.* 2015). Beim Modellorganismus *B. subtilis* kann mittels der Ornithin- δ -Aminotransferase (OAT, RocD), einem Enzym des Argininkatabolismus, Ornithin in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt werden (Gardan *et al.* 1995, Abbildung 5.2). Hierbei handelt es sich um das gleiche Reaktionsprodukt, welches auch in der Prolinbiosynthese synthetisiert und folglich durch die Pyrrolin-5-Caboxylat-Reduktase zu Prolin umgewandelt wird. Bei *E. coli* und *Salmonella typhimurium* erfolgt die Verbindung über das Enzym ArgJ, welches unspezifisch N-Acetylglutamate-5-Semialdehyd in γ -Glutamyl-Semialdehyd umwandeln kann. Demzufolge kann Prolin auch durch die Rekrutierung von Enzymen des Argininmetabolismus synthetisiert werden (Weber *et al.* 2006; Zaprasis *et al.* 2015). Diese Verbindung der beiden Biosynthesewege wird auch in *C. acetobutylicum* vermutet, sodass eine externe Bereitstellung von Arginin zu einer Erhöhung des Prolin-Pools führen könnte. Die Kopplung erfolgt dabei wahrscheinlich über das Enzym ArgD, welches hohe Ähnlichkeiten zu RocD aus *B. subtilis* aufweist und daher vermutlich in der Lage ist, eine ähnliche Reaktion zu katalysieren (Lee *et al.* 2008; Senger und Papoutsakis 2008). Zur Überprüfung dieser Hypothese führte Furnică (2020) Enzymstudien mit ArgD aus *C. acetobutylicum* durch, bei denen das aufgereinigte Protein durchaus OAT-Aktivität zeigte. So war ArgD in der Lage, Ornithin und Ketoglutarat mit einer Aktivität von 1,185 U/mg Protein zu Pyrrolin-5-Carboxylat umzusetzen. Damit konnte die Verbindung der Prolin- und Arginin-Biosynthese auch enzymatisch bestätigt werden. Ein weiterer Beleg für die Bifunktionalität von ArgD ist das Ergebnis des Prolin-Assays (Abbildung 4.24). Die Insertionsmutante wies im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Steigerung des intrazellulären Prolin-Pools auf. Die Inaktivierung des ArgR-Repressors resultierte in höheren Transkriptleveln der Gene für die Arginin-Biosynthese. So zeigte die Insertionsmutante unter Salzstress eine achtfache Erhöhung des Gens *cac2388* (*argD*) im Vergleich zum Wildtyp unter Salzstress. Dementsprechend kann die verstärkte

Prolin-Akkumulation möglicherweise darauf zurückzuführen sein, denn die Gene für die Prolin-Synthese aus Glutamat (*cac3252-54*) zeigten unter keinen Bedingungen eine signifikante Veränderung der Transkriptmengen. Bei *B. subtilis* liegen zwei Prolin-Biosynthesewege vor, die einerseits für die Prolin-Bildung zur Proteinsynthese (ProB-ProA-ProI) und andererseits zur Akkumulation von Prolin als kompatibles Solut (ProJ-ProA-ProH) verantwortlich sind (Hoffmann und Bremer 2016). Für *C. acetobutylicum* ist jeweils nur ein Enzym pro Syntheseschritt annotiert (ProB-ProA-ProC). Da Prolin bei *C. acetobutylicum* ursprünglich keine Funktion als kompatibles Solut einnimmt (Abbildung 4.6), dient es wahrscheinlich allein als Baustein zur Proteinsynthese. Möglicherweise kann die Insertionsmutante das durch die verstärkte Expression von *argD* überproduzierte Prolin akkumulieren, was wiederum als kompatibles Solut zum Schutz und damit zum verbesserten Wachstum unter Salzstress beiträgt.

5.4 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit setzte einen Fokus auf die Untersuchung der Salzstressantwort von *C. acetobutylicum* und zielte auf die Aufdeckung von Schutzsubstanzen und Schlüsselgenen zur Steigerung der Lösungsmittelbildung in salzhaltigem Medium. Die generierten Ergebnisse unterstreichen die bereits bekannte, vielfältige stressprotektive Wirkung von Aminosäuren beim Wachstum von Bakterien. Auch für *C. acetobutylicum* zeigten Fütterungsexperimente eine positive Wirkung von vor allem Arginin, aber auch Histidin, Tryptophan und GB auf das Wachstum unter Salzstress. Im weiteren Verlauf konnte mittels *metabolic engineering* die Arginin-Biosynthese von *C. acetobutylicum* durch Inaktivierung des entsprechenden Repressors erfolgreich verstärkt und so die Butanolproduktion unter Salzstress weiter gesteigert werden. Transkriptomanalysen verdeutlichten dabei die Verknüpfung der Aminosäure-Biosynthesen und den Zusammenhang verschiedener Stressantworten bei *C. acetobutylicum*. Um die genauen molekularbiologischen Hintergründe der Schutzmechanismen der erwähnten Aminosäuren aufzuklären, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. So muss zum einen der Aminosäurepool der Insertionsmutante aufgeschlüsselt werden. Dies würde klären, ob die entsprechenden Aminosäuren als kompatible Soule akkumuliert werden, oder der positive Einfluss auf Wachstumseffekte z. B. Stickstoffassimilierung, Redox-Balance oder Energiegewinnung zurückzuführen ist. Dabei sollte auch überprüft werden, ob die Fütterung von Aminosäuren in höheren Konzentrationen die stressprotektive Wirkung und Akkumulation dieser verstärkt. Mögliche salzstressunabhängige Schutzeffekte bieten Ansatzpunkte für die weitere Optimierung der ABE-Fermentation. Dabei sollte vor allem die in dieser Arbeit aufgedeckte Verknüpfung der Salzstressantwort mit der Biofilmbildung, der Sporulation, sowie der Spo0A-unabhängigen Lösungsmittelbildung eingehender charakterisiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Abee; Kovács; Kuipers; van der Veen (2011): Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. In: *Current opinion in biotechnology* 22 (2), S. 172–179. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.10.016.

Abo; Gao; Wu; Zhu; Wang (2019): A review on characteristics of food waste and their use in butanol production. In: *Reviews on environmental health* 34 (4), S. 447–457. DOI: 10.1515/reveh-2019-0037.

Abrahám; Hourton-Cabassa; Erdei; Szabados (2010): Methods for determination of proline in plants. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 639, S. 317–331. DOI: 10.1007/978-1-60761-702-0_20.

Al-Hinai; Jones; Papoutsakis (2014): σ K of *Clostridium acetobutylicum* is the first known sporulation-specific sigma factor with two developmentally separated roles, one early and one late in sporulation. In: *Journal of bacteriology* 196 (2), S. 287–299. DOI: 10.1128/JB.01103-13.

Al-Hinai; Jones; Papoutsakis (2015): The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 79 (1), S. 19–37. DOI: 10.1128/MMBR.00025-14.

Alsaker; Papoutsakis (2005): Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Journal of bacteriology* 187 (20), S. 7103–7118. DOI: 10.1128/JB.187.20.7103-7118.2005.

Alsaker; Paredes; Papoutsakis (2010): Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. In: *Biotechnology and bioengineering* 105 (6), S. 1131–1147. DOI: 10.1002/bit.22628.

Altendorf; Booth; Gralla; Greie; Rosenthal; Wood (2009): Osmotic Stress. In: *EcoSal Plus* 3 (2). DOI: 10.1128/ecosalplus.5.4.5.

Amador-Noguez; Bragg; Feng; Roquet; Rabinowitz (2011): Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Applied and environmental microbiology* 77 (22), S. 7984–7997. DOI: 10.1128/AEM.05374-11.

Andersch; Bahl; Gottschalk (1983): Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. In: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18 (6), S. 327–332. DOI: 10.1007/BF00504740.

Armstrong; Mason; Anderson; Dempsey (2016): Arginine side chain interactions and the role of arginine as a gating charge carrier in voltage sensitive ion channels. In: *Scientific reports* 6, S. 21759. DOI: 10.1038/srep21759.

Babicki; Arndt; Marcu; Liang; Grant; Maciejewski; Wishart (2016): Heatmapper: web-enabled heat mapping for all (W1). Online verfügbar unter <http://www.heatmapper.ca/>, zuletzt geprüft am 17.07.2020.

Bahl; Dürre (1993): Clostridia. In: Gerald Reed, Hans-Jürgen Rehm und Hermann Sahm (Hg.): *Biotechnology*. Vol. 1: *Biological fundamentals*, Bd. 22. 2nd, completely rev. ed. Weinheim, Cambridge: VCH, S. 285–323.

Berrier; Coulombe; Szabo; Zoratti; Ghazi (1992): Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. In: *European journal of biochemistry* 206 (2), S. 559–565. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16960.x.

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

Billi; Potts (2002): Life and death of dried prokaryotes. In: *Research in Microbiology* 153 (1), S. 7–12. DOI: 10.1016/s0923-2508(01)01279-7.

Birnboim; Doly (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research* 7 (6), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.

Blohn; Kempf; Kappes; Bremer (1997): Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. In: *Molecular microbiology* 25 (1), S. 175–187. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.4441809.x.

Boch; Kempf; Bremer (1994): Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. In: *Journal of bacteriology* 176 (17), S. 5364–5371. DOI: 10.1128/jb.176.17.5364-5371.1994.

Boles; Horswill (2008): Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. In: *PLoS pathogens* 4 (4), e1000052. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000052.

Bolger; Lohse; Usadel (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (15), S. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Booth; Edwards; Black; Schumann; Miller (2007): Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (6), S. 431–440. DOI: 10.1038/nrmicro1659.

Booth; Higgins (1990): Enteric bacteria and osmotic stress: intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? In: *FEMS Microbiol Rev* 6 (2-3), S. 239–246. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04097.x.

Bovell; Packer; Helgerson (1963): Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light-scattering. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 75, S. 257–266. DOI: 10.1016/0006-3002(63)90604-8.

BP p.l.c. (2019): BP Statistical Review of World Energy 2019. 68. Aufl. London.

Branda; González-Pastor; Ben-Yehuda; Losick; Kolter (2001): Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20), S. 11621–11626. DOI: 10.1073/pnas.191384198.

Breznak; Costilow (1994): Physicochemical Factors in Growth. In: Philipp Gerhardt (Hg.): Methods for general and molecular bacteriology, 17 Suppl 6. Washington, D.C: American Society for Microbiology, S. 309–329.

Brill; Hoffmann; Bleisteiner; Bremer (2011): Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. In: *Journal of bacteriology* 193 (19), S. 5335–5346. DOI: 10.1128/JB.05490-11.

Brown (1976): Microbial water stress. In: *Bacteriological reviews* 40 (4), S. 803–846.

Calusinska; Happe; Joris; Wilmotte (2010): The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. In: *Microbiology (Reading, England)* 156 (Pt 6), S. 1575–1588. DOI: 10.1099/mic.0.032771-0.

Carsiotis; Jones (1974): Cross-pathway regulation: tryptophan-mediated control of histidine and arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. In: *Journal of bacteriology* 119 (3), S. 889–892.

Chen; Toth; Kasap (2001): Nitrogen-fixation genes and nitrogenase activity in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. In: *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 27 (5), S. 281–286. DOI: 10.1038/sj.jim.7000083.

Cheng; Du; Zhu; Guo; He (2016): Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. In: *Scientific reports* 6, S. 31311. DOI: 10.1038/srep31311.

Cho; Federowicz; Park; Zengler; Palsson (2011): Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism. In: *Nature chemical biology* 8 (1), S. 65–71. DOI: 10.1038/nchembio.710.

Chun; Li-bo; Di; Jing; Ning (2012): Response of Osmotic Adjustment of *Lactobacillus bulgaricus* to NaCl Stress. In: *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 19 (4), S. 66–74. DOI: 10.1016/S1006-8104(13)60054-9.

Costerton; Lewandowski; Caldwell; Korber; Lappin-Scott (1995): Microbial biofilms. In: *Annual review of microbiology* 49, S. 711–745. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

Croux; Canard; Goma; Soucaille (1992): Autolysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *Journal of general microbiology* 138 (5), S. 861–869. DOI: 10.1099/00221287-138-5-861.

Cunin; Glansdorff; Piérard; Stalon (1986): Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. In: *Microbiological reviews* 50 (3), S. 314–352.

da Costa; Santos; Galinski (1998): An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 61, S. 117–153. DOI: 10.1007/BFb0102291.

Domka; Lee; Bansal; Wood (2007): Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. In: *Environmental microbiology* 9 (2), S. 332–346. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01143.x.

Dower; Miller; Ragsdale (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic acids research* 16 (13), S. 6127–6145. DOI: 10.1093/nar/16.13.6127.

Driesssen; Ubbink-Kok; Konings (1988): Amino acid transport by membrane vesicles of an obligate anaerobic bacterium, *Clostridium acetobutylicum*. In: *Journal of bacteriology* 170 (2), S. 817–820. DOI: 10.1128/jb.170.2.817-820.1988.

Dürre (2008): Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, S. 353–362. DOI: 10.1196/annals.1419.009.

Dürre (2011): Ancestral sporulation initiation. In: *Molecular microbiology* 80 (3), S. 584–587. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07628.x.

Dürre (2014): Physiology and Sporulation in *Clostridium*. In: *Microbiology spectrum* 2 (4), TBS-0010-2012. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012.

Dworkin; Falkow; Rosenberg; Schleifer; Stackebrandt (Hg.) (2006): The Prokaryotes. Volume 4: *Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer-Verlag.

Empadinhas; da Costa (2008): Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. In: *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 11 (3), S. 151–161.

Ezeji; Blaschek (2008): Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. In: *Bioresource technology* 99 (12), S. 5232–5242. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.032.

Fujisawa; Kusumoto; Wada; Tsuchiya; Ito (2005): NhaK, a novel monovalent cation/H⁺ antiporter of *Bacillus subtilis*. In: *Archives of microbiology* 183 (6), S. 411–420. DOI: 10.1007/s00203-005-0011-6.

Fujita; Losick (2005): Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. In: *Genes & development* 19 (18), S. 2236–2244. DOI: 10.1101/gad.1335705.

Furnică (2020): Functional analysis of the ArgD protein from *Clostridium acetobutylicum*. Master's Thesis. **Universität Rostock**, Rostock. Biowissenschaften.

Gandhi; Shah (2016): Effect of salt stress on morphology and membrane composition of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium bifidum*, and their adhesion to human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. In: *Journal of dairy science* 99 (4), S. 2594–2605. DOI: 10.3168/jds.2015-10718.

Gardan; Rapoport; Débarbouillé (1995): Expression of the rocDEF operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Molecular Biology* 249 (5), S. 843–856. DOI: 10.1006/jmbi.1995.0342.

Germane; Liu; Gerlach; Savage; Renberg; Zu et al. (2018): Hydrogen-Cycling during Solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* American Type Culture Collection (ATCC) 824 Requires the [NiFe]-Hydrogenase for Energy Conservation. In: *Fermentation* 4 (3), S. 55. DOI: 10.3390/fermentation4030055.

Girbal; Abendroth; Winkler; Benton; Meynial-Salles; Croux et al. (2005): Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. In: *Applied and environmental microbiology* 71 (5), S. 2777–2781. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2777-2781.2005.

Girbal; Croux; Vasconcelos; Soucaille (1995): Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *FEMS Microbiol Rev* 17 (3), S. 287–297. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00212.x.

González-González; Correa; Ryan; Jensen; Pratt; Schenk (2018): Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: Towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82, S. 1137–1148. DOI: 10.1016/j.rser.2017.09.091.

Grant; Jessee; Bloom; Hanahan (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), S. 4645–4649. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4645.

Grieve; Grattan (1983): Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. In: *Plant Soil* 70 (2), S. 303–307. DOI: 10.1007/BF02374789.

Gundlach; Commichau; Stölke (2018): Perspective of ions and messengers: an intricate link between potassium, glutamate, and cyclic di-AMP. In: *Current genetics* 64 (1), S. 191–195. DOI: 10.1007/s00294-017-0734-3.

Hagemann (2011): Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. In: *FEMS microbiology reviews* 35 (1), S. 87–123. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00234.x.

Han; Gopalan; Ezeji (2011): Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. In: *Applied microbiology and biotechnology* 91 (3), S. 565–576. DOI: 10.1007/s00253-011-3276-5.

Hartmanis; Gatenbeck (1984): Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. In: *Applied and environmental microbiology* 47 (6), S. 1277–1283.

Harwood; Cutting (1990): Molecular biological methods for *Bacillus*. Chichester: Wiley (A Wiley Interscience publication).

Heap; Kuehne; Ehsaan; Cartman; Cooksley; Scott; Minton (2010): The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined (1). Online verfügbar unter <http://clostron.com/clostron2.php>, zuletzt geprüft am 17.07.2020.

Heap; Pennington; Cartman; Carter; Minton (2007): The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. In: *Journal of microbiological methods* 70 (3), S. 452–464. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.05.021.

Hecker; Pané-Farré; Völker (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. In: *Annual review of microbiology* 61, S. 215–236. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093445.

Higgins; Dworkin (2012): Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. In: *FEMS microbiology reviews* 36 (1), S. 131–148. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.

Hillmann; Fischer; Bahl (2006): The rubrerythrin-like protein Hsp21 of *Clostridium acetobutylicum* is a general stress protein. In: *Arch. Microbiol.* 185 (4), S. 270–276. DOI: 10.1007/s00203-006-0091-y.

Hirasawa; Yoshikawa; Nakakura; Nagahisa; Furusawa; Katakura et al. (2007): Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. In: *Journal of biotechnology* 131 (1), S. 34–44. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.010.

Ho; Hunt; Horton; Pullen; Pease (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. In: *Gene* 77 (1), S. 51–59. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90358-2.

Hoffmann; Boiangiu; Moses; Bremer (2008): Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (8), S. 2454–2460. DOI: 10.1128/AEM.01573-07.

Hoffmann; Bremer (2011): Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. In: *Journal of bacteriology* 193 (7), S. 1552–1562. DOI: 10.1128/JB.01319-10.

Hoffmann; Bremer (2016): Management of Osmotic Stress by *Bacillus subtilis*: Genetics and Physiology. In: Frans J. de de Brujin (Hg.): Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria, Bd. 160. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell, S. 657–676.

Hoffmann; Bremer (2017): Guardians in a stressful world: the Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*. In: *Biological chemistry* 398 (2), S. 193–214. DOI: 10.1515/hsz-2016-0265.

Hoffmann; Schütz; Brosius; Völker; Völker; Bremer (2002): High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 184 (3), S. 718–727. DOI: 10.1128/jb.184.3.718-727.2002.

Hoffmann; Wensing; Brosius; Steil; Völker; Bremer (2013): Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. In: *Journal of bacteriology* 195 (3), S. 510–522. DOI: 10.1128/JB.01505-12.

Horinouchi; Tamaoka; Furusawa; Ono; Suzuki; Hirasawa et al. (2010): Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. In: *BMC genomics* 11, S. 579. DOI: 10.1186/1471-2164-11-579.

Houry; Briandet; Aymerich; Gohar (2010): Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. In: *Microbiology (Reading, England)* 156 (Pt 4), S. 1009–1018. DOI: 10.1099/mic.0.034827-0.

Huang; Gaballa; Cao; Helmann (1999): Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. In: *Molecular microbiology* 31 (1), S. 361–371. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01180.x.

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

Jesus; Allen (2013): The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1828 (2), S. 864–876. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.09.009.

Jones (2011): Elucidating the Transcriptional Regulation of Sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation. **Northwestern University**, Evanston, IL. Chemical and Biological Engineering.

Jones; Paredes; Tracy; Cheng; Sillers; Senger; Papoutsakis (2008): The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. In: *Genome biology* 9 (7), R114. DOI: 10.1186/gb-2008-9-7-r114.

Jones; van der Westhuizen; Long; Allcock; Reid; Woods (1982): Solvent Production and Morphological Changes in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Applied and environmental microbiology* 43 (6), S. 1434–1439.

Jones; Woods (1986): Acetone-butanol fermentation revisited. In: *Microbiological reviews* 50 (4), S. 484–524.

Kanwa; De; Maity; Chakraborty (2020): Interaction of aliphatic amino acids with zwitterionic and charged lipid membranes: hydration and dehydration phenomena. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 22 (6), S. 3234–3244. DOI: 10.1039/c9cp06188f.

Kappes; Kempf; Bremer (1996): Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. In: *Journal of bacteriology* 178 (17), S. 5071–5079. DOI: 10.1128/jb.178.17.5071-5079.1996.

Karim; Islam; Khalid; Faizal; Khan; Yousuf (2020): Microalgal Cell Disruption and Lipid Extraction Techniques for Potential Biofuel Production. In: *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*: Elsevier, S. 129–147.

Kempf; Bremer (1998): Stress responses of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: Uptake and synthesis of osmoprotectants. In: *J. Biosci.* 23 (4), S. 447–455. DOI: 10.1007/BF02936138.

Kibbe (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Online verfügbar unter <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, zuletzt geprüft am 17.07.2020.

Killham; Firestone (1984): Salt stress control of intracellular solutes in streptomycetes indigenous to saline soils. In: *Applied and environmental microbiology* 47 (2), S. 301–306.

Klähn; Hagemann (2011): Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. In: *Environmental microbiology* 13 (3), S. 551–562. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02366.x.

Koo; Kritikos; Farelli; Todor; Tong; Kimsey et al. (2017): Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*. In: *Cell systems* 4 (3), 291–305.e7. DOI: 10.1016/j.cels.2016.12.013.

Langmead; Salzberg (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. In: *Nature methods* 9 (4), S. 357–359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.

Lass; Suessenbacher; Wölkart; Mayer; Brunner (2002): Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. In: *Molecular pharmacology* 61 (5), S. 1081–1088. DOI: 10.1124/mol.61.5.1081.

Lee; Yun; Feist; Palsson; Lee (2008): Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. In: *Applied microbiology and biotechnology* 80 (5), S. 849–862. DOI: 10.1007/s00253-008-1654-4.

Li; Huang; Ke; Pang; Liu (2020): Pathway dissection, regulation, engineering and application: lessons learned from biobutanol production by solventogenic clostridia. In: *Biotechnology for biofuels* 13, S. 39. DOI: 10.1186/s13068-020-01674-3.

Li; Vorobiov; Allen (2013): The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. In: *The journal of physical chemistry. B* 117 (40), S. 11906–11920. DOI: 10.1021/jp405418y.

Liao; Guo; Hu; Suo; Fu; Wang (2019a): The significance of proline on lignocellulose-derived inhibitors tolerance in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *Bioresource technology* 272, S. 561–569. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.10.038.

Liao; Yang; Fu; Wang (2019b): The significance of aspartate on NAD(H) biosynthesis and ABE fermentation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *AMB Express* 9 (1), S. 142. DOI: 10.1186/s13568-019-0874-6.

Liu; Di Huang; Wen (2016a): Integrated intracellular metabolic profiling and pathway analysis approaches reveal complex metabolic regulation by *Clostridium acetobutylicum*. In: *Microbial cell factories* 15, S. 36. DOI: 10.1186/s12934-016-0436-4.

Liu; Qiao; Tian; Zhang; Liu; Li (2015): Spontaneous large-scale autolysis in *Clostridium acetobutylicum* contributes to generation of more spores. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 950. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00950.

Liu; Xu; Wang; Chen; Shen; Niu et al. (2016b): Comparative transcriptomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* biofilm and planktonic cells. In: *Journal of biotechnology* 218, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.017.

Liu; Xue; Lin; Bai (2013): Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. In: *Biotechnology advances* 31 (2), S. 257–265. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.11.005.

Liu; Yang; Chen; Zhuang; Niu; Wu; Ying (2018): *Clostridium acetobutylicum* grows vegetatively in a biofilm rich in heteropolysaccharides and cytoplasmic proteins. In: *Biotechnology for biofuels* 11, S. 315. DOI: 10.1186/s13068-018-1316-4.

Long; Jones; Woods (1984): Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. In: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20 (4). DOI: 10.1007/BF00250635.

López; Alice; Heras; Rivas; Sánchez-Rivas (2006): Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. In: *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 3), S. 605–616. DOI: 10.1099/mic.0.28345-0.

López; Heras; Garda; Ruzal; Sánchez-Rivas; Rivas (2000): Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. In: *International Journal of Food Microbiology* 55 (1-3), S. 137–142. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00171-9.

López-Contreras; Kuit; Springer; Claassen (2012): Novel Strategies for Production of Medium and High Chain Length Alcohols. In: Patrick C. Hallenbeck (Hg.): *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*, Bd. 42. Boston, MA: Springer US, S. 183–211.

Maddox; Qureshi; Roberts-Thomson (1995): Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. In: *Process Biochemistry* 30 (3), S. 209–215. DOI: 10.1016/0032-9592(95)85001-5.

Madigan; Bender; Buckley; Sattley; Stahl (2019): *Brock biology of microorganisms*. 15th edition, global edition. New York, NY: Pearson.

Mahipant; Paemanee; Roytrakul; Kato; Vangnai (2017): The significance of proline and glutamate on butanol chaotropic stress in *Bacillus subtilis* 168. In: *Biotechnology for biofuels* 10, S. 122. DOI: 10.1186/s13068-017-0811-3.

Makarova; Mironov; Gelfand (2001): Conservation of the binding site for the arginine repressor in all bacterial lineages. In: *Genome biology* 2 (4), RESEARCH0013. DOI: 10.1186/gb-2001-2-4-research0013.

Masion; Amine; Marczak (1987): Influence of amino acid supplements on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. In: *FEMS Microbiology Letters* 43 (3), S. 269–274. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02156.x.

Mermelstein; Welker; Bennett; Papoutsakis (1992): Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 10 (2), S. 190–195. DOI: 10.1038/nbt0292-190.

Meyer; Papoutsakis (1989): Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 30 (5). DOI: 10.1007/BF00263849.

Mitchell (1998): Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. In: *Advances in microbial physiology* 39, S. 31–130. DOI: 10.1016/s0065-2911(08)60015-6.

Möke (2014): Anpassung von *Nodularia spumigena* CCY9414 an abiotische Stressfaktoren. Dissertation. **Universität Rostock**. Biowissenschaften.

Möller; Hippe; Gottschalk (1986): Degradation of various amine compounds by mesophilic clostridia. In: *Arch. Microbiol.* 145 (1), S. 85–90. DOI: 10.1007/BF00413032.

Monot; Martin; Petitdemange; Gay (1982): Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. In: *Applied and environmental microbiology* 44 (6), S. 1318–1324.

Morita; Nakamori; Takagi (2002): Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (5), S. 390–394. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80214-6.

Mortazavi; Williams; McCue; Schaeffer; Wold (2008): Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. In: *Nature methods* 5 (7), S. 621–628. DOI: 10.1038/nmeth.1226.

Müller; Oren (2003): Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. In: *Extremophiles : life under extreme conditions* 7 (4), S. 261–266. DOI: 10.1007/s00792-003-0332-9.

Mussatto (Hg.) (2016): Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Nimbalkar; Khedkar; Kulkarni; Chavan; Bankar (2019): Strategic intensification in butanol production by exogenous amino acid supplementation: Fermentation kinetics and thermodynamic studies. In: *Bioresource technology* 288, S. 121521. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121521.

Nölling; Breton; Omelchenko; Makarova; Zeng; Gibson et al. (2001): Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. In: *Journal of bacteriology* 183 (16), S. 4823–4838. DOI: 10.1128/JB.183.16.4823-4838.2001.

Novichkov; Kazakov; Ravcheev; Leyn; Kovaleva; Sutormin et al. (2013): RegPrecise 3.0--a resource for genome-scale exploration of transcriptional regulation in bacteria. Online verfügbar unter <https://regprecise.lbl.gov/>, zuletzt geprüft am 17.07.2020.

Okrend; Doetsch (1969): Plasmolysis and bacterial motility: a method for the study of membrane function. In: *Archiv für Mikrobiologie* 69 (1), S. 69–78. DOI: 10.1007/bf00408565.

Oppenheimer-Shaanan; Sibony-Nevo; Bloom-Ackermann; Suissa; Steinberg; Kartvelishvily et al. (2016): Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. In: *NPJ biofilms and microbiomes* 2, S. 15031. DOI: 10.1038/npjbiofilms.2015.31.

Oren (2013): Life at High Salt Concentrations. In: Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt und Fabiano Thompson (Hg.): *The Prokaryotes*, Bd. 52. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 421–440.

Papoutsakis (2008): Engineering solventogenic clostridia. In: *Current opinion in biotechnology* 19 (5), S. 420–429. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.08.003.

Perutka; Wang; Goerlitz; Lambowitz (2004): Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. In: *Journal of Molecular Biology* 336 (2), S. 421–439. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.12.009.

Petersohn; Brigulla; Haas; Hoheisel; Völker; Hecker (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 183 (19), S. 5617–5631. DOI: 10.1128/JB.183.19.5617–5631.2001.

Philips; Rabaey; Lovley; Vargas (2017): Biofilm Formation by *Clostridium ljungdahlii* Is Induced by Sodium Chloride Stress: Experimental Evaluation and Transcriptome Analysis. In: *PLoS one* 12 (1), e0170406. DOI: 10.1371/journal.pone.0170406.

Poolman; Glaasker (1998): Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. In: *Molecular microbiology* 29 (2), S. 397–407. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00875.x.

Potratz (2017): Rolle des Kdp-Systems von *Clostridium acetobutylicum* bei der Salzstressantwort. Masterarbeit. **Universität Rostock**, Rostock. Biowissenschaften.

Qureshi; Li; Hughes; Saha; Cotta (2006): Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. In: *Biotechnology progress* 22 (3), S. 673–680. DOI: 10.1021/bp050360w.

Qureshi; Saha; Hector; Cotta (2008): Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using *Clostridium beijerinckii* in batch reactors. In: *Biomass and Bioenergy* 32 (12), S. 1353–1358. DOI: 10.1016/j.biombioe.2008.04.009.

Reeve; Reid (2016): Glutamate and histidine improve both solvent yields and the acid tolerance response of *Clostridium beijerinckii* NCP 260. In: *Journal of applied microbiology* 120 (5), S. 1271–1281. DOI: 10.1111/jam.13067.

Ren; Gu; Wu; Zhang; Yang; Yang; Jiang (2012): Pleiotropic functions of catabolite control protein CcpA in Butanol-producing *Clostridium acetobutylicum*. In: *BMC genomics* 13, S. 349. DOI: 10.1186/1471-2164-13-349.

Riebe; Fischer; Wampler; Kurtz; Bahl (2009): Pathway for H₂O₂ and O₂ detoxification in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 1), S. 16–24. DOI: 10.1099/mic.0.022756-0.

Rojas; Huang; Theriot (2017): Homeostatic Cell Growth Is Accomplished Mechanically through Membrane Tension Inhibition of Cell-Wall Synthesis. In: *Cell systems* 5 (6), 578-590.e6. DOI: 10.1016/j.cels.2017.11.005.

Roth; Nester (1971): Co-ordinate control of tryptophan, histidine and tyrosine enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Molecular Biology* 62 (3), S. 577–589. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90157-4.

Ruzal; López; Rivas; Sánchez-Rivas (1998): Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. In: *Current microbiology* 36 (2), S. 75–79. DOI: 10.1007/s002849900282.

Ruzal; Sanchez-Rivas (1998): In *Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. In: *Current microbiology* 37 (6), S. 368–372. DOI: 10.1007/s002849900395.

Sachs (2013): General and Cross-Pathway Controls of Amino Acid Biosynthesis. In: Robert Brambl und George A. Marzluf (Hg.): *Biochemistry and Molecular Biology*. 1., neue Ausg. Berlin: Springer Berlin (The Mycota, 3), S. 315–345.

Sambrook; Russell (Hg.) (2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sander; Farke; Diehl; Kuntz; Glatter; Link (2019): Allosteric Feedback Inhibition Enables Robust Amino Acid Biosynthesis in *E. coli* by Enforcing Enzyme Overabundance. In: *Cell systems* 8 (1), 66-75.e8. DOI: 10.1016/j.cels.2018.12.005.

Sandoval; Papoutsakis (2016): Engineering membrane and cell-wall programs for tolerance to toxic chemicals: Beyond solo genes. In: *Current opinion in microbiology* 33, S. 56–66. DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.005.

Saum; Mingote; Santos; Müller (2009): A novel limb in the osmoregulatory network of *Methanosarcina mazei* Gö1: N(epsilon)-acetyl-beta-lysine can be substituted by glutamate and alanine. In: *Environmental microbiology* 11 (5), S. 1056–1065. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01826.x.

Saum; Pfeiffer; Palm; Rampp; Schuster; Müller; Oesterhelt (2013): Chloride and organic osmolytes: a hybrid strategy to cope with elevated salinities by the moderately halophilic, chloride-dependent bacterium *Halobacillus halophilus*. In: *Environmental microbiology* 15 (5), S. 1619–1633. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02770.x.

Schlegel; Jannasch (2006): Prokaryotes and Their Habitats. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): *The Prokaryotes*, Bd. 33. New York, NY: Springer New York, S. 137–184.

Schulz (2013): Fluoreszenzproteine in *Clostridium acetobutylicum* - Ein neues *in vivo* Reportersystem. Dissertation. **Universität Rostock**, Rostock. Biowissenschaften.

Senger; Papoutsakis (2008): Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. In: *Biotechnology and bioengineering* 101 (5), S. 1036–1052. DOI: 10.1002/bit.22010.

Serrano; Mulet; Rios; Marquez; Larrinoa; Leube et al. (1999): A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. In: *Journal of Experimental Botany* 50 (Special_Issue), S. 1023–1036. DOI: 10.1093/jxb/50.Special_Issue.1023.

Servinsky; Kiel; Dupuy; Sund (2010): Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. In: *Microbiology (Reading, England)* 156 (Pt 11), S. 3478–3491. DOI: 10.1099/mic.0.037085-0.

Setlow (2014): Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. In: *Journal of bacteriology* 196 (7), S. 1297–1305. DOI: 10.1128/JB.01455-13.

Shahjee; Banerjee; Ahmad (2002): Comparative analysis of naturally occurring L-amino acid osmolytes and their D-isomers on protection of *Escherichia coli* against environmental stresses. In: *J. Biosci.* 27 (5), S. 515–520. DOI: 10.1007/BF02705049.

Shin; Lee (2014): Metabolic engineering of microorganisms for the production of L-arginine and its derivatives. In: *Microbial cell factories* 13, S. 166. DOI: 10.1186/s12934-014-0166-4.

Southern (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *Journal of Molecular Biology* 98 (3), S. 503–517. DOI: 10.1016/s0022-2836(75)80083-0.

Spiegelhalter; Bremer (1998): Osmoregulation of the opuE proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. In: *Molecular microbiology* 29 (1), S. 285–296. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00929.x.

Steil; Hoffmann; Budde; Völker; Bremer (2003): Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. In: *Journal of bacteriology* 185 (21), S. 6358–6370. DOI: 10.1128/jb.185.21.6358-6370.2003.

Steiner; Dago; Young; Heap; Minton; Hoch; Young (2011): Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Molecular microbiology* 80 (3), S. 641–654. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07608.x.

Steiner; Scott; Minton; Winzer (2012): An *agr* quorum sensing system that regulates granulose formation and sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Applied and environmental microbiology* 78 (4), S. 1113–1122. DOI: 10.1128/AEM.06376-11.

Stutz; Quixley; McMaster; Reid (2007): Co-regulation of the nitrogen-assimilatory gene cluster in *Clostridium saccharobutylicum*. In: *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 9), S. 3081–3090. DOI: 10.1099/mic.0.2007/005371-0.

Supek; Bošnjak; Škunca; Šmuc (2011): REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms (7). Online verfügbar unter <http://revigo.irb.hr/>, zuletzt geprüft am 17.07.2020.

Szklarczyk; Gable; Lyon; Junge; Wyder; Huerta-Cepas et al. (2019): STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets (D1). Online verfügbar unter <https://string-db.org/>, zuletzt geprüft am 17.07.2020.

Taiz (1984): Plant Cell Expansion: Regulation of Cell Wall Mechanical Properties. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35 (1), S. 585–657. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.003101.

Takagi (2008): Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. In: *Applied microbiology and biotechnology* 81 (2), S. 211–223. DOI: 10.1007/s00253-008-1698-5.

Tatusov; Galperin; Natale; Koonin (2000): The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. In: *Nucleic acids research* 28 (1), S. 33–36. DOI: 10.1093/nar/28.1.33.

Tian; Guan; Goldfine (2013): An ethanolamine-phosphate modified glycolipid in *Clostridium acetobutylicum* that responds to membrane stress. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1831 (6), S. 1185–1190. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.03.005.

Treuner-Lange; Dürre (2005): Clostridial Potassium Transport Systems. In: Dürre Peter (Hg.): *Handbook on Clostridia*. 1st ed. Baton Rouge: Chapman and Hall/CRC, S. 277–286.

Treuner-Lange; Kuhn; Dürre (1997): The kdp system of *Clostridium acetobutylicum*: cloning, sequencing, and transcriptional regulation in response to potassium concentration. In: *Journal of bacteriology* 179 (14), S. 4501–4512. DOI: 10.1128/jb.179.14.4501-4512.1997.

Tummala; Welker; Papoutsakis (1999): Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *Applied and environmental microbiology* 65 (9), S. 3793–3799.

Valadez-Bustos; Aguado-Santacruz; Tiessen-Favier; Robledo-Paz; Muñoz-Orozco; Rascón-Cruz; Santacruz-Varela (2016): A reliable method for spectrophotometric determination of glycine betaine in cell suspension and other systems. In: *Analytical biochemistry* 498, S. 47–52. DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.015.

Venkataramanan; Jones; McCormick; Kunjeti; Ralston; Meyers; Papoutsakis (2013): The *Clostridium* small RNome that responds to stress: the paradigm and importance of toxic metabolite stress in *C. acetobutylicum*. In: *BMC genomics* 14, S. 849. DOI: 10.1186/1471-2164-14-849.

Vignais (2008): Hydrogenases and H⁺-reduction in primary energy conservation. In: *Results and problems in cell differentiation* 45, S. 223–252. DOI: 10.1007/400_2006_027.

Vollmer; Joris; Charlier; Foster (2008): Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. In: *FEMS Microbiol Rev* 32 (2), S. 259–286. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x.

Wahome; Cowan; Setlow; Setlow (2009): Levels and localization of mechanosensitive channel proteins in *Bacillus subtilis*. In: *Archives of microbiology* 191 (5), S. 403–414. DOI: 10.1007/s00203-009-0465-z.

Wallenius; Maaheimo; Eerikäinen (2016): Carbon 13-Metabolic Flux Analysis derived constraint-based metabolic modelling of *Clostridium acetobutylicum* in stressed chemostat conditions. In: *Bioresource technology* 219, S. 378–386. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.137.

Wang; Ho; Yen; Nagarajan; Ren; Li et al. (2017): Current advances on fermentative biobutanol production using third generation feedstock. In: *Biotechnology advances* 35 (8), S. 1049–1059. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.06.001.

Wang; Tian; Ji; Song; Li (2016): Intracellular metabolic changes of *Clostridium acetobutylicum* and promotion to butanol tolerance during biobutanol fermentation. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 78, S. 297–306. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.07.031.

Wang; Venkataraman; Huang; Papoutsakis; Wu (2013): Transcription factors and genetic circuits orchestrating the complex, multilayered response of *Clostridium acetobutylicum* to butanol and butyrate stress. In: *BMC systems biology* 7, S. 120. DOI: 10.1186/1752-0509-7-120.

Wargo (2013): Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (7), S. 2112–2120. DOI: 10.1128/AEM.03565-12.

Weber; Kögl; Jung (2006): Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 188 (20), S. 7165–7175. DOI: 10.1128/JB.00508-06.

Weizmann (1915): Improvements in the Bacterial Fermentation of Carbohydrates and in Bacterial Cultures for the same. Veröffentlichungsnr: 4845.

Weyer; Rettger (1927): A comparative study of six different strains of the organism commonly concerned in large-scale production of butyl alcohol and acetone by the biological process. In: *Journal of bacteriology* 14 (6), S. 399–424.

Whatmore; Chudek; Reed (1990): The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. In: *Journal of general microbiology* 136 (12), S. 2527–2535. DOI: 10.1099/00221287-136-12-2527.

Whatmore; Reed (1990): Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K^+ in turgor regulation. In: *Journal of general microbiology* 136 (12), S. 2521–2526. DOI: 10.1099/00221287-136-12-2521.

Wiesenborn; Rudolph; Papoutsakis (1989): Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. In: *Applied and environmental microbiology* 55 (2), S. 323–329.

Wietzke; Bahl (2012): The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 96 (3), S. 749–761. DOI: 10.1007/s00253-012-4112-2.

Winkelman; Bree; Bate; Eichenberger; Gourse; Kearns (2013): RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. In: *Molecular microbiology* 88 (5), S. 984–997. DOI: 10.1111/mmi.12235.

Wood (2011): Osmotic Stress. In: Gisela Storz und Regine Hengge (Hg.): *Bacterial stress responses*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, S. 133–156.

Xu; Labedan; Glansdorff (2007): Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 71 (1), S. 36–47. DOI: 10.1128/MMBR.00032-06.

Xu; Xu; Liu; Tan; Ye (2018): Protein Acetylation and Butyrylation Regulate the Phenotype and Metabolic Shifts of the Endospore-forming *Clostridium acetobutylicum*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 17 (6), S. 1156–1169. DOI: 10.1074/mcp.RA117.000372.

Xu; Zhao; Le Yu; Yang (2017): Comparative genomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* for understanding the mutations contributing to enhanced butanol tolerance and production. In: *Journal of biotechnology* 263, S. 36–44. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.10.010.

Xu; Zhou; Liu; Chen (2011): Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. In: *Process Biochemistry* 46 (6), S. 1230–1235. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.01.026.

Xue; Yang; Chen; Chen; Yang; Jiang; Gu (2016): Roles of three AbrBs in regulating two-phase *Clostridium acetobutylicum* fermentation. In: *Applied microbiology and biotechnology* 100 (21), S. 9081–9089. DOI: 10.1007/s00253-016-7638-x.

Xue; Zhao; Chen; Yang; Bai (2017): Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. In: *Biotechnology advances* 35 (2), S. 310–322. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.01.007.

Yan; Yu; Wang; Luo; Guo; Chai (2016): The *comER* Gene Plays an Important Role in Biofilm Formation and Sporulation in both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 1025. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01025.

Zaprasis; Bleisteiner; Kerres; Hoffmann; Bremer (2015): Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (1), S. 250–259. DOI: 10.1128/AEM.02797-14.

Zhang; Yang; Tan; Ye (2018): In situ examination of a charged amino acid-induced structural change in lipid bilayers by sum frequency generation vibrational spectroscopy. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 20 (8), S. 5657–5665. DOI: 10.1039/c7cp07389e.

Zhao; Condruz; Chen; Jolicoeur (2016): A quantitative metabolomics study of high sodium response in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. In: *Scientific reports* 6, S. 28307. DOI: 10.1038/srep28307.

Zhuang; Yang; Wu; Liu; Zhou; Chen; Ying (2016): Extracellular polymer substances and the heterogeneity of *Clostridium acetobutylicum* biofilm induced tolerance to acetic acid and butanol. In: *RSC Adv.* 6 (40), S. 33695–33704. DOI: 10.1039/C5RA24923F.

Zimmermann (2011): Charakterisierung einer *glgA*-Integrationsmutante *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Diplomarbeit. **Universität Rostock**, Rostock. Biowissenschaften.

Zou; Chen; Shi; Xian; Song; Liu (2016): The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism. In: *Applied microbiology and biotechnology* 100 (9), S. 3865–3876. DOI: 10.1007/s00253-016-7462-3.

7 Anhang

Tabelle 3 - Organismen

Organismus	relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	ATCC, Laborsammlung Nr. 258
<i>C. acetobutylicum</i> pTc	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824, pTc-Vektor ohne Insert, Amp ^R , Chl ^R	Schulz (2013), Laborsammlung Nr. 356
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>argR</i> 92a::CT	Gruppe II Intron integriert zw. 92./93. Bp von <i>argR</i> (<i>cac2074</i>), Ery ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 259
<i>C. acetobutylicum</i> <i>argR</i> 92a::CT_pTc:: <i>argR</i>	<i>argR</i> (<i>cac2074</i>) Mutante, pTc:: <i>argR</i> , Ery ^R , Chl ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 260
<i>C. acetobutylicum</i> pTc:: <i>argR</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824, pTc:: <i>argR</i> , C-terminaler Strep-tag II, Chl ^R , Amp ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 261
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169$, <i>hsdR17</i> , ($\varphi 80 lacZ\Delta M15$), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Grant <i>et al.</i> (1990), Laborsammlung Nr. 272
<i>E. coli</i> ER2275	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , <i>el4-</i> , $\Delta(lac)U169$, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(zbg10::Tn10) Tcs, $\Delta(mcr-hsd-mrr)114::1510$, [F', <i>proAB</i> , <i>laqlqZ\Delta2.15zzf::mini-Tn10</i> (Km ^R)]	NEB, Laborsammlung Nr. 271
<i>E. coli</i> DH5 α pTc:: <i>argR</i>	pTc:: <i>argR</i> , C-terminaler Strep-tag II, Amp ^R , Chl ^R	diese Arbeit, Laborsammlung Nr. 262

Tabelle 4 - Vektoren

Vektor	Größe (Bp)	Merkmale	Herkunft/Referenz
pTc:: <i>hydA</i>	6714	<i>thlA</i> -Promotor, <i>hydA</i> , Strep-tag II, Amp ^R , Chl ^R , repL, ColE1 ori, cyto-plasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Schulz (2013), Laborsammlung Nr. 286
pAN-II	7000	Tc ^R , $\Phi 3tI$; p15A oriR	Heap <i>et al.</i> (2007). Laborsammlung Nr. 271
pMTL007	11845	<i>fac</i> , ClosTron- <i>erm</i> RAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacI</i> , <i>oriT</i>	Heap <i>et al.</i> (2007), Laborsammlung Nr. 19
pMTL007C-E2	8926	<i>Csp fdx</i> , IBS, EBS2, EBS1d, ClosTron- <i>erm</i> RAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, <i>pCB102</i> , <i>catP</i> , ColE1, <i>lacZalpha</i> , <i>oriT</i> , Chl ^R	Heap <i>et al.</i> (2007), Laborsammlung Nr. 20

Tabelle 5 - Rekombinante Plasmide

Plasmid	Insertgröße (Bp)	Merkmale	Herkunft/Referenz
pMTL007C:: <i>argR</i>	350 Bp	pMTL007C-E2, <i>argR</i> Intron, <i>Hind</i> III / <i>Bsp</i> 1407I (<i>Bsr</i> GI)	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 263
pTc:: <i>argR</i>	453 Bp	<i>thlA</i> -Promotor, <i>argR</i> , <i>Strep</i> -tag II, Amp ^R , Chl ^R , repL, Cole1 ori, cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	diese Arbeit Laborsammlung Nr. 264

Tabelle 6 - Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')*	Verwendung
<i>argR</i> _92a_IBS	AAAAAAAGCTTATAATTATCCTTAACCTCCATACC AGTGCGCCAGATAGGGTG	<i>argR</i> -spezifische Primer ClosTron®
<i>argR</i> _92a_EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGT CATACCACTTAACCTACCTTCTTGT	
<i>argR</i> _92a_EBS2	TGAACGCAAGTTCTAATTGATTGAAGTTCGA TAGAGGAAAGTGTCT	
EBS Universal	CGAAATTAGAAACTTGCCTTCAGTAAAC	Intron-spezifischer Primer ClosTron®
<i>erm</i> RAM_fw	ACGCGTTATTGATAAAAATAATAATAGTGGG	RAM-spezifische Sonde, Southern Blot
<i>erm</i> RAM_rev	ACGCGTGCAGACTCATAGAATTATTCCTCCCG	
pT_seq_fw	GGGATAAACTATGGAACCTATGAAA	Sequenzierung Insert pT- Vektor
pT_seq_rev	TGCAAGAATGTGAGAGCTAGAAA	
Eub 1	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	sqRT-PCR-16S
Eub 2	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	
<i>argR</i> _fw_BamHI	AAAAAA <u>AGGATC</u> CTGAAGGTATCAAGACATAC	Klonierung/Überexpression von <i>argR</i>
<i>argR</i> _rev_Cfr9I	AAAAAA <u>ACCGGG</u> TTCAATCATCTTTTCAGC	

* unterstrichene Basen symbolisieren entsprechende Restriktionsschnittstellen.

Tabelle 7 - Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz*	Puffersystem
<i>Bam</i> HI	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'	10x <i>Bam</i> HI -Puffer
<i>Cfr</i> 9I (<i>Xma</i> I)	5'-C↓CCGGG-3' 3'-GGGCC↑C-5'	10x <i>Cfr</i> 9I-Puffer
<i>Pst</i> I	5'-CTGCA↓G-3' 3'-G↑ACGTC-5'	Orange Buffer
FastDigest <i>Sma</i> I	5'-CCC↓GGG-3' 3'-GGG↑CCC-5'	10x FastDigest Green Buffer
FastDigest <i>Bam</i> HI	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'	10x FastDigest Green Buffer

Tabelle 7 - Restriktionsendonukleasen (Fortsetzung)

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz*	Puffersystem
<i>Hind</i> III	5'-A↓AGCCT-3' 3'-TTCGG↑A-5'	10x Tango TM
<i>Bsp</i> 1407I (<i>Bsr</i> GI)	5'-T↓GTACA-3' 3'-ACATG↑T-5'	10x Tango TM
<i>Fnu</i> 4HI (<i>Sat</i> I)	5'-GC↓NGC-3' 3'-CGN↑CG-5'	1x Puffer G, 1x Tango TM
<i>Sac</i> I	5'-GAGCT↓C-3' 3'-C↑TCGAG-5'	1x <i>Sac</i> I-Puffer, 1x Tango TM
<i>Nhe</i> I	5'-G↓CTAGC-3' 3'-CGATC↑G-5'	1x Tango TM

* ↓↑ = Restriktionsschnittstelle

Tabelle 8 - Antibiotika

Medienzusatz	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in <i>A. dest.</i> (sterilfiltriert)*	100 µg/ml
Chloramphenicol (Chl)	34 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])**	25 µg/ml
Erythromycin (Ery)	50 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])**	20 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 in Ethanol (96 % [v/v])**	10 µg/ml
Thiamphenicol (Tm)	50 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])*	15 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)*	40 µg/ml

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

** In Ethanol oder DMF gelöste Substanzen brauchten nicht sterilfiltriert werden.

Tabelle 9 - Bezugsquellen für Chemikalien

Hersteller	Produkt
AppliChem GmbH, Darmstadt	Agarose, Ammoniumsulfat, Ammoniumhydroxid, Ampicillin, Asparagin, β-NADH, DNase I, Erythromycin, Ethidiumbromid, Glukose, Glycin, Lysozym, MES, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Proteinase K, RNase A, SDS, Tris
Biolab Inc., Lawrenceville (USA)	Hefeextrakt, Trypton
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Brilliant Blue G-250, Tris
Chemos GmbH, Regenstauf	Thiamphenicol
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm	GelRed
Merck KGaA, Darmstadt	Chloramphenicol, Magnesiumsulfat, Mangansulfat, PABA
Oxoid GmbH, Wesel	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Pwo-Polymerase I
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	NBT/ BCIP, Hexokinase/ Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Tabelle 10 - Bezugsquellen für Geräte und Materialien

Hersteller	Geräte/ Materialien
Agilent Technologies GmbH, Böblingen	Gaschromatograph Agilent 7890A, EZ Chrom Elite
Biometra GmbH, Göttingen	Agarosegelektrophorese-Kammern, Blotting-Apparatur, Nitrocellulosemembran, PCR-Cyklus, Power Pack P25,
Biorad GmbH, München	Elektroporationsgerät Gene-Pulser™ II, Pulse Controller Plus, Capacitance Extender Plus, Blottingpapier
Biostep GmbH, Jahnsdorf	Geldokumentationsanlage Dark Hood DH+50
Braun AG, Melsungen	Sterican® Einmalkanülen
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena	Stereomikroskop Stemi 305, Mikroskop Primo Star
Eppendorf Research AG, Hamburg	Reaktionsgefäß, Thermomixer Comfort
GE Healthcare GmbH, Solingen	Photometer Ultrospec 3000
Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm	Gel Extraction Kit, Plasmid Plus DNA Purification Mini Prep Kit
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	Wasserbäder
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach	Magnetrührer „MR Hei-Standard“
Implen GmbH, München	Spektalphotometer NanoPhotometer® N60/N50
Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim	Quarzglas-Präzisionsküvetten (10 mm)
Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen	NORM-JECT® Einwegspritzen
Heraeus-Holding GmbH, Hanau	Tischzentrifuge Biofuge fresco
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold	Sorvall RC 6C Plus Zentrifuge
KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin	4,6x150 mm Hypersil 120 3U ODS-Säule
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren	Spektalphotometer Nanocolor® VIS
Medserv GmbH, Leipzig	Zentrifuge Sigma 3K30 und Sigma 2-16 PK
Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte	MACS-MG-500/MG-1000-anaerobic workstation
Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach	Brutschrank
Mettler-Toledo GmbH, Giessen	pH Meter SevenEasy Analysenwaage XA 205
Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen	Thermodrucker P95
Müller&Kempel AG, Bülach	Müller&Kempel Serumflaschen
MWG-Biotech AG, Ebersberg	Geldokumentationsanlage TFP-M/WL
New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen	Inkubationsschüttler InnovaTM 4230 Refrigerated Incubator Shaker

Tabelle 10 - Bezugsquellen für Geräte und Materialien (Fortsetzung)

Hersteller	Geräte/ Materialien
Ochs Laborfachhandel e. K., Bovenden	Hybridisierungs- und Hungateröhrchen, Schikane-Kulturkolben
Nikon GmbH, Düsseldorf	Nikon Eclipse Ni-U Aufrecht-Mikroskop
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Elektroporationsküvetten
Sartorius AG, Göttingen	Biostat B Plus Twin Fermenter
Sarstedt AG & Co., Nürnberg	50-ml Röhrchen, 0,2 µm Sterilfilter, Plastikküvetten, Einmal-Impfösen, Einmal-Spatel
Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)	Reagenzglasschüttler Vortex-Genie 2
Störk-Tronic Störk GmbH & Co. KG, Stuttgart	Heizblock Thermoblock 1.0
Thermo Savant, Illkirch (Frankreich)	FastPrep® FP120 Cell Disrupter
Thermo Scientific Inc., Braunschweig	dNTPs, Fast-AP, GeneRuler 1kB DNA Ladder, Mass Ruler (SM403), Restriktionsenzyme, Protein Molecular Weight Marker (SM0431, SM0672), T4-DNA-Ligase
Tuttnauer Europe B.V., Breda (Niederlande)	Tischautoklav Systek DB-45
UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg	UNITWIST RT Rocking Table Shaker
WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim	pH-Messgerät WTW pH 526
Zirbus technology GmbH, Bad Grund	Gefriertrockner VaCo1 mit Vakuum-Konzentrator NV2150

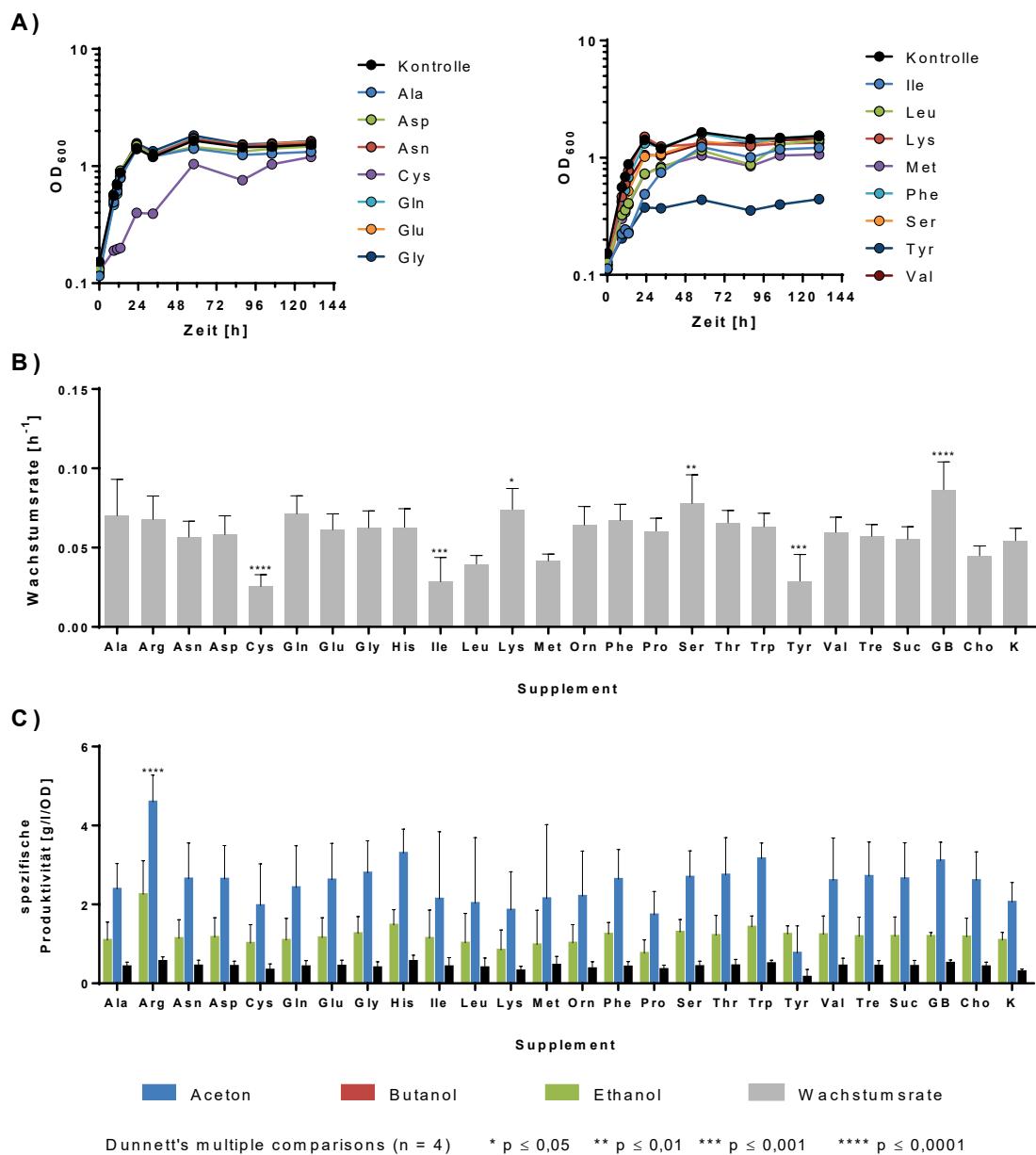


Abbildung 7.1 - Einfluss von Aminosäuren auf das Wachstum von *C. acetobutylicum* bei 300 mM NaCl.

(A) Optische Dichte bei 600 nm, (B) Wachstumsrate und (C) spezifische Produktivität der supplementierten *C. acetobutylicum*-Kulturen im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle. 10 ml MS-MES mit 300 mM NaCl und 1 mM kompatibles Solut, 130 h, 37 °C, n = 4.

Zeit [h]	ohne NaCl			100 mM NaCl			200 mM NaCl			300 mM NaCl			400 mM NaCl			500 mM NaCl		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	N	MW	SD	n
OD ₆₀₀																		
0	0.200	0.031	16	0.203	0.046	8	0.190	0.043	8	0.203	0.053	16	0.174	0.048	6	0.190	0.053	6
5	0.269	0.043	6	0.238	0.039	6	0.240	0.061	6	0.265	0.064	8	0.194	0.050	6	0.190	0.054	6
9	0.673	0.130	16	0.809	0.060	8	0.603	0.081	8	0.442	0.095	16	0.253	0.036	6	0.217	0.056	6
11	1.212	0.308	16	1.154	0.191	8	0.964	0.143	8	0.637	0.186	16	0.304	0.027	6	0.213	0.052	6
13	1.630	0.464	16	1.655	0.393	6	1.445	0.320	6	0.778	0.321	14	0.358	0.032	4	0.212	0.070	4
15	1.920	0.583	16	1.888	0.147	6	1.744	0.382	6	1.061	0.447	14	0.389	0.065	4	0.227	0.065	4
19	2.552	0.746	16	2.851	0.274	8	2.637	0.559	8	1.602	0.440	10	0.475	0.027	6	0.216	0.056	6
21	2.958	0.899	14	3.223	0.597	6	3.344	0.303	6	1.662	0.684	12	0.480	0.048	4	0.217	0.070	4
23	3.327	0.713	14	3.894	0.354	4	3.718	0.171	6	2.026	0.355	12	0.514	0.016	4	0.227	0.052	4
33	3.587	0.792	16	3.376	0.695	8	3.368	0.155	8	1.967	0.623	16	0.542	0.055	6	0.208	0.044	6
38	4.283	0.748	16	3.754	0.815	8	3.151	0.231	8	1.821	0.531	12	0.592	0.064	6	0.215	0.045	6
57	5.450	0.308	16	5.075	0.493	8	2.475	0.165	8	1.825	0.481	16	0.688	0.058	6	0.234	0.042	6
67	5.715	0.659	14	5.250	0.107	8	1.973	0.167	8	1.896	0.179	12	0.778	0.137	6	0.249	0.054	6
81	5.767	0.762	16	5.441	1.109	8	1.719	0.246	8	1.901	0.260	14	0.818	0.145	6	0.262	0.065	6
91	5.789	0.834	12	4.978	0.332	6	1.985	0.606	6	2.227	0.152	10	0.977	0.017	4	0.303	0.110	4
105	5.697	0.698	16	5.688	0.549	6	2.870	1.109	6	2.209	0.397	12	0.992	0.131	6	0.330	0.144	4
110	5.968	0.783	8	5.650	0.657	8	3.271	1.261	8	2.708	0.346	12	1.124	0.097	4	0.324	0.106	6
114	5.778	1.147	6	5.350	0.486	4	4.055	1.392	6	2.710	0.549	4	1.290	0.416	6	0.355	0.150	4
130	5.023	0.859	14	5.098	0.853	6	4.572	0.703	6	3.294	0.992	14	1.358	0.359	6	0.391	0.143	4
pH-Wert																		
0	5.220	0.062	8	5.153	0.062	4	5.083	0.051	3	5.143	0.023	6	5.115	0.058	4	5.115	0.042	4
5	5.195	0.084	4	5.150	0.066	3	5.060	0.046	3	5.130	0.010	3	5.080	0.026	3	5.080	0.040	3
9	5.059	0.051	8	4.940	0.062	4	4.940	0.079	3	5.032	0.034	6	5.055	0.077	4	5.078	0.025	4
11	5.009	0.071	8	4.858	0.082	4	4.833	0.049	3	4.995	0.068	6	5.015	0.082	4	5.093	0.029	4
13	4.894	0.069	7	4.767	0.132	3	4.715	0.007	2	4.978	0.105	5	4.973	0.136	3	5.067	0.021	3
15	4.813	0.057	7	4.713	0.101	3	4.640	0.042	2	4.922	0.115	5	4.957	0.161	3	5.090	0.035	3
17	4.795	0.054	4	4.653	0.083	4	4.617	0.081	3	4.853	0.108	4	4.933	0.144	4	5.083	0.031	3
19	4.733	0.119	4	4.635	0.062	4	4.563	0.025	3	4.800	0.128	4	4.893	0.155	4	5.085	0.026	4
23	4.705	0.035	2	4.580	0.057	2	4.485	0.021	2	4.675	0.106	2	4.887	0.240	3	5.077	0.042	3
33	4.690	0.050	8	4.590	0.033	4	4.490	0.026	3	4.673	0.112	6	4.778	0.164	4	5.048	0.028	4
38	4.710	0.027	4	4.648	0.017	4	4.510	0.026	3	4.672	0.119	5	4.755	0.123	4	5.028	0.033	4
43	4.723	0.038	4	4.645	0.026	4	4.523	0.032	3	4.655	0.138	4	4.718	0.114	4	5.028	0.039	4
57	4.769	0.059	8	4.648	0.034	4	4.537	0.015	3	4.658	0.100	6	4.693	0.054	4	4.990	0.024	4
62	4.780	0.037	4	4.675	0.019	4	4.537	0.015	3	4.665	0.121	4	4.678	0.031	4	4.983	0.036	4
67	4.778	0.038	4	4.698	0.057	4	4.523	0.025	3	4.658	0.127	4	4.663	0.060	4	4.950	0.022	4
81	4.770	0.046	8	4.750	0.064	4	4.543	0.042	3	4.652	0.087	6	4.633	0.043	4	4.920	0.050	4
86	4.787	0.059	3	4.757	0.032	3	4.540	0.042	2	4.657	0.127	3	4.607	0.031	3	4.880	0.046	3
91	4.740	0.020	3	4.753	0.015	3	4.535	0.049	2	4.657	0.127	3	4.593	0.025	3	4.867	0.055	3
105	4.721	0.078	7	4.727	0.055	3	4.623	0.023	3	4.644	0.082	5	4.567	0.021	3	4.820	0.100	3
110	4.683	0.054	4	4.735	0.056	4	4.727	0.015	3	4.668	0.076	4	4.553	0.022	4	4.825	0.086	4
114	4.660	0.014	2	4.710	0.096	3	4.715	0.007	2	4.635	0.106	2	4.530	0.017	3	4.793	0.081	3
130	4.760	0.089	7	4.747	0.045	3	4.720	0.036	3	4.642	0.043	5	4.510	0.010	3	4.757	0.067	3
Acetat																		
0	50.824	11.761	3	50.004	13.028	3	41.132	0.783	3	58.951	10.222	3	53.025	12.427	3	57.416	9.900	3
9	50.318	13.040	3	54.326	13.469	3	43.025	0.887	3	61.862	11.544	3	54.219	10.628	3	61.072	10.928	3
13	53.207	13.733	3	54.535	12.349	3	42.605	1.080	3	59.807	9.290	3	52.208	15.579	3	58.785	11.634	3
17	53.181	14.632	3	51.105	13.451	3	39.172	0.566	3	57.579	12.746	3	47.457	16.377	3	57.439	14.502	3
19	51.510	15.121	3	50.528	14.129	3	43.862	1.923	3	57.318	12.453	3	48.156	12.770	3	56.688	11.277	3
23	51.156	15.925	3	47.036	15.213	3	46.773	10.223	3	57.319	12.879	3	49.254	13.264	3	59.486	10.855	3
33	44.729	12.638	3	45.214	13.642	3	46.044	11.385	3	55.184	10.038	3	52.634	13.497	3	56.678	12.648	3
43	38.575	10.737	3	42.103	10.514	3	46.327	10.635	3	54.561	9.509	3	51.106	15.209	3	59.259	12.387	3
57	34.302	14.891	3	39.501	10.075	3	44.069	11.624	3	55.679	9.407	3	49.951	14.876	3	59.303	12.665	3
67	26.627	7.287	3	34.370	6.185	3	45.021	11.421	3	53.910	7.250	3	50.491	12.540	3	59.451	13.459	3
81	24.388	7.520	3	29.904	0.576	3	43.723	9.833	3	54.165	4.731	3	49.148	12.934	3	59.214	11.812	3
91	21.384	6.799	3	25.128	4.844	3	43.510	10.801	3	49.363	10.981	3	50.967	12.896	3	55.775	16.299	3
105	20.376	7.250	3	25.988	6.391	3	35.617	12.428	3	50.481	7.324	3	52.866	16.030	3	54.272	9.537	3
114	19.960	7.569	3	26.295	7.280	3	33.083	11.648	3	53.241	0.752	3	51.814	10.928	3	54.492	26.023	3
130	20.629	7.701	3	25.060	6.878	3	31.463	11.980	3	42.154	6.013	3	50.938	11.524	3	58.391	14.313	3

(Fortsetzung nächste Seite)

Butyrat															
0	3.719	0.576	3	2.634	0.189	3	1.607	0.804	3	2.817	0.202	3	2.691	0.198	3
9	5.980	0.142	3	9.580	1.358	3	7.854	0.825	3	7.061	0.977	3	5.044	0.807	3
13	9.678	0.655	3	16.834	2.660	3	15.336	2.512	3	11.689	2.266	3	5.738	1.149	3
17	15.613	1.050	3	23.211	2.709	3	20.878	2.351	3	15.481	2.304	3	7.008	1.705	3
19	19.761	2.176	3	22.413	2.316	3	25.435	2.291	3	17.809	3.008	3	8.010	2.144	3
23	20.777	0.292	3	24.084	1.379	3	27.985	0.959	3	20.853	3.735	3	9.428	2.589	3
33	19.412	0.997	3	22.185	0.592	3	29.623	1.790	3	24.048	3.020	3	12.589	2.963	3
43	16.800	2.018	3	21.520	0.617	3	26.751	0.641	3	24.749	2.817	3	13.313	1.631	3
57	12.411	2.463	3	18.088	1.100	3	23.824	0.564	3	25.631	2.253	3	15.353	0.489	3
67	8.881	1.238	3	14.178	2.320	3	24.645	1.295	3	25.109	2.467	3	16.075	0.718	3
81	7.444	0.363	3	11.234	1.748	3	23.438	1.558	3	25.574	3.320	3	17.185	0.895	3
91	6.531	0.376	3	7.391	1.440	3	21.689	2.412	3	21.836	1.770	3	18.231	1.045	3
105	5.685	0.461	3	7.167	1.566	3	10.444	2.279	3	20.363	2.463	3	19.759	2.006	3
114	5.602	0.552	3	8.362	1.377	3	10.577	3.707	3	19.582	4.648	3	19.789	2.251	3
130	5.874	0.611	3	7.950	0.901	3	8.465	1.601	3	10.483	1.618	3	19.352	2.863	3
Aceton															
0	0.000	0.000	3	0.424	0.735	3	0.333	0.577	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3
9	0.641	0.557	3	1.516	0.367	3	1.297	0.182	3	1.418	0.353	3	1.240	0.551	3
13	1.298	0.324	3	2.997	1.268	3	2.878	0.863	3	1.949	1.036	3	0.964	0.841	3
17	3.228	1.422	3	8.659	4.216	3	6.174	0.922	3	3.026	1.265	3	1.021	0.891	3
19	6.538	4.368	3	9.024	3.507	3	7.877	0.340	3	3.892	1.665	3	1.224	1.084	3
23	10.597	5.116	3	19.562	9.243	3	11.676	1.090	3	5.543	2.588	3	1.492	1.325	3
33	31.302	6.665	3	33.108	4.521	3	20.777	2.542	3	9.101	2.380	3	2.550	1.485	3
43	46.443	11.120	3	44.259	5.316	3	24.104	3.550	3	10.450	2.400	3	3.065	1.196	3
57	67.832	5.678	3	60.673	5.361	3	29.888	2.766	3	11.967	1.336	3	4.459	0.466	3
67	89.730	14.935	3	77.763	8.564	3	32.565	5.010	3	15.481	4.867	3	5.153	1.017	3
81	105.586	2.601	3	105.712	19.454	3	33.241	4.285	3	18.157	8.371	3	6.294	2.196	3
91	128.828	19.166	3	115.986	14.059	3	37.944	8.303	3	21.241	13.517	3	7.717	2.419	3
105	144.178	8.342	3	137.946	9.327	3	74.712	26.070	3	26.469	12.165	3	10.491	4.303	3
114	147.286	6.522	3	156.462	20.980	3	90.812	22.402	3	33.401	6.158	3	12.888	4.121	3
130	148.228	5.926	3	156.710	21.731	3	109.430	21.342	3	50.504	18.170	3	16.743	3.908	3
Butanol															
0	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3
9	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3
13	0.000	0.000	3	1.458	1.289	3	1.250	1.238	3	0.200	0.346	3	0.000	0.000	3
17	0.217	0.375	3	5.704	3.143	3	3.632	1.395	3	1.711	1.498	3	0.000	0.000	3
19	1.832	1.602	3	6.168	3.551	3	5.220	0.821	3	2.235	2.113	3	0.000	0.000	3
23	6.657	1.440	3	17.397	9.814	3	10.457	1.355	3	4.174	3.780	3	0.976	0.891	3
33	36.014	8.372	3	32.554	2.285	3	21.869	2.458	3	8.568	5.534	3	1.271	1.324	3
43	55.765	11.653	3	45.685	3.685	3	26.617	3.666	3	9.876	5.834	3	1.705	1.527	3
57	105.203	31.031	3	67.085	5.496	3	34.472	3.188	3	11.486	5.630	3	2.969	0.593	3
67	138.018	19.082	3	86.606	19.668	3	35.817	3.780	3	15.096	3.325	3	3.536	0.590	3
81	179.095	42.326	3	117.958	33.971	3	37.800	1.788	3	17.857	5.659	3	4.662	1.605	3
91	208.014	20.289	3	135.609	35.184	3	42.634	5.630	3	21.871	12.451	3	5.812	2.238	3
105	225.932	29.405	3	163.033	18.249	3	85.358	20.755	3	28.959	12.189	3	9.834	5.071	3
114	227.724	31.959	3	182.675	10.719	3	105.806	11.159	3	37.919	9.034	3	12.675	5.591	3
130	228.941	32.306	3	183.038	14.214	3	135.619	7.335	3	65.161	26.197	3	18.231	7.197	3
Ethanol															
0	0.730	1.264	3	0.406	0.703	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.850	1.472	3
9	0.638	1.105	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	1.210	2.096	3
13	0.723	1.252	3	1.970	0.458	3	1.152	1.107	3	0.509	0.882	3	1.133	1.963	3
17	2.337	0.160	3	3.435	1.462	3	2.457	0.729	3	0.684	1.185	3	1.615	1.563	3
19	2.992	0.374	3	2.953	1.061	3	3.017	0.440	3	2.061	0.522	3	1.133	1.963	3
23	4.158	0.853	3	5.392	1.804	3	4.558	0.860	3	2.788	1.284	3	0.400	0.693	3
33	11.789	3.667	3	7.996	0.617	3	7.017	1.259	3	4.173	1.725	3	1.698	0.041	3
43	15.865	6.141	3	10.493	1.296	3	7.403	1.067	3	4.654	2.153	3	2.080	0.683	3
57	33.113	18.294	3	15.333	1.159	3	9.138	1.401	3	5.129	1.870	3	2.024	0.395	3
67	44.793	20.289	3	18.057	2.547	3	9.017	1.274	3	5.627	1.007	3	2.427	0.906	3
81	63.134	36.296	3	26.122	7.729	3	9.911	1.230	3	5.573	0.337	3	2.698	0.808	3
91	71.868	29.583	3	29.967	6.810	3	10.203	0.804	3	5.920	1.841	3	3.050	1.301	3
105	78.235	29.493	3	37.012	1.739	3	19.200	4.214	3	7.431	1.120	3	3.888	2.012	3
114	78.933	29.637	3	43.625	9.086	3	26.290	5.518	3	8.753	1.455	3	4.158	1.564	3
130	79.003	28.149	3	43.597	9.653	3	32.179	1.204	3	14.275	5.883	3	5.246	1.846	3

(Fortsetzung nächste Seite)

Glukose																		
0	57.660	11.714	6	57.615	12.352	6	54.461	1.696	5	53.852	8.590	6	53.896	8.072	4	54.622	3.460	5
9	48.700	7.266	6	50.805	10.740	6	46.397	6.907	5	52.060	8.301	6	53.695	3.339	4	57.203	6.012	5
33	38.261	6.150	6	42.427	13.047	6	35.214	9.364	5	42.965	9.634	6	53.964	2.337	4	56.921	8.068	4
57	28.180	5.622	6	30.913	5.298	6	30.698	7.820	5	45.026	9.868	6	50.402	4.479	4	52.741	2.873	5
81	16.353	4.162	6	21.818	3.325	6	31.935	4.734	5	41.755	8.269	6	50.066	3.688	4	54.945	4.456	5
105	2.285	1.689	6	8.871	3.752	6	27.688	10.508	5	39.470	6.470	6	48.520	3.013	4	44.784	7.346	5
130	0.135	0.225	6	5.466	0.715	6	18.817	13.700	5	26.926	4.582	6	47.243	2.121	4	52.149	3.551	5

Abbildung 7.2 - Statistik von Wachstum und Fermentationsprodukten des Wildtyps.

Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Anzahl der Replikate (n) der durchgeföhrten Experimente.

Zeit [h]	ohne NaCl			100 mM NaCl			200 mM NaCl			300 mM NaCl			400 mM NaCl			500 mM NaCl		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
OD₆₀₀																		
0	0.123	0.001	2	0.120	0.000	2	0.131	0.000	2	0.118	0.001	2	0.106	0.001	2	0.125	0.001	2
9	0.771	0.000	2	0.757	0.000	2	0.687	0.001	2	0.311	0.003	2	0.130	0.001	2	0.124	0.001	2
11	1.501	0.014	2	0.960	0.004	2	0.935	0.009	2	0.443	0.004	2	0.150	0.001	2	0.117	0.001	2
14	1.981	0.028	2	1.250	0.006	2	1.176	0.021	2	0.715	0.004	2	0.179	0.002	2	0.116	0.005	2
15	2.446	0.064	2	1.293	0.001	2	1.257	0.003	2	0.824	0.002	2	0.207	0.001	2	0.114	0.001	2
19	3.276	0.021	2	3.855	0.007	2	3.325	0.007	2	2.155	0.007	2	0.370	0.001	2	0.120	0.001	2
33	4.411	0.028	2	4.355	0.049	2	3.490	0.000	2	2.490	0.000	2	0.485	0.002	2	0.124	0.000	2
38				4.605	0.035	2	3.535	0.007	2	2.580	0.000	2	0.568	0.000	2	0.145	0.000	2
62	5.821	0.297	2	6.090	0.028	2	3.955	0.021	2	2.670	0.000	2	0.736	0.004	2	0.183	0.001	2
84	7.160	0.000	2	6.630	0.014	2	4.335	0.007	2	2.835	0.007	2	0.881	0.000	2	0.246	0.004	2
105	6.965	0.007	2	6.870	0.014	2	4.870	0.028	2	3.020	0.000	2	1.064	0.001	2	0.325	0.001	2
130	6.205	0.021	2	6.125	0.007	2	5.715	0.007	2	3.755	0.007	2	1.203	0.005	2	0.404	0.001	2
274	5.915	0.007	2	5.395	0.007	2	5.630	0.014	2	4.945	0.007	2	2.490	0.014	2	0.739	0.004	2
350	5.830	0.071	2	5.820	0.014	2	5.720	0.028	2	5.120	0.057	2	2.540	0.000	2	0.955	0.049	2
443	5.665	0.035	2	5.695	0.021	2	5.905	0.021	2	5.110	0.042	2	2.770	0.028	2	1.210	0.000	
pH-Wert																		
0	5.165	0.021	2	5.125	0.035	2	5.090	0.014	2	5.060	0.028	2	5.075	0.035	2	5.055	0.035	2
9	5.025	0.007	2	4.870	0.028	2	4.855	0.049	2	4.965	0.035	2	5.045	0.021	2	5.045	0.007	2
11	4.965	0.021	2	4.755	0.021	2	4.730	0.014	2	4.890	0.014	2	4.985	0.007	2	5.045	0.007	2
14	4.815	0.092	2	4.605	0.021	2	4.555	0.007	2	4.755	0.049	2	4.955	0.007	2	5.040	0.014	2
15	4.745	0.049	2	4.570	0.014	2	4.510	0.014	2	4.660	0.028	2	4.945	0.007	2	5.050	0.000	2
19	4.625	0.007	2	4.480	0.014	2	4.430	0.014	2	4.545	0.021	2	4.860	0.028	2	5.055	0.007	2
33	4.700	0.014	2	4.485	0.007	2	4.370	0.014	2	4.420	0.028	2	4.730	0.028	2	5.040	0.014	2
38				4.520	0.028	2	4.395	0.007	2	4.375	0.021	2	4.695	0.007	2	5.005	0.007	2
62	4.815	0.007	2	4.575	0.021	2	4.440	0.000	2	4.410	0.014	2	4.620	0.014	2	4.940	0.014	2
84	4.775	0.035	2	4.650	0.014	2	4.505	0.007	2	4.420	0.014	2	4.555	0.007	2	4.845	0.021	2
105	4.755	0.007	2	4.615	0.035	2	4.500	0.028	2	4.395	0.007	2	4.535	0.021	2	4.720	0.014	2
130	4.680	0.014	2	4.585	0.007	2	4.495	0.007	2	4.405	0.007	2	4.475	0.007	2	4.640	0.028	2
274	4.640	0.014	2	4.430	0.028	2	4.465	0.007	2	4.435	0.007	2	4.430	0.028	2	4.445	0.021	2
350	4.635	0.007	2	4.430	0.028	2	4.465	0.007	2	4.455	0.007	2	4.340	0.014	2	4.435	0.007	2
443	4.650	0.014	2	4.340	0.028	2	4.365	0.007	2	4.350	0.014	2	4.340	0.000	2	4.365	0.021	2
Acetat																		
0	51.684	1.216	2	45.925	5.770	2	41.581	0.634	2	49.775	9.176	2	46.457	9.289	2	47.407	14.155	2
9	52.092	2.510	2	49.138	7.336	2	43.114	0.126	2	52.120	9.743	2	48.467	8.134	2	51.104	14.098	2
14	57.190	5.633	2	47.881	9.411	2	42.148	0.646	2	49.748	10.060	2	46.557	7.991	2	49.539	13.076	2
17	54.599	2.005	2	46.700	6.230	2	39.394	0.314	2	49.073	8.505	2	45.312	3.034	2	49.354	14.330	2
33	42.524	3.118	2	41.075	5.853	2	43.444	3.678	2	48.190	6.995	2	45.821	9.635	2	50.118	12.990	2
62	24.830	2.542	2	31.805	3.628	2	42.039	4.217	2	48.142	5.767	2	45.514	7.038	2	47.947	9.256	2
130	19.796	1.178	2	21.129	5.560	2	30.146	1.862	2	39.756	2.397	2	45.076	8.289	2	50.607	11.009	2
274	16.630	0.000	1	20.258	0.000	1	26.141	0.000	1	35.434	4.881	2	37.882	0.000	1	44.119	0.000	1
350	16.440	0.000	1	21.655	0.000	1	26.849	0.000	1	34.721	5.700	2	37.539	0.000	1	44.154	0.000	1
443	17.485	2.856	2	24.390	4.641	2	29.809	5.197	2	35.547	5.213	2	43.657	8.742	2	49.694	8.794	2

(Fortsetzung nächste Seite)

Aceton															
0	0.319	0.451	2	0.212	0.300	2	0.167	0.235	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2
9	0.583	0.081	2	1.427	0.125	2	1.271	0.037	2	0.709	0.709	2	0.620	0.877	2
14	2.266	1.368	2	4.066	1.511	2	3.374	0.702	2	1.615	0.334	2	0.482	0.682	2
17	9.716	9.175	2	10.482	2.578	2	6.688	0.726	2	3.095	0.068	2	0.511	0.722	2
33	41.678	14.674	2	37.921	6.806	2	22.079	1.840	2	10.129	1.028	2	2.451	0.139	2
62	96.044	8.929	2	88.953	15.824	2	35.104	3.591	2	15.012	0.468	2	5.043	0.156	2
130	148.228	0.000	1	163.172	9.138	2	113.366	5.565	2	47.463	3.042	2	18.840	2.965	2
274	159.578	0.000	1	216.901	0.000	1	181.021	0.000	1	97.542	14.203	2	53.700	0.000	1
350	165.550	0.000	1	210.841	0.000	1	188.665	0.000	1	98.345	11.618	2	60.039	0.000	1
443	183.482	21.934	2	218.522	4.919	2	190.731	3.041	2	106.757	10.403	2	64.757	2.652	2
Butanol															
0	0.389	0.551	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2
9	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2
14	0.000	0.000	2	2.239	1.104	2	1.863	0.866	2	0.100	0.100	2	0.000	0.000	2
17	7.279	9.988	2	6.952	1.766	2	4.423	1.120	2	1.963	0.252	2	0.000	0.000	2
33	51.960	22.551	2	38.455	8.345	2	21.869	0.000	2	9.682	1.114	2	0.636	0.899	2
62	153.605	22.043	2	94.735	11.495	2	36.524	1.000	2	14.418	0.678	2	3.100	0.616	2
130	228.941	0.000	1	189.963	9.792	2	139.846	5.977	2	54.926	10.235	2	18.283	0.074	2
274	239.670	0.000	1	203.272	0.000	1	169.113	0.000	1	99.710	6.281	2	42.907	0.000	1
350	248.918	0.000	1	195.105	0.000	1	177.631	0.000	1	102.071	8.780	2	48.260	0.000	1
443	232.342	13.523	2	199.580	9.368	2	173.314	5.443	2	107.424	9.944	2	52.803	1.870	2
Butyrat															
0	1.859	2.629	2	2.956	0.456	2	0.804	1.136	2	2.464	0.354	2	2.437	0.360	2
9	5.094	1.254	2	10.050	0.664	2	8.632	1.100	2	6.028	1.032	2	3.694	1.909	2
14	11.253	2.227	2	18.855	2.858	2	17.825	3.521	2	11.506	0.183	2	4.788	1.343	2
17	20.088	6.329	2	24.823	2.280	2	23.179	3.254	2	16.218	0.738	2	6.303	0.996	2
33	19.137	0.389	2	22.267	0.117	2	31.085	2.067	2	26.978	2.930	2	11.901	0.974	2
62	7.897	1.391	2	13.636	0.766	2	25.817	1.657	2	27.714	2.605	2	16.546	0.666	2
130	2.937	4.154	2	7.853	0.137	2	9.830	1.929	2	16.051	5.568	2	19.261	0.128	2
274	8.936	0.000	1	12.078	0.000	1	9.417	0.000	1	15.554	2.638	2	18.838	0.000	1
350	12.456	0.000	1	10.685	0.000	1	8.011	0.000	1	15.732	1.378	2	18.860	0.000	1
443	7.155	5.535	2	9.420	0.042	2	6.365	1.694	2	16.339	1.315	2	19.593	0.239	2
Ethanol															
0	0.365	0.516	2	1.185	1.102	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.425	0.601	2
9	0.319	0.451	2	1.066	1.508	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	0.605	0.856	2
14	0.361	0.511	2	2.619	0.918	2	1.680	0.746	2	0.255	0.255	2	0.567	0.801	2
17	4.290	2.761	2	4.188	1.065	2	2.875	0.590	2	1.198	0.513	2	0.807	1.142	2
33	13.024	1.747	2	9.570	2.227	2	7.017	0.000	2	4.526	0.352	2	0.849	1.201	2
62	39.345	7.704	2	20.673	3.700	2	8.866	0.213	2	5.516	0.111	2	2.202	0.319	2
130	72.403	9.334	2	49.143	7.843	2	32.874	0.983	2	12.086	2.190	2	5.018	0.321	2
274	68.999	0.000	1	56.746	0.000	1	40.088	0.000	1	20.953	0.098	2	9.425	0.000	1
350	71.339	0.000	1	52.950	0.000	1	43.337	0.000	1	21.169	1.217	2	10.157	0.000	1
443	76.055	3.661	2	56.158	0.421	2	42.365	0.139	2	21.817	1.372	2	10.871	0.918	2

Abbildung 7.3 - Statistik des Langzeitwachstums des Wildtyps.

Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Anzahl der Replikate (n) der durchgeföhrten Experimente.

Zeit [h]	OD ₆₀₀																						
	Ala			Arg			Asn			Asp			GB			Cho			Cys				
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	N	MW	SD	n	MW	SD	n		
0	0.115	0.030	12	0.120	0.016	12	0.134	0.030	12	0.131	0.031	12	0.126	0.024	12	0.148	0.023	12	0.127	0.024	12		
9	0.493	0.121	12	0.558	0.119	12	0.573	0.125	12	0.569	0.150	12	0.618	0.070	12	0.578	0.122	12	0.190	0.054	12		
11	0.613	0.148	12	0.690	0.138	12	0.707	0.164	12	0.689	0.173	12	0.775	0.069	12	0.665	0.149	12	0.195	0.059	12		
13	0.789	0.117	9	0.901	0.066	9	0.904	0.053	9	0.914	0.100	9	0.966	0.080	9	0.809	0.090	9	0.200	0.069	9		
23	1.396	0.144	3	1.654	0.266	3	1.525	0.226	3	1.499	0.182	3	1.945	0.015	3	1.152	0.068	3	0.399	0.005	3		
33	1.207	0.354	6	1.512	0.512	6	1.242	0.506	6	1.226	0.443	6	2.200	0.242	6	1.044	0.324	6	0.392	0.082	6		
58	1.407	0.009	3	1.982	0.007	3	1.706	0.146	3	1.453	0.003	3	2.360	0.020	3	1.433	0.003	3	1.041	0.019	3		
88	1.246	0.162	9	1.562	0.286	9	1.502	0.269	9	1.332	0.080	9	1.454	0.518	9	1.352	0.148	9	0.758	0.469	9		
106	1.280	0.110	12	1.601	0.222	12	1.525	0.210	12	1.410	0.083	12	1.304	0.286	12	1.446	0.205	12	1.036	0.414	12		
130	1.325	0.124	12	1.730	0.281	12	1.566	0.195	12	1.470	0.091	12	1.237	0.164	12	1.515	0.226	12	1.196	0.385	12		
	Gln		Glu		Gly		His		Ile		Leu		Lys										
0	0.124	0.024	12	0.122	0.012	12	0.127	0.019	12	0.131	0.018	12	0.113	0.017	12	0.127	0.033	12	0.120	0.046	12		
9	0.465	0.119	12	0.521	0.112	12	0.559	0.093	12	0.495	0.087	12	0.223	0.069	12	0.324	0.060	12	0.464	0.119	12		
11	0.580	0.153	12	0.626	0.148	12	0.705	0.139	12	0.597	0.124	12	0.244	0.084	12	0.358	0.054	12	0.596	0.147	12		
13	0.800	0.107	9	0.833	0.031	9	0.896	0.050	9	0.756	0.075	9	0.226	0.086	9	0.408	0.079	9	0.773	0.123	9		
23	1.504	0.206	3	1.430	0.140	3	1.564	0.257	3	1.369	0.182	3	0.488	0.008	3	0.731	0.004	3	1.507	0.173	3		
33	1.265	0.405	6	1.260	0.445	6	1.342	0.480	6	1.230	0.351	6	0.747	0.085	6	0.814	0.144	6	1.242	0.316	6		
58	1.724	0.007	3	1.670	0.001	3	1.822	0.004	3	1.591	0.031	3	1.234	0.038	3	1.151	0.033	3	1.312	0.004	3		
88	1.510	0.264	9	1.466	0.191	9	1.528	0.201	9	1.436	0.220	9	1.009	0.241	9	0.871	0.292	9	1.263	0.055	9		
106	1.517	0.243	12	1.554	0.203	12	1.561	0.142	12	1.590	0.220	12	1.176	0.331	12	1.297	0.501	12	1.317	0.075	12		
130	1.545	0.253	12	1.611	0.206	12	1.633	0.133	12	1.671	0.191	12	1.215	0.364	12	1.419	0.459	12	1.344	0.071	12		
	Met		Orn		Phe		Pro		Ser		Suc		Thr										
0	0.131	0.034	12	0.122	0.042	12	0.112	0.022	12	0.127	0.023	12	0.111	0.019	12	0.132	0.034	12	0.126	0.020	12		
9	0.301	0.068	12	0.524	0.103	12	0.429	0.049	12	0.542	0.052	12	0.320	0.020	12	0.528	0.093	12	0.475	0.063	12		
11	0.341	0.093	12	0.643	0.116	12	0.526	0.072	12	0.666	0.068	12	0.390	0.031	12	0.637	0.123	12	0.579	0.096	12		
13	0.395	0.103	9	0.809	0.100	9	0.680	0.042	9	0.819	0.054	9	0.518	0.021	9	0.809	0.032	9	0.763	0.026	9		
23	0.721	0.017	3	1.504	0.187	3	1.324	0.187	3	1.483	0.237	3	1.018	0.004	3	1.301	0.130	3	1.339	0.131	3		
33	0.838	0.106	6	1.314	0.396	6	1.225	0.374	6	1.287	0.343	6	1.073	0.386	6	1.115	0.356	6	1.173	0.364	6		
58	1.044	0.010	3	1.662	0.004	3	1.611	0.005	3	1.386	0.011	3	1.378	0.006	3	1.513	0.041	3	1.571	0.002	3		
88	0.845	0.466	9	1.390	0.219	9	1.343	0.277	9	1.188	0.122	9	1.257	0.150	9	1.441	0.141	9	1.447	0.174	9		
106	1.044	0.551	12	1.379	0.178	12	1.475	0.241	12	1.237	0.116	12	1.465	0.210	12	1.462	0.133	12	1.461	0.157	12		
130	1.063	0.590	12	1.427	0.163	12	1.543	0.193	12	1.322	0.135	12	1.544	0.175	12	1.485	0.146	12	1.478	0.166	12		
	Tre		Trp		Tyr		Val		Kontrolle														
0	0.125	0.039	12	0.116	0.029	12	0.121	0.027	12	0.123	0.023	12	0.153	0.024	12								
9	0.526	0.113	12	0.513	0.074	12	0.204	0.060	12	0.417	0.058	12	0.559	0.118	12								
11	0.648	0.153	12	0.666	0.098	12	0.227	0.071	12	0.498	0.081	12	0.689	0.156	12								
13	0.842	0.035	9	0.833	0.047	9	0.234	0.076	9	0.634	0.041	9	0.880	0.038	9								
23	1.337	0.123	3	1.406	0.134	3	0.377	0.006	3	1.056	0.002	3	1.419	0.171	3								
33	1.141	0.426	6	1.299	0.505	6	0.369	0.071	6	1.040	0.307	6	1.198	0.462	6								
58	1.562	0.035	3	1.874	0.003	3	0.437	0.008	3	1.319	0.014	3	1.646	0.035	3								
88	1.447	0.151	9	1.473	0.374	9	0.355	0.137	9	1.335	0.238	9	1.450	0.170	9								
106	1.486	0.129	12	1.567	0.281	12	0.398	0.158	12	1.411	0.210	12	1.464	0.114	12								
130	1.510	0.132	12	1.671	0.274	12	0.443	0.198	12	1.441	0.203	12	1.524	0.146	12								

Abbildung 7.4 - Statistik des Wachstums bei 300 mM NaCl mit Supplementierung.

Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Anzahl der Replikate (n) der durchgeföhrten Experimente.

Zeit [h]	300 mM NaCl									500 mM NaCl			ohne Glukose		
	+ 1 mM Arg/His/Trp			+ 1 mM Arg			+ 1 mM GB			+ 1 mM GB			+ 270 mM GB		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	N
OD₆₀₀															
0	0.139	0.022	4	0.149	0.046	6	0.207	0.019	4	0.191	0.001	2	0.148	0.014	6
9	0.666	0.139	4	0.706	0.055	6	0.314	0.023	4	0.195	0.005	2	0.459	0.451	6
11	1.165	0.048	4	1.043	0.159	6	0.395	0.027	4	0.187	0.001	2	0.706	0.658	6
13	1.593	0.090	4	1.588	0.156	6	0.453	0.012	4	0.179	0.001	2			
15	1.885	0.249	4	1.933	0.154	6	0.562	0.037	4	0.192	0.002	2	1.017	0.950	6
17				2.242	0.039	6	0.853	0.266	4	0.215	0.004	2	1.263	0.746	6
19	2.270	0.076	4	2.363	0.062	6	1.080	0.237	4						
21							1.405	0.300	4				1.597	0.862	6
23				2.452	0.084	6	1.788	0.309	4	0.378	0.013	2			
34	2.148	0.040	4	2.413	0.090	4	3.123	0.211	4	1.045	0.007	2	1.315	0.580	6
38							3.185	0.060	4						
43	2.175	0.048	4	2.403	0.143	6	3.563	0.134	4	1.310	0.000	2	1.398	0.188	6
58				2.385	0.152	6	3.068	0.177	4	1.365	0.007	2			
67	2.380	0.143	4	2.605	0.038	6	2.788	0.344	4	1.335	0.007	2	1.470	0.193	6
86	2.680	0.127	4				2.470	0.295	4						
91				3.487	0.224	6	2.370	0.139	4	1.350	0.000	2			
96	3.155	0.131	4										0.897	0.130	6
108	3.500	0.121	4	4.093	0.100	6	2.220	0.191	4	1.325	0.007	2			
114							2.455	0.289	4						
130	3.588	0.130	4	5.260	0.075	6	2.838	0.119	4	1.097	0.000	2	0.795	0.131	6
pH-Wert															
0	5.165	0.021	2	5.160	0.010	3	5.185	0.007	2	5.130	0.000	2	5.483	0.006	3
9	4.940	0.000	2	4.930	0.020	3	5.090	0.071	2	5.090	0.000	2	5.363	0.124	3
11	4.865	0.007	2	4.867	0.021	3	5.070	0.099	2	5.090	0.000	2	5.310	0.159	3
13	4.760	0.014	2	4.840	0.050	3	5.020	0.127	2	5.090	0.000	2			
15	4.660	0.014	2	4.773	0.068	3	4.960	0.141	2	5.090	0.000	2	5.213	0.261	3
17				4.710	0.020	3	4.980	0.000	2	5.080	0.000	2	5.207	0.261	3
19	4.590	0.042	2	4.660	0.000	3	4.885	0.035	2						
21							4.830	0.000	2				5.220	0.239	3
23				4.600	0.030	3	4.730	0.000	2	4.930	0.000	2			
34	4.555	0.021	2	4.533	0.015	3	4.540	0.014	2	4.610	0.000	2	5.093	0.294	3
38							4.530	0.000	2						
43	4.545	0.007	2	4.470	0.020	3	4.525	0.007	2	4.540	0.000	2	5.083	0.208	3
58				4.475	0.007	2	4.580	0.000	2	4.490	0.000	2			
67	4.540	0.014	2	4.510	0.000	3	4.570	0.014	2	4.510	0.000	2	4.950	0.046	3
86	4.555	0.007	2				4.575	0.007	2						
91				4.527	0.021	3	4.590	0.000	2	4.530	0.000	2			
96	4.585	0.021	2				4.600	0.000	1				4.940	0.030	3
108	4.620	0.014	2	4.540	0.010	3	4.585	0.021	2	4.520	0.000	2			
114							4.560	0.000	2						
130	4.625	0.007	2	4.527	0.025	3	4.590	0.014	2	4.470	0.000	2	4.830	0.036	3
Acetat															
Aceton															
Butanol															
Butyrat															
Ethanol															
ohne Glukose + 270 mM GB															
0	47.871	2.903	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	4.004	0.827	3	0.000	0.000	3
9	45.993	0.789	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	6.066	4.825	3	0.000	0.000	3
17	50.368	4.452	3	0.520	0.900	3	0.000	0.000	3	10.964	10.185	3	1.109	1.921	3
22	50.291	6.458	3	0.536	0.928	3	0.000	0.000	3	14.837	10.627	3	2.008	1.783	3
33	52.202	9.548	3	1.525	1.506	3	0.000	0.000	3	17.737	12.979	3	2.470	2.172	3
40	48.621	10.072	3	1.518	1.491	3	0.000	0.000	3	18.590	9.804	3	2.464	2.148	3
66	52.881	6.716	3	2.240	0.716	3	0.000	0.000	3	25.229	0.963	3	3.753	0.285	3
106	51.762	5.487	3	2.249	0.742	3	0.000	0.000	3	25.149	2.762	3	3.814	0.354	3
130	52.272	7.449	3	2.276	0.795	3	0.000	0.000	3	25.667	4.082	3	3.799	0.604	3

(Fortsetzung nächste Seite)

300 mM NaCl + 1 mM Arg/His/Trp															
0	48.692	4.581	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	2.598	0.504	3	0.000	0.000	3
9	48.621	6.801	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	8.875	0.709	3	0.000	0.000	3
11	50.019	6.677	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	13.310	0.508	3	0.000	0.000	3
15	46.691	6.561	3	2.426	0.903	3	1.850	1.056	3	18.703	0.308	3	2.318	0.628	3
19	47.534	5.255	3	5.095	1.547	3	4.198	2.413	3	23.059	0.587	3	5.555	1.319	3
33	47.574	5.761	3	9.082	3.817	3	8.918	4.852	3	25.190	0.284	3	8.174	1.922	3
43	47.043	5.590	3	10.725	1.734	3	14.135	6.852	3	26.669	0.151	3	10.543	1.501	3
67	47.005	7.820	3	20.676	4.314	3	32.505	19.651	3	25.504	0.726	3	14.439	3.451	3
81	45.306	7.334	3	25.268	8.458	3	39.054	24.369	3	21.336	5.316	3	16.112	2.801	3
96	39.579	2.175	3	31.652	4.702	3	58.269	8.013	3	22.725	5.939	3	17.386	4.099	3
108	38.841	6.713	3	39.797	6.570	3	81.491	3.516	3	20.683	5.077	3	19.851	4.429	3
130	38.006	9.217	3	64.946	16.334	3	108.478	8.372	3	11.280	2.027	3	22.878	5.565	3
300 mM NaCl + 1 mM Arg															
0	50.747	6.185	3	0.000	0.000	3	0.000	0.000	3	4.521	1.143	3	0.000	0.000	3
9	49.911	6.231	3	2.059	0.170	3	0.000	0.000	3	8.919	0.079	3	0.000	0.000	3
11	54.487	2.027	2	2.347	0.059	2	0.000	0.000	2	13.498	0.307	2	0.000	0.000	2
13	48.544	4.850	3	3.810	1.241	3	1.124	0.979	3	17.102	3.375	3	1.960	1.702	3
17	46.534	6.067	2	5.097	0.592	2	1.606	0.205	2	21.977	3.250	2	3.625	1.287	2
19	49.405	5.957	3	6.508	1.392	3	3.166	0.728	3	24.491	4.537	3	4.170	1.325	3
33	46.839	6.175	3	8.997	0.106	3	8.141	0.580	3	27.281	1.736	3	5.456	1.307	3
43	49.020	5.988	3	9.770	0.061	3	11.702	2.853	3	28.707	1.572	3	5.677	1.138	3
57	47.545	6.043	3	13.690	0.287	3	12.546	0.408	3	25.847	0.102	3	9.362	6.549	3
81	45.457	6.534	3	36.386	1.681	3	48.266	5.098	3	19.192	0.812	3	12.303	5.300	3
96	47.388	5.016	2	51.141	6.507	2	87.574	16.816	2	18.514	0.390	2	16.125	8.530	2
108	40.185	6.197	3	62.563	11.830	3	92.844	24.833	3	18.687	0.859	3	21.250	11.683	3
114	36.226	8.325	3	82.644	0.945	3	114.550	6.514	3	15.420	4.607	3	24.590	6.826	3
130	33.626	7.099	3	87.997	6.173	3	120.133	1.692	3	14.927	2.683	3	26.784	4.493	3
300 mM NaCl + 1 mM GB															
0	46.888	2.162	2	0.423	0.598	2	0.000	0.000	2	4.842	0.767	2	0.672	0.462	2
9	46.283	2.594	2	1.729	0.240	2	0.000	0.000	2	5.788	0.013	2	4.161	1.616	2
13	45.368	0.372	2	1.777	0.317	2	0.000	0.000	2	7.256	0.677	2	5.741	1.364	2
17	47.398	0.716	2	1.989	0.195	2	0.000	0.000	2	11.375	1.908	2	8.274	0.190	2
19	47.690	3.084	2	2.183	0.392	2	0.000	0.000	2	14.202	2.328	2	8.791	2.002	2
23	47.834	3.907	2	3.618	0.839	2	1.780	2.517	2	20.691	1.389	2	12.099	2.323	2
33	48.918	3.688	2	12.023	1.343	2	21.952	2.997	2	28.802	0.993	2	17.069	1.254	2
43	47.977	2.382	2	19.521	0.585	2	41.341	0.537	2	28.003	0.911	2	20.680	1.791	2
57	46.487	2.016	2	24.046	0.368	2	50.600	1.586	2	25.461	0.305	2	21.073	0.492	2
67	45.868	0.315	2	24.953	0.555	2	53.352	0.264	2	24.922	0.509	2	18.338	0.008	2
81	43.012	1.054	2	25.296	0.343	2	54.597	1.459	2	23.002	0.479	2	19.236	0.629	2
91	44.099	0.689	2	25.331	0.479	2	53.570	1.432	2	23.291	0.738	2	19.062	0.280	2
105	43.493	0.295	2	26.232	0.049	2	54.874	0.849	2	22.969	1.085	2	18.989	0.423	2
114	48.937	2.654	2	27.112	1.157	2	58.071	0.600	2	25.295	0.005	2	21.192	0.075	2
130	46.494	1.043	2	36.462	1.693	2	75.775	4.096	2	22.737	0.838	2	24.004	1.526	2
500 mM NaCl + 1 mM GB															
0	49.745	6.017	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	4.900	0.028	2	0.000	0.000	2
9	49.280	7.736	2	1.110	0.071	2	0.000	0.000	2	5.945	1.124	2	0.000	0.000	2
13	48.580	7.651	2	1.240	0.198	2	0.000	0.000	2	7.240	2.927	2	0.000	0.000	2
17	47.240	9.093	2	1.625	0.799	2	0.710	1.004	2	8.620	4.313	2	0.755	1.068	2
22	48.825	8.026	2	2.125	1.407	2	1.350	1.909	2	10.945	6.032	2	1.040	1.471	2
34	49.275	8.605	2	3.110	1.895	2	2.130	3.012	2	18.025	3.939	2	3.015	1.266	2
43	48.925	8.634	2	4.560	1.372	2	5.990	1.414	2	20.890	2.531	2	4.010	0.863	2
58	49.510	8.118	2	7.170	0.311	2	12.155	1.096	2	22.370	1.980	2	5.930	0.255	2
67	51.505	7.319	2	8.365	0.035	2	14.590	1.697	2	23.670	2.857	2	6.630	0.679	2
91	50.530	9.263	2	11.295	2.369	2	19.500	1.824	2	22.320	1.018	2	7.920	0.085	2
108	51.795	10.288	2	13.195	5.098	2	22.705	6.244	2	22.095	0.106	2	8.450	0.849	2
130	49.325	11.915	2	14.740	7.368	2	25.590	10.083	2	21.035	0.700	2	9.265	1.704	2

(Fortsetzung nächste Seite)

	300 mM NaCl												500 mM NaCl			ohne Glukose		
	+ 1 mM Arg/His/Trp			+ 1 mM Arg			+ 1 mM GB			+ 1 mM GB			+ 270 mM GB					
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	N			
500 mM NaCl + 1 mM GB																		
0	49.745	6.017	2	0.000	0.000	2	0.000	0.000	2	4.900	0.028	2	0.000	0.000	2			
9	49.280	7.736	2	1.110	0.071	2	0.000	0.000	2	5.945	1.124	2	0.000	0.000	2			
13	48.580	7.651	2	1.240	0.198	2	0.000	0.000	2	7.240	2.927	2	0.000	0.000	2			
17	47.240	9.093	2	1.625	0.799	2	0.710	1.004	2	8.620	4.313	2	0.755	1.068	2			
22	48.825	8.026	2	2.125	1.407	2	1.350	1.909	2	10.945	6.032	2	1.040	1.471	2			
34	49.275	8.605	2	3.110	1.895	2	2.130	3.012	2	18.025	3.939	2	3.015	1.266	2			
43	48.925	8.634	2	4.560	1.372	2	5.990	1.414	2	20.890	2.531	2	4.010	0.863	2			
58	49.510	8.118	2	7.170	0.311	2	12.155	1.096	2	22.370	1.980	2	5.930	0.255	2			
67	51.505	7.319	2	8.365	0.035	2	14.590	1.697	2	23.670	2.857	2	6.630	0.679	2			
91	50.530	9.263	2	11.295	2.369	2	19.500	1.824	2	22.320	1.018	2	7.920	0.085	2			
108	51.795	10.288	2	13.195	5.098	2	22.705	6.244	2	22.095	0.106	2	8.450	0.849	2			
130	49.325	11.915	2	14.740	7.368	2	25.590	10.083	2	21.035	0.700	2	9.265	1.704	2			

Abbildung 7.5 - Statistik des Wachstums mit Arginin- und GB-Supplementierung.

Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Anzahl der Replikate (n) der durchgeföhrten Experimente.

Zeit [h]	argR92a::CT												pTc::argR												
	ohne NaCl			300 mM NaCl			ohne NaCl			300 mM NaCl			MW			SD			n			MW			
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	
OD₆₀₀																									
0	0.216	0.081	7	0.161	0.076	7	0.165	0.032	5	0.178	0.091	5													
9	0.864	0.284	7	0.397	0.143	7	0.348	0.068	5	0.243	0.103	5													
11	1.311	0.292	7	0.561	0.240	7	0.561	0.251	5	0.323	0.170	5													
13	1.744	0.250	7	0.773	0.385	7	0.667	0.266	5	0.376	0.176	5													
15	2.241	0.249	7	1.071	0.532	7	0.823	0.345	5	0.436	0.214	5													
21	3.369	0.248	7	1.720	0.590	7	1.505	0.080	3	0.728	0.340	3													
33	3.829	0.762	7	2.424	0.525	7	3.423	0.642	5	1.256	0.561	5													
59	3.244	1.960	7	2.464	0.157	7	4.650	0.771	2	1.450	0.000	2													
84	1.319	0.410	7	1.839	0.174	7	3.755	1.212	5	1.416	0.224	5													
105	0.875	0.217	6	1.708	0.058	3	3.376	1.058	5	1.607	0.359	5													
130	0.670	0.143	7	1.661	0.161	6	3.059	0.884	5	1.959	0.388	4													
pH-Wert																									
0	5.242	0.025	5	5.240	0.010	3	5.280	0.045	5	5.166	0.005	5													
9	5.000	0.031	5	5.077	0.006	3	5.196	0.043	5	5.116	0.027	5													
11	4.922	0.044	5	4.997	0.012	3	5.180	0.059	5	5.096	0.036	5													
13	4.776	0.038	5	4.807	0.040	3	5.108	0.090	5	5.052	0.050	5													
15	4.726	0.071	5	4.720	0.010	3	5.052	0.101	5	5.018	0.067	5													
21	4.708	0.107	5	4.580	0.000	3	4.957	0.035	3	4.937	0.107	3													
33	4.756	0.083	5	4.680	0.000	3	4.706	0.091	5	4.746	0.118	5													
59	4.590	0.025	5	4.710	0.000	3	4.600	0.297	2	4.680	0.057	2													
84	4.550	0.069	5	4.650	0.000	3	4.776	0.119	5	4.696	0.086	5													
105	4.493	0.059	4							4.754	0.151	5	4.706	0.092	5										
130	4.474	0.047	5	4.637	0.006	3	4.746	0.135	5	4.706	0.085	5													
Glukose																									
0	58.287	3.506	3	55.957	1.174	3	63.215	2.314	3	63.215	10.456	3													
9	53.807	4.115	3	53.583	1.959	3	61.647	2.238	3	61.826	13.039	3													
33	26.254	1.220	3	43.816	1.585	3	52.239	7.663	3	57.660	11.497	3													
85	5.197	4.1																							

Zeit [h]	Acetat											
0	54.656	14.858	8	59.799	20.988	4	46.234	3.989	5	43.293	3.957	5
9	58.623	13.348	8	61.531	20.279	4	47.101	3.713	5	44.491	4.305	5
13	59.294	15.121	8	61.908	19.732	4	45.828	4.254	5	43.002	4.682	5
19	54.301	14.967	8	62.090	21.160	4	50.540	5.479	5	41.978	3.166	5
33	31.879	9.786	8	54.484	24.864	4	53.338	6.981	5	44.416	3.987	5
59	20.830	4.973	8	51.483	24.476	4	46.103	13.116	5	44.563	2.959	5
92	23.271	6.492	8	52.624	25.794	4	43.049	12.750	5	47.077	2.662	5
105	23.140	7.595	7				42.143	10.828	5	43.278	3.236	5
130	22.528	6.805	8	54.540	27.247	4	41.915	11.805	5	40.929	3.417	5
Aceton												
0	0.000	0.000	8	0.000	0.000	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
9	0.996	1.069	8	0.000	0.000	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
13	4.506	2.483	8	2.240	3.670	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
19	38.840	8.524	8	18.550	18.155	4	1.342	1.838	5	1.803	1.768	5
33	116.776	27.131	8	52.951	35.328	4	12.427	13.965	5	6.553	6.513	5
59	172.053	36.913	8	74.288	36.661	4	53.039	58.277	5	13.767	7.739	5
92	187.432	29.909	8	73.648	26.612	4	144.212	43.460	5	32.308	9.175	5
105	193.655	28.180	7				157.130	46.647	5	40.576	10.542	5
130	186.311	31.070	8	83.707	30.767	4	179.056	47.390	5	66.518	18.323	5
Butanol												
0	0.000	0.000	8	0.000	0.000	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
9	0.000	0.000	8	0.000	0.000	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
13	1.793	1.955	8	1.723	3.446	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
19	44.029	5.380	8	21.239	19.699	4	0.000	0.000	5	0.000	0.000	5
33	150.127	9.018	8	81.012	34.521	4	9.377	12.900	5	2.568	3.524	5
59	244.291	26.919	8	116.936	29.150	4	50.449	58.083	5	8.165	6.331	5
92	271.627	24.131	8	121.138	23.400	4	154.795	45.429	5	28.028	14.245	5
105	270.156	22.391	7				169.546	48.968	5	36.323	12.672	5
130	269.537	27.147	8	130.477	20.567	4	193.861	49.683	5	62.868	16.929	5
Butyrat												
0	0.000	0.000	8	0.641	1.432	5	1.602	3.582	5	0.000	0.000	5
9	7.511	4.865	8	4.178	6.384	5	2.410	2.437	5	2.102	1.968	5
13	17.950	3.172	8	11.722	5.421	5	3.742	3.552	5	2.754	2.607	5
19	16.756	1.912	8	17.034	4.851	5	12.951	2.697	5	4.025	3.826	5
33	0.000	0.000	8	12.369	7.128	5	19.813	5.593	5	12.824	3.795	5
59	0.000	0.000	8	12.399	6.968	5	15.666	14.388	5	17.181	3.309	5
92	5.918	4.985	8	13.579	7.672	5	6.189	6.094	5	17.391	1.933	5
105	6.674	4.605	7				6.269	5.992	5	15.461	2.163	5
130	5.474	4.624	8	15.395	8.768	5	7.852	7.224	5	10.610	6.622	5
Ethanol												
0	0.554	0.358	8	0.879	0.707	4	0.479	0.184	5	0.412	0.391	5
9	0.563	3.034	8	1.348	0.756	4	1.313	3.105	5	-0.445	0.928	5
13	3.406	1.612	8	2.170	0.254	4	-0.364	4.874	5	0.424	2.040	5
19	9.914	1.899	8	5.739	2.259	4	1.637	3.105	5	-0.262	1.440	5
33	43.681	3.647	8	16.634	7.318	4	5.261	6.412	5	2.250	2.079	5
59	79.546	16.868	8	23.451	7.579	4	12.860	15.398	5	2.810	2.969	5
92	86.658	15.522	8	24.030	6.335	4	42.604	17.978	5	7.351	3.384	5
105	82.295	6.707	7				47.566	19.776	5	7.509	3.182	5
130	85.533	17.408	8	26.353	5.994	4	53.989	18.509	5	12.687	3.895	5

Abbildung 7.6 - Statistik des Wachstums und der Fermentationprodukte der Mutanten.

Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Anzahl der Replikate (n) der durchgeföhrten Experimente.

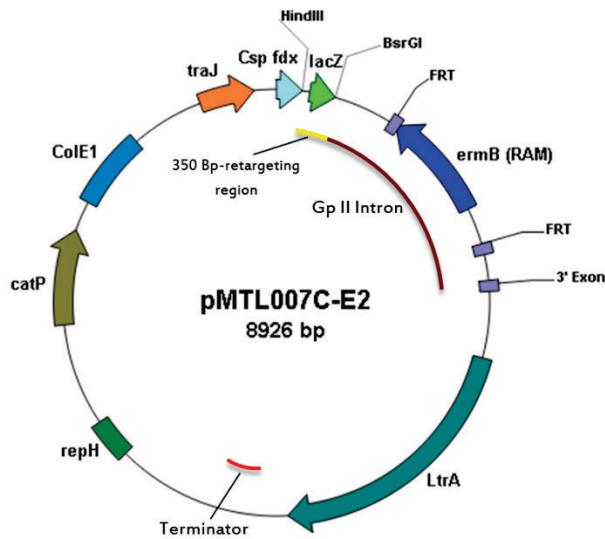


Abbildung 7.7 - Plasmidkarte von pMTL007C-E2 (Heap *et al.* 2010).

Das modulare Plasmid der zweiten ClosTron®-Generation beinhaltet unter Kontrolle des konstitutiven *fdx* Promotors von *C. sporogenes* ein mobiles Gruppe-II Intron, deren Insertion in das Zielgen durch das LtrA Protein (*L. lactis*) vermittelt wird. Flippase-Erkennungsstellen (FRT) dienen, wenn notwendig, der Entfernung des retrotranspositionsaktivierten Selektionsmarker (RAM). Dargestellt ist der Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*repH*) und für *E. coli* (ColE1). Eine 350-Bp-Region des Gruppe-II Introns wird mittels SOE-PCR an das Zielgen angepasst und nach Hydrolyse mit *Hind*III und *Bsr*GI in den Vektor kloniert. Dabei kommt es zum *in frame* Austausch des *LacZα* ORFs durch das 350-Bp-Insert und zum Funktionsverlust der β-Galaktosidase.

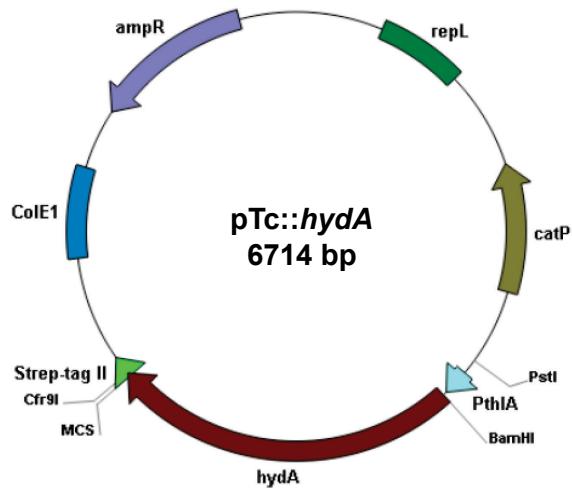


Abbildung 7.8 - Schematische Darstellung des pTc::hydA-Vektors (Girbal *et al.* 2005; Schulz 2013).

Dieser Shuttlevektor wurde für die Expression C-terminaler Strep-tag II Fusionproteine unter Kontrolle des konstitutiven Thiolase-Promotors (PthlA) konstruiert und beinhaltet das Gen *hydA* von *C. acetobutylicum*, welches mittels Verdau durch die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Cfr*9I (*Xma*I) *in frame* durch das gewünschte Zielgen ausgetauscht werden kann. Dargestellt ist der Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien (*repL*) und für *E. coli* (ColE1). Das Chloramphenicol/Thiamphenicol-Resistenzgen (*catP*) ermöglicht die Komplementation von ClosTron®-Insertionsmutanten (Heap *et al.* 2007; Heap *et al.* 2010). Die Ampicillinresistenz (*ampR*) wird für die Expression von Proteinen in *E. coli* verwendet.

GAATGGGATCCTTGAAGGTATCAAGACATACAAAAATTAGAAATTATAAATTAAAGGATATTGAA
 ACTCAAGAGGAGCTGGCTGAGGAATTAAAGAAGAAGTGGTATGGAAGTTACTCAAGCCACTGTATCA
 AGAGATATAAAGGAGCTAAACTTATAAAAGTTCTCATCAAAAGGAAGATATAATATGCAACTAT
 TTCTCCTACGGAGAGTTTGTCAAATAAGCTCGTACAATTGCCCCAAACTGTATTAAATGTTGA
 CAGGGTAATAATATGGTAGTGGTAAAAACCATATCGGGTTCAGCTAATGCAGCAGCGGAAGCTATA
 GACTCTTGAATTAGATGGAATAGCAGGTTCAATAGCAGGCATAACACTATTTTATACTTCTAGA
 AGTGAAGAACACAGCATTCAATATTGTTAAAAGCTGAAAAAGATGATTAAT**GAACCCGGGTGGTCAC**
ATCCTCAATTGAAAAATAAGGCGCC

Abbildung 7.9 - Sequenzierung der Nukleotidsequenz von pTc::*argR*.

Unterstrichene Sequenzen signalisieren die Restriktionsschnittstellen. Fett formatierte Nukleotide zeigen den Beginn und das Ende des Gens. Die Nukleotidsequenz des *Strep-tag* II ist kursiv hervorgehoben.

A)

TTCAGACACTTCCTCTATCGAACCTCAATCGAAATTAGAAACTTGCCTTCAGTAAACACAAC
CTTATATCTGATTAACATTGCGACTCAGTCGTACCGATTGTCTTGTAGGTA
ACTCATCGCTTCCAAACCGTCTGTTCCGTATCAGCTTCGCTTGTAGGTTGGCTGTTCTGT
TATACAGAG
TAGTACCTTAAACTACTGACTTAACACCCATCTGGCGCACTGGTATGGAAGTTAAGGATAATTATA
AGCTAAAAATTACACAAC
TTATACGATTATTTACCATGTT

B)

GTAGTTAAGGTACTACTCTGTAAGATAACACAGAAAACAGCCAACCTAACCGAAAAGCGAAAGCT
GATACGGGAACAGAGCACGGTTGAAAGCGATGAGTTACCTAAAGACAATCGGGTACGACTGAGTC
GCAATGTTAACAGATATAAGGTATAAGTTGTGTTACTGAACGCAAGTTCTAATTGATTGAAGTT
CGATAGAGGAAAGTGTCTGAAACCTCTAGTACAAAGAAAGGTAAGTTAAGTGGTATGACTTATCTGT
TATCACCACATTGTACAATCTGTAGGAGAACCTATGGGAACGA

Abbildung 7.10 - Sequenzierung der Nukleotidsequenz von pMTL007C::*argR*.

(A) Sequenzierung mit Ebs1d. (B) Sequenzierung mit Ibs. Die Nukleotide der *Intron targeting region* sind unterstrichen.

Results of target site identification algorithm				
Intron				
Sequence	Exon-->--Exon	Pos	Score	
AGCTTATTTGACAAAAAAACTCTCGTAGGGAGAAATAGTTGCATAT	194 195a	8.099		
GATAACAGTGGCTTGGAGTAACCTTCCATACCACTTCTTCTTAATTCC	92 93a	7.341		
ATAGCTTCCGCTGCTGATTAGCTGAACCCGATATGGTTTACCC	296 297a	5.955		
TTAAATGTTGACAGGGTAAATAATATGTTAGTGGTAAAAACCCATA	279 288s	5.662		
ATGGAAGTACTCAAGCCACTGTATAAAGGATATAAAGGAGCTT	126 127s	5.608		
TTTAATACAGTTGGCAAAATTGTAACGAGCTTATTGACAAA	224 225a	4.348		
CATCAAAAGGAAGATATAATATGCAACTATTTCTCTACGGAGA	190 191s	4.243		
GAGGAGCTGGCTGAGGAATTAAAGAAGAAGTGGTATGGAAGTTACT	93 94s	3.989		
GACAGGGTAATAATATGGTAGTGGTAAAAACCATATCGGGTTCA	288 289s	3.893		
TGGCTGAGGAATTAAAGAAGTGGTATGGAAGTTACTCAAGCCA	100 101s	3.829		
TCGGGTTCACTGAGCTGAGCTGGAGCTATAGACTTTGGTAAAT	324 325s	3.456		
CAGTGGCTGGAGTAACCTTCCATACCACTTCTTAAATTCTCAG	88 89a	2.814		
CTCGTTAACATTGGCCAAAAGTGTAAATGTTGACAGGGTA	252 253s	2.566		
ATATCTCTTGTACAGTGGCTTGGTAACCTCCATACCACTTCTT	101 102a	2.544		
GATATTGAAACTCAAGAGGAGCTGGCTGAGGAATTAAAGAAGT	78 79s	2.270		
CTTTATAAAGTTAAAGCTTATATCTCTTGTACAGTGGCTT	124 125a	2.192		
ATAAATTAAAGGATATTGAAACTCAAGAGGAGCTGGCTGAGGA	66 67s	2.047		
TCCCGCTGCTGATTAGCTGAACCCGATATGGTTTACCACTACC	298 299a	1.964		
GCTGAAACCGGATATGGTTTACCACTACCATATTATTTACCC	275 276a	1.805		
AATGCAGCAGCGGAAGCTATAGCTTCTGAAATTAGTGGAAATA	336 337s	1.788		
CAATAGCAGGGGATAACACTTCTTATACCTTCTGAAAGTGAAG	388 389s	1.553		
GACTCTTGAATTAGATGGAATAGCAGGTTCAATAGCAGGCGAT	357 358s	1.336		
TTCTTAATTCTCAGCCAGCTCTTGTAGTTCAATATCTTTA	58 59a	1.317		
TATAAAGGAGCTTAAACTTATAAAAGTTCTCATCAAAGGAAG	158 159s	1.063		
GAATAGCAGGTTCAATAGCAGGCGATAACACTATTTTATACTT	376 377s	0.872		

(Fortsetzung nächste Seite)

```

Selected target site
-----
Name (position): 92-93a
Sequence: GATACAGTGGCTTGAGTAACCTCCATACCACTCTCTTAATTCC

Primers for conventional SOE PCR intron re-targeting
-----
ArgR-92-93a -IBS primer: AAAAAAGCTTATAATTCTTAACTTCCATAACCGATGCGCCCAGATAGGGTG
ArgR-92-93a -EBS1d primer: CAGATTGACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCATACCACTTAACTTACCTTCTTGT
ArgR-92-93a -EBS2 primer: TGAACCGCAAGTTCTAATTTCGATTGAAGTTCGATAGAGGAAAGTGTCT
EBS universal primer: CGAAATTAGAAAATTGCGTTCAGTAAAC

Intron targeting region: ArgR-92-93a
-----
TTATCCTTAACTTCCATACCACTGGCCAGATAAGGTGTTAAAGTCAGTAGTTAAAGGTACTAC
TCTGTAAGATAACACAGAAAAACAGCCAAACCTAACCGAAAAGCGAAAGCTGATACGGGAACAGAGC
ACGGTTGAAAAGCGATGAGTTACCTAAAGACAATCGGGTACGACTGAGTCGAATGTTAACAGA
TATAAGGTATAAGTTGTTTACTGAACGCAAGTTCTAATTTCGATTGAAGTTCGATAGAGGAA
AGTGTCTGAAAACCTCTAGTACAAAGAAAGGTAAAGTTAAGTGTGTTATGACT

```

Abbildung 7.11 - Intron targeting design Ergebnis für das Gen *cac2074* (*argR*).

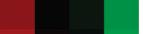
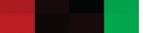
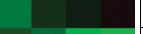
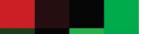
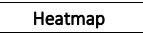
Die gewählte Insertionsstelle wies einen möglichst hohen *Score* zur effizienten Insertion und eine Lage nah am 5'-Ende des Gens auf, um den nativen Genbereich vor der Insertionsstelle zu minimieren (<http://clostron.com/clostron2.php>, Perutka *et al.* 2004).

Tabelle 11 - Gruppierung und Einteilung der COG-Klassen

Informationsspeicherung und -verarbeitung		Zelluläre Prozesse und Signalisierung
J	Übersetzung, ribosomale Struktur und Biogenese	D Zellzykluskontrolle, Zellteilung, Chromosomenaufteilung
A	RNA-Prozessierung und -modifizierung	Y Nukleare Struktur
K	Transkription	V Abwehrmechanismen
L	Replikation, Rekombination und Reparatur	T Mechanismen der Signaltransduktion
B	Struktur und Dynamik des Chromatins	M Zellwand/Membran/Hüllen-Biogenese N Zellmotilität
Stoffwechsel		Z Zytoskelett
C	Energieerzeugung und -umwandlung	W Extrazelluläre Strukturen
G	Kohlenhydrattransport und -metabolismus	U Intrazellulärer Transport, Sekretion und vesikulärer Transport
E	Aminosäuretransport und -metabolismus	O Posttranskriptionale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone
F	Nukleotidtransport und -stoffwechsel	
H	Coenzymtransport und -metabolismus	
I	Lipidtransport und -stoffwechsel	Schlecht charakterisiert
P	Anorganischer Ionentransport und -stoffwechsel	R Nur allgemeine Funktionsvorhersage
Q	Biosynthese, Transport und Katabolismus von Sekundärmetaboliten	S Funktion unbekannt
		X Mobilome: prophages, transposons

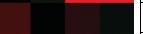
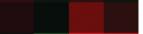
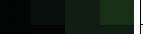
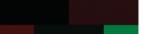
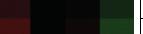
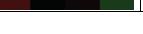
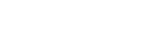
Zellwand/Membran/Hüllen-Biogenese (COG-Klasse M)

 \log_2FC-5 

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D	Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0667	cac0667		-0,66	-0,86	-4,23	-4,44	cac3049	cac3049		3,02	0,33	-0,50	-3,19
cac0702	cac0702		-2,25	-1,26	-0,56	0,43	cac3050	cac3050		3,75	0,49	-0,27	-3,54
cac0794	cac0794		-0,64	-0,34	-6,34	-6,04	cac3051	cac3051		4,27	0,60	-0,18	-3,84
cac1017	cac1017		-4,31	1,00	-6,15	-0,84	cac3052	cac3052		5,06	0,46	0,65	-3,95
cac1252	cac1252		-2,51	0,35	-4,25	-1,40	cac3058	cac3058		5,89	0,55	0,92	-4,42
cac1315	cac1315		-2,18	-0,92	-0,70	0,56	cac3059	cac3059		5,79	1,00	0,19	-4,59
cac1335	cac1335		-1,41	-1,78	-4,83	-5,21	cac3081	cac3081		-1,10	0,26	-5,47	-4,11
cac1876	cac1876		4,80	-1,67	2,81	-3,66	cac3310	cac3310		-0,38	0,06	-8,88	-8,43
cac2185	cac2185		0,04	-1,07	2,87	1,76	cac3676	cac3676		-1,56	4,85	-7,69	-1,28
cac2350	cac2350		-0,45	-0,20	-4,53	-4,29	cap0058	cap0058		-1,77	3,43	-5,49	-0,29
cac2383	cac2383		-3,25	1,29	-7,19	-2,66	cap0118	cap0118		3,75	0,91	0,31	-2,53
cac2615	cac2615		-0,25	-2,32	-5,66	-7,73	cap0119	cap0119		3,98	0,79	0,64	-2,55
cac2621	cac2621		-1,51	0,15	-5,94	-4,28	cac0194	cac0194		-1,71	0,62	-2,11	0,22
cac2695	cac2695		-2,92	-1,02	-0,24	1,67	cac1009	cac1009		0,12	1,70	-2,92	-1,33
cac2861	spollD		-2,47	0,03	-3,77	-1,27	cac1359	cac1359		-0,96	-0,05	-2,89	-1,97
cac2907	cac2907		-0,10	0,16	-3,32	-3,06	cac1474	cac1474		-1,07	1,04	-2,97	-0,85
cac2911	cac2911		-0,80	-0,63	-5,16	-4,99	cac1688	cac1688		-1,90	0,71	-4,14	-1,52
cac2944	cac2944		-2,73	1,55	-2,87	1,42	cac2180	gmd		-1,16	0,53	-3,54	-1,85
cac2960	galE		2,17	0,05	2,43	0,32	cac2344	cac2344		-1,16	0,26	-2,98	-1,55
cac2968	cac2968		-0,19	0,25	-5,70	-5,26	cac2663	cac2663		-1,94	1,80	-2,95	0,78
cac3047	murJ		1,99	0,47	-0,53	-2,06	cac3501	cac3501		2,70	0,94	1,10	-0,66

Flagellenaufbau und Chemotaxis (COG-Klasse N)

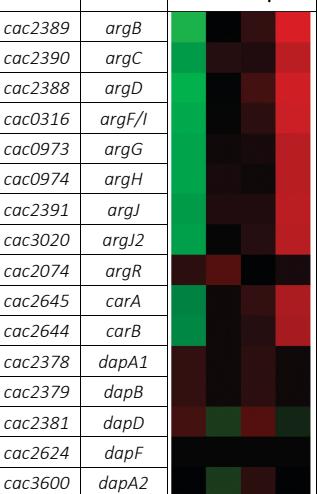
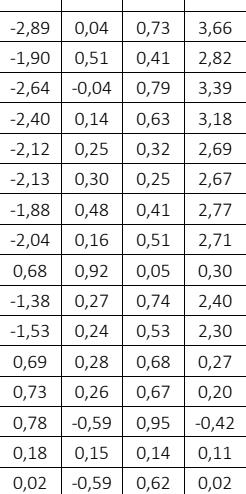
 \log_2FC-5 

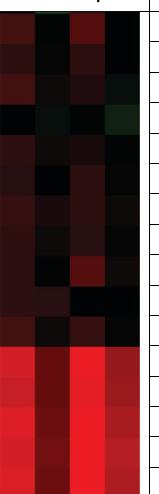
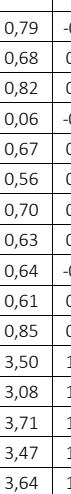
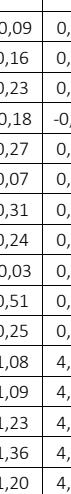
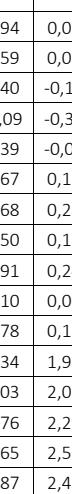
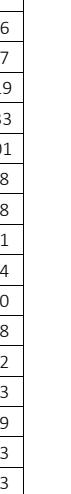
Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D	Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0304	motA		0,47	-0,65	2,70	1,57	cac2161	fliG		0,79	0,01	0,28	-0,49
cac0305	motB		0,44	-0,54	2,62	1,64	cac2163	fliE		0,76	-0,05	0,51	-0,30
cac1555	fliC/hag		-1,13	-0,72	3,75	4,15	cac2164	fliC		0,62	-0,06	0,51	-0,18
cac1634	fliC/hag		0,04	-0,20	4,28	4,04	cac2165	fliB		0,62	-0,20	0,59	-0,23
cac1845	motB		0,76	0,05	0,53	-0,18	cac2167	fliC/hag		0,39	-0,15	1,12	0,58
cac1846	motA		0,83	0,00	0,55	-0,27	cac2203	hag		-0,19	-0,66	3,29	2,82
cac2139	fliG		0,59	0,45	0,28	0,13	cac2205	fliD		-0,07	-0,03	1,15	1,19
cac2140	fliG		0,53	0,36	0,38	0,21	cac2206	fliS		0,04	-0,09	1,27	1,14
cac2147	fliA		0,28	0,06	-0,14	-0,36	cac2211	fliL		-0,09	-0,21	1,47	1,35
cac2148	fliB		0,20	0,01	-0,23	-0,42	cac2212	fliK		-0,08	-0,23	1,51	1,36
cac2149	fliQ		-0,02	-0,15	-0,36	-0,50	cac2216	fliM		-0,07	-0,01	0,48	0,53
cac2150	fliP		-0,03	-0,09	-0,30	-0,36	cac0120	mcp		0,81	-0,16	-0,15	-1,11
cac2151	fliZ		-0,08	-0,11	-0,16	-0,19	cac0121	cheR		0,19	-0,32	-0,50	-1,01
cac2154	fliE		-0,40	0,12	-0,91	-0,39	cac0586	cheX		0,50	0,02	0,24	-0,25
cac2156	fliD		-0,59	-0,02	-0,87	-0,29	cac0805	mcp		-0,79	0,21	-1,11	-0,11
cac2157	fliK		-0,37	-0,07	-0,53	-0,23	cac2223	cheD		-0,35	-0,15	0,45	0,65
cac2158	fliJ		0,48	-0,04	0,13	-0,40	cac2821	mcp		-0,52	1,06	-0,81	0,76
cac2159	fliI		0,76	-0,01	0,22	-0,55	cac3476	mcp		1,02	0,94	0,21	0,13

(Fortsetzung nächste Seite)

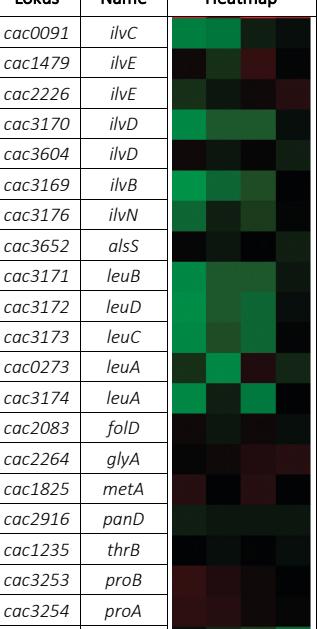
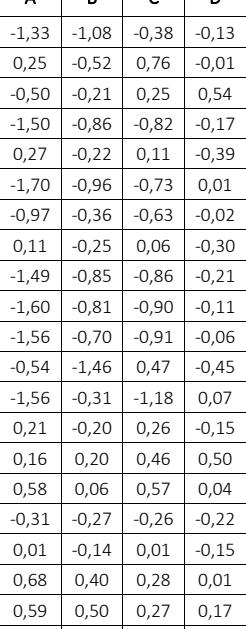
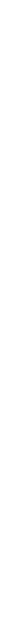
Arginin-/Histidin-/Tryptophan-Biosynthese (COG-Klasse E)

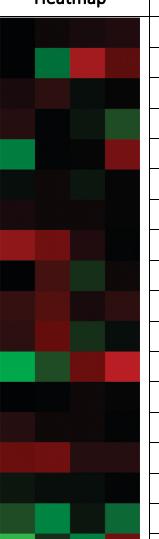
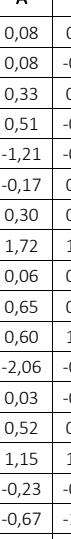
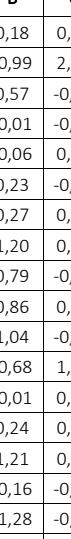
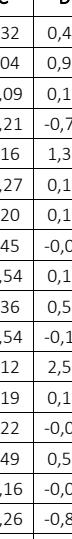
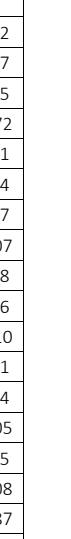
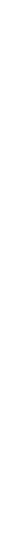
log₂FC-5  5

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac2389	argB		-2,89	0,04	0,73	3,66
cac2390	argC		-1,90	0,51	0,41	2,82
cac2388	argD		-2,64	-0,04	0,79	3,39
cac0316	argF/I		-2,40	0,14	0,63	3,18
cac0973	argG		-2,12	0,25	0,32	2,69
cac0974	argH		-2,13	0,30	0,25	2,67
cac2391	argJ		-1,88	0,48	0,41	2,77
cac3020	argJ2		-2,04	0,16	0,51	2,71
cac2074	argR		0,68	0,92	0,05	0,30
cac2645	carA		-1,38	0,27	0,74	2,40
cac2644	carB		-1,53	0,24	0,53	2,30
cac2378	dapA1		0,69	0,28	0,68	0,27
cac2379	dapB		0,73	0,26	0,67	0,20
cac2381	dapD		0,78	-0,59	0,95	-0,42
cac2624	dapF		0,18	0,15	0,14	0,11
cac3600	dapA2		0,02	-0,59	0,62	0,02

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0943	his_2		0,79	-0,09	0,94	0,06
cac0940	hisA		0,68	0,16	0,59	0,07
cac0938	hisB		0,82	0,23	0,40	-0,19
cac3031	hisC		0,06	-0,18	-0,09	-0,33
cac0937	hisD		0,67	0,27	0,39	-0,01
cac0941	hisF		0,56	0,07	0,67	0,18
cac0936	hisG		0,70	0,31	0,68	0,28
cac0939	hisH		0,63	0,24	0,50	0,11
cac0942	hisI_1		0,64	-0,03	0,91	0,24
cac2727	hisK		0,61	0,51	0,10	0,00
cac0935	hisZ		0,85	0,25	0,78	0,18
cac3157	trpA		3,50	1,08	4,34	1,92
cac3158	trpB		3,08	1,09	4,03	2,03
cac3160	trpC		3,71	1,23	4,76	2,29
cac3161	trpD		3,47	1,36	4,65	2,53
cac3159	trpF		3,64	1,20	4,87	2,43

Verzweigtkettige u. a. Aminosäuren
(COG-Klasse E)

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0091	ilvC		-1,33	-1,08	-0,38	-0,13
cac1479	ilvE		0,25	-0,52	0,76	-0,01
cac2226	ilvE		-0,50	-0,21	0,25	0,54
cac3170	ilvD		-1,50	-0,86	-0,82	-0,17
cac3604	ilvD		0,27	-0,22	0,11	-0,39
cac3169	ilvB		-1,70	-0,96	-0,73	0,01
cac3176	ilvN		-0,97	-0,36	-0,63	-0,02
cac3652	alsS		0,11	-0,25	0,06	-0,30
cac3171	leuB		-1,49	-0,85	-0,86	-0,21
cac3172	leuD		-1,60	-0,81	-0,90	-0,11
cac3173	leuC		-1,56	-0,70	-0,91	-0,06
cac0273	leuA		-0,54	-1,46	0,47	-0,45
cac3174	leuA		-1,56	-0,31	-1,18	0,07
cac2083	folD		0,21	-0,20	0,26	-0,15
cac2264	glyA		0,16	0,20	0,46	0,50
cac1825	metA		0,58	0,06	0,57	0,04
cac2916	panD		-0,31	-0,27	-0,26	-0,22
cac1235	thrB		0,01	-0,14	0,01	-0,15
cac3253	proB		0,68	0,40	0,28	0,01
cac3254	proA		0,59	0,50	0,27	0,17
cac3331	alr2		-0,11	-0,40	-0,62	-0,91

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0066	cac0066		0,08	0,18	0,32	0,42
cac0164	cac0164		0,08	-0,99	2,04	0,97
cac0226	cac0226		0,33	0,57	-0,09	0,15
cac0245	cac0245		0,51	-0,01	-0,21	-0,72
cac0319	cac0319		-1,21	-0,06	0,16	1,31
cac0373	cac0373		-0,17	0,23	-0,27	0,14
cac0453	cac0453		0,30	0,27	0,20	0,17
cac0526	cac0526		1,72	1,20	0,45	-0,07
cac0822	cac0822		0,06	0,79	-0,54	0,18
cac1518	cac1518		0,65	0,86	0,36	0,56
cac1535	cac1535		0,60	1,04	-0,54	-0,10
cac1998	cac1998		-2,06	-0,68	1,12	2,51
cac2256	cac2256		0,03	-0,01	0,19	0,14
cac2328	cac2328		0,52	0,24	0,22	-0,05
cac2732	cac2732		1,15	1,21	0,49	0,55
cac3560	cac3560		-0,23	-0,16	-0,16	-0,08
cac3585	cac3585		-0,67	-1,28	-0,26	-0,87
cac3616	cac3616		-3,00	-0,52	-1,25	1,23

(Fortsetzung nächste Seite)

Sporulation

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D	Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0016	cac0016		-2,93	-3,95	1,19	0,17	cac2857	cac2857		-2,05	0,74	-7,17	-4,38
cac0469	spmA		-2,65	0,00	-5,98	-3,32	cac2861	spolID		-2,47	0,03	-3,77	-1,27
cac0470	spmB		-3,07	-0,28	-4,43	-1,63	cac2906	cac2906		-3,23	-0,70	-7,76	-5,23
cac0581	spoVR		-2,49	0,24	-5,65	-2,92	cac3244	cac3244		-2,33	-0,30	-5,43	-3,39
cac1017	cac1017		-4,31	1,00	-6,15	-0,84	cac3649	spoVT		3,71	0,08	-0,87	-4,50
cac1276	spolIP		-2,12	-0,01	-3,36	-1,24	cac0310	spoVT		-0,80	0,28	-0,48	0,61
cac1298	cac1298		-2,49	-0,03	-5,37	-2,91	cac2071	spoOA		-0,70	0,38	-0,89	0,18
cac1402	cac1402		-2,82	0,81	-5,16	-1,53	cac3152	sigH		0,16	0,64	-0,41	0,07
cac1941	cac1941		2,01	0,25	-0,25	-2,01	cac3319	cac3319		0,64	0,68	0,76	0,80
cac2086	cac2086		-3,93	0,17	-5,84	-1,75	cac0903	cac0903		-0,61	1,35	-2,58	-0,62
cac2087	cac2087		-4,04	0,19	-5,95	-1,73	cac0329	cac0329		0,38	0,01	0,28	-0,09
cac2088	cac2088		-3,88	0,23	-5,57	-1,46	cac0437	cac0437		-0,94	-0,04	-0,68	0,22
cac2089	cac2089		-3,61	-0,10	-5,12	-1,61	cac0323	cac0323		-0,44	-0,61	0,35	0,18
cac2090	cac2090		-3,18	0,08	-5,48	-2,22	cac3647	cac3647		0,77	0,18	-0,45	-1,04
cac2091	cac2091		-4,11	0,11	-5,69	-1,48	cac1689	sigK		-0,71	-0,30	-5,16	-4,75
cac2092	cac2092		-3,34	0,25	-6,06	-2,47	cac1253	cac1253		-1,47	0,30	-2,50	-0,73
cac2093	cac2093		-3,13	-0,04	-6,13	-3,04	cac1696	sigG		-0,92	2,45	-4,60	-1,23

Entgiftungsenzyme (COG-Klasse C + P)

Cobalamin-Biosynthese (COG-Klasse H)

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac1027	fprA1		-0,35	0,02	-0,55	-0,17
cac2448	nroR		0,14	0,25	-0,97	-0,85
cac2449	fprA2		0,62	0,33	-0,46	-0,75
cac2450	dfx		0,81	0,63	-0,35	-0,52
cac2575	rubY		-1,71	1,30	-3,93	-0,92
cac2634	perR		0,28	-0,08	-0,67	-1,03
cac2778	rd		-0,03	-0,13	-1,24	-1,34
cac2800	cac2800		-1,81	-2,32	-5,52	-6,03
cac3018	rbr2		0,77	0,22	0,40	-0,14
cac3229	namA		-0,91	1,01	-2,25	-0,34
cac3306	tpx		-0,08	-0,17	-1,55	-1,64
cac3597	rpr2		-0,42	-1,67	-0,87	-2,13
cac3598	rpr1		-0,95	-1,51	-1,01	-1,57

Lokus	Name	Heatmap	A	B	C	D
cac0582	cobD		-0,13	0,16	-0,07	0,23
cac1372	cobT		-3,08	-0,89	-0,37	1,82
cac1374	cbiP		-2,86	-0,99	-0,36	1,51
cac1375	cobB		-2,81	-0,86	-0,49	1,45
cac1377	cbiD		-2,53	-0,78	-0,45	1,30
cac1384	cobS		-2,30	-0,71	-0,64	0,96
cac1391	purC		-0,16	-0,16	0,29	0,29
cac1993	moaA		-2,31	-0,82	0,84	2,33
cac1992	moaC		-2,13	-0,71	0,84	2,26

Abbildung 7.12 - Transkriptomdaten ausgewählter Gene von *C. acetobutylicum*.

Gene (Lokus, Name) und dazugehörige Veränderungen der Transkriptmengen als log₂FC. Dargestellt ist die Transkriptmengenveränderung von (A) Wildtyp und (B) Insertionsmutante *argR92a::CT* unter 300 mM NaCl-Stress im Vergleich zur ungestressten Kontrolle, sowie die Transkriptmengenveränderung von der Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp (C) ohne Stresseinwirkung und (D) unter 300 mM NaCl-Stress. Die Erstellung der Heatmaps erfolgte durch <http://www.heatmapper.ca/> (Babicki *et al.* 2016), wobei Gene mit höheren Transkriptmengen rot und solche mit verringerten Transkriptmengen grün dargestellt sind.

Danksagung

Am Ende bin ich nun angelangt.
Hier ist es Brauch, dass man sich bedankt.
Dies möchte ich jetzt hier vollbringen
und auf einige Menschen ein Loblied singen.

Seit ich das Studium angefangen
ist schon viel Zeit ins Land gegangen.
Doch ich weiß noch damals, im Hans Spemann-Hörsaal:
die erste Vorlesung bei Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl.**

Voller Hingabe und Begeisterung
erzählte er von *Clostridium acetobutylicum*.
So war auch ich bald voller Elan
und von der Mikrobiologie sehr angetan.

Ich danke ihm für all die Möglichkeiten,
meinen Weg bis hierher zu beschreiten,
und für das entgegengesetzte Vertrauen,
diese Arbeit aufzubauen.

Auch Herrn **Dr. Ralf-Jörg Fischer** danke ich sehr,
für konstruktive Kritik, Ratschläge und noch viel mehr.
Er hat mich ebenfalls zur Mikrobiologie gebracht
mit seiner Vorlesung über Bacilli, Brötchen und Kokken in all ihrer Pracht.

Seit langem hat er mich wissenschaftlich betreut
und weder Fragen noch Mühen gescheut.
Von Bachelor- bis Doktorarbeit hat er Texte korrigiert
und stets mit seiner Expertise brilliert.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen,
die mich begleiteten auf meinen Wegen.

Viele Altbekannte und Neue
hielten und halten mir stets die Treue:

Als gute Feen im Labor
taten sich **Ilona Boldt, Monika Timm, und Hella Goschke** hervor.
Ob Medium, Protokolle oder RNA,
wusste ich nicht weiter, so waren sie für mich da.

Mit Bürokratie im Endstadium
schlug sich vor allem **Regina Karstädt** herum.
Dank ihr brauchte ich bei Formularen nicht zu verzagen
und bekam immer Antworten auf bürokratische Fragen.

Mein Dank gilt auch **Julia Strübing** und **Dr. Katja Kriebel** aus dem S2-Labor.
Sie brachten immer Spaß und Motivation hervor.
Mit Kuchen, Elan und viel Expertise
holten sie mich aus so mancher Krise.

Auch bei **Prof. Dr. Martin Hagemann** und der **AG Pflanzenphysiologie** bedanke ich mich.

Sie ließen einen Doktoranden in Not niemals im Stich.

Ob Tipps, Rotoren oder allerlei Kleinigkeiten,
dank ihnen konnte ich viele Experimente bestreiten.

Klaudia Michl sei dabei besonders genannt,
die HPLC-Analysen lagen in ihrer Hand.

Auch **Dr. Katrin Gärtner** danke ich für ihre Zuversicht
und manch schönen Spaß am Kaffeetisch.

Dr. Anja Poehlein vom *Genomics Laboratory* in Göttingen
danke ich für das *Next Generation Sequencing*.

Die Transkriptomdaten brachten mit viele Ideen
und halfen mir, meine Ergebnisse zu verstehen.

Viele ehemalige Kollegen halte ich in guter Erinnerung.

Sie brachten in meinen Laboralltag Unterstützung, Spaß und Schwung.

So richte ich Worte des Dankes an:

Dr. Daniela Wetzel, Dr. Markus Klipp, Christoph Prohaska und Katja Zimmermann.

Doch neue Verstärkung kam von vielen Seiten
und half, den letzten Rest der Arbeit zu bestreiten.

Durch viel Zuspruch, Ansporn und Geduld
stehe ich auch in eurer Schuld:

Das Team Technische Chemie
brachte Spiel, Spaß und Spannung wie noch nie.

Mein Dank gebührt vor allem **Dennis Hülsewede** und **Dr. Lars-Erik Meyer**,
für ihre Ideen, den Beistand und manch tolle Feier.

Auch meiner neuen Arbeits-Crew
stehen Worte des Dankes zu.

Jun.-Prof. Dr. Mirko Basen, Dr. Benjamin Zeldes, Laura Nissen und Christoph Baum
sind ein Team wie aus dem Traum.

All meinen Freunden möchte ich auch Danke sagen,
denn sie haben mein „Wenn ich dann fertig bin...“ lange ertragen.

Viele von ihnen werden jetzt frohlocken,
denn endlich können wir wieder gemeinsam zocken.

Meiner Familie widme ich die letzten Worte der Dankesbotschaft.

Ich danke euch für die Unterstützung und Kraft.

Dank euch konnte ich all das hier erreichen.

Von Anfang an stelltet ihr mir die Weichen.

Nun endlich ist die Arbeit geschrieben,
sie hat mich auch sehr lange umgetrieben.

Doch eure Geduld war zum Glück nicht vergebens
so bleib ich wohl nicht Student für den Rest meines Lebens.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet habe. Die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen sind als solche gekennzeichnet.

Rostock, den 20.07.2020

Maria Lehmann