

**Das Proteom und Transkriptom
von *Clostridium acetobutylicum*
bei unterschiedlichen pH-Werten
im Chemostaten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Holger Janssen

Rostock, Oktober 2010

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0203-3

Wissenschaftliches Kolloquium: **29.11.2010**

Gutachter:

Prof. Dr. Hubert Bahl

Universität Rostock, Mathematisch-

Naturwissenschaftliche Fakultät,

Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer

Universität Rostock, Medizinische Fakultät

Institut für Medizinische Mikrobiologie,

Virologie und Hygiene

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Organismen	6
2.2 Oligonukleotide	6
2.3 Nährmedien	6
2.3.1 Medien für <i>C. acetobutylicum</i>	7
2.3.2 Medienzusätze	8
2.4 Stammhaltung	9
2.5 Batch-Kultur von <i>C. acetobutylicum</i>	9
2.6 Anaerobe Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium	9
2.7 Kontinuierliche Kultur von <i>C. acetobutylicum</i>	9
2.7.1 Vorkultur	9
2.7.2 Kontinuierliche Kulturführung	9
2.8 Bestimmung physiologischer Parameter	11
2.8.1 Optische Dichte	11
2.8.2 Bestimmung von Trockenmasse	11
2.8.3 Messung des pH-Wertes	11
2.8.4 Gaschromatographie	11
2.8.5 Phosphatbestimmung	11
2.9 Arbeit mit Nukleinsäuren	12
2.9.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	12
2.9.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	12
2.9.3 PCR-Techniken	13
2.9.3.1 Primerdesign	13
2.9.3.2 Standard-PCR	14
2.9.3.3 High Fidelity PCR	14
2.9.3.4 Eub-PCR	14
2.9.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	15
2.9.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	15
2.9.4.2 Natriumacetatfällung	15
2.9.4.3 Ammoniumacetatfällung	15
2.9.4.4 DNA-Extraktionen aus Agarosegelen	16
2.9.5 Agarosegelelektrophorese	16
2.9.5.1 Standard-Gelelektrophorese	16
2.9.5.2 Denaturierende Gelelektrophorese	16

2.9.6	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	17
2.9.7	Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	17
2.9.7.1	Sondenherstellung	18
2.9.7.2	Northern Blot	18
2.9.7.3	Northern Blot-Hybridisierung	19
2.9.7.4	Detektion Digoxigenin-markierter DNA (Northern Blot)	19
2.9.8	DNA Micro Array	20
2.10	Arbeiten mit Proteinen	21
2.10.1	Zellaufschluss mittels Ultraschall zur Isolierung von Gesamtprotein	21
2.10.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	22
2.10.3	Zweidimensionale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	22
2.10.3.1	Probenvorbereitung	22
2.10.3.2	Isoelektrische Fokussierung	23
2.10.3.3	Zweidimensionale SDS-PAGE	23
2.10.4	Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie	24
2.10.5	Spotdetktion und –quantifizierung	24
2.10.6	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen	24
2.11	Bezugsquellen	25
3	Experimente und Ergebnisse	26
3.1	Kontinuierliche Kultur von <i>C. acetobutylicum</i>	26
3.1.1	<i>Steady state</i> -Wachstum bei pH 5,7 und pH 4,5	26
3.1.2	<i>Steady state</i> -Wachstum bei pH-Werten zwischen pH 5,7 und pH 4,5	28
3.2	Proteomanalyse von <i>C. acetobutylicum</i>	33
3.2.1	<i>Steady state</i> -Proteome bei pH 5,7 und pH 4,5	33
3.2.2	Proteine mit signifikant erhöhter Spotintensität bei pH 5,7	35
3.2.3	Proteine mit signifikant erhöhter Spotintensität bei pH 4,5	37
3.2.4	Ausgewählte Proteine bei pH 5,7 und pH 4,5	39
3.2.5	<i>Steady state</i> -Proteome der pH-Stufen 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7	40
3.3	Transkriptomanalysen von <i>C. acetobutylicum</i>	46
3.3.1	<i>Steady state</i> -Transkriptom bei pH 5,7 und pH 4,5	46
3.3.2	Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase bei pH 5.7	47
3.3.3	Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase bei pH 4.5	50
3.3.4	Überprüfung der Transkriptmengen von <i>cap0036</i> und <i>cap0037</i>	53
3.3.5	<i>Steady state</i> -Transkriptome der pH-Stufen 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7	54
3.3.5.1	Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase bei pH 5.7	54

3.3.5.2	Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase bei pH 4.5	56
3.3.5.3	Wachstumsphase pH 5,1: Transitionsphase auf Transkriptebene?	59
3.4	Butanolstress in der Säurephase von <i>C. acetobutylicum</i>	59
3.4.1	Untersuchung der Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5	61
3.4.2	Untersuchung der Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase bei pH 5,7	63
3.4.3	Gene mit Transkriptionserhöhung durch Butanol	66
3.4.4	Gene mit Transkriptionsverringerng durch Butanol	67
3.5	Analyse der <i>cap0036</i> _Int Mutation von <i>C. acetobutylicum</i>	68
3.5.1	„Master“-Fermentation und Wachstum im Batch-Verfahren	68
3.5.2	Stabilität der Mutation (<i>cap0036</i> _Int)	70
3.5.3	Mutante <i>cap0036</i> _Int: Proteomanalysen	71
3.5.3.1	Proteom Wildtyp vs. <i>cap0036</i> _Int: Säurephase (pH 5,7)	72
3.5.3.2	Proteom Wildtyp vs. <i>cap0036</i> _Int: Lösungsmittelphase (pH 4,5)	74
3.5.4	Mutante <i>cap0036</i> _Int: Transkriptomanalysen	76
3.5.4.1	Transkriptom Wildtyp und <i>cap0036</i> _Int: Säurephase (pH 5,7)	77
3.5.4.2	Transkriptom Wildtyp und <i>cap0036</i> _Int: Lösungsmittelphase (pH 4,5)	79
4	Diskussion	81
4.1	Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> : pH 5,7 bis 4,5	81
4.2	<i>Steady state</i> -pH 5,7 und 4,5: Proteom und Transkriptom	83
4.2.1	Proteomanalyse mittels 2D-PAGE	83
4.2.2	Transkriptomanalyse mittels DNA Micro Array	84
4.2.3	Integrative Proteom- und Transkriptomanalyse	84
4.3	<i>Steady state</i> -pH 5,5 bis 4,7	87
4.3.1	Proteom- und Transkriptomanalyse	87
4.3.2	<i>Steady state</i> -pH 5,1: Transitionsphase?	89
4.4	Butanolstress für Zellen der Säurephase pH 5,7	90
4.4.1	Beeinflussung der Gentranskription durch Butanol	91
4.4.2	Beeinflussung der Gentranskription durch den pH-Wert	93
4.5	Die Indikatorkandidaten: <i>cap0037-0036</i>	94
4.5.1	Mutante <i>cap0036</i> _Int: Wachstum	97
4.5.2	Mutante <i>cap0036</i> _Int: Proteom und Transkriptom	97
4.5.2.1	Funktionelle Doppelmutante <i>cap0036</i> _Int	97
4.5.2.2	Sporulationsgene und das Protein Adc	99
4.5.2.3	Proteine/Gene der Zell-Umhüllung („Cell envelope biogenesis“)	100
5	Zusammenfassung	102

Literaturverzeichnis	VIII
Anhang*	103
Selbständigkeitserklärung	147

*: Der gedruckten Version dieser Arbeit liegt zusätzlich im Anhang eine Daten-CD mit allen zusätzlichen erzielten Ergebnissen bei. In dieser elektronischen Version sind die wichtigsten zusätzlichen Daten schriftlich aufgelistet.

Abkürzungsverzeichnis

2D PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
A	Adenin , Ampere
A.	Aqua
Aa	,amino acid' (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Ap	Ampicillin
APase	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
B.	<i>Bacillus</i>
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
C	Cytosin, Kohlenstoff
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
CGM	Clostridial Growth Medium
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Cm	Chloramphenicol
COG	Clusters of Orthologous Groups
d	Desoxy-
Da	Dalton
dest.	destilliert
dpi	Punkt pro Inch (dots per inch)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiotreitol
E.	<i>Escherichia</i>
Em	Erythromycin
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
ed.	editor (Herausgeber)
f	femto (10^{-15})
Fa.	Firma
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
fw	forward
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
His	Histidin
ICAT	Isotope coded affinity tagging

IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IRD	Infrared Dye
k	kilo
l	Liter
log.	dekadischer Logarithmus
μ	mikro (10^{-6})
m	Meter, milli, ‚messenger‘
M	Molar
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation / time of flight
min	Minute
mod.	modifiziert
MS	Massenspektrometrie
nano	(10^{-9})
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
o	ortho
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
p	para, pico (10^{-12})
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Shrimps alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin, Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	<i>versus</i>
v/v	Volumen pro Volumen

Vol.	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

Bakterien der Gattung *Clostridium*, erfüllen vier gemeinsame Kriterien: (1) die Bakterien besitzen eine Gram-positive Zellwand, (2) sie bilden hitze-resistente Endosporen aus, (3) sie weisen einen obligaten anaeroben Energiestoffwechsel auf und (4) sind nicht in der Lage Sulfat als finalen Elektronenakzeptor zu reduzieren (Rogers, 1999). Aufgrund dieser wenig restriktiven Zuordnung handelt es sich bei den Clostridien um eine sehr große und heterogene Gattung mit auffällender phänotypischer und genotypischer Diversität (Hippe *et al.*, 1991). *Clostridium acetobutylicum* gehört in die Gruppe peritrich begeißelter und amylytisch aktiver Clostridien und ist Anfang des 20. Jahrhunderts von WEIZMANN (1914, Vgl. Gabriel, 1928) isoliert worden. Bemerkenswert ist sein biphasischer Gärungsstoffwechsel (Abb. 1.1). Unter Verwertung von Zuckern oder Stärke ist das exponentielle Wachstum von *C. acetobutylicum* bei pH-Werten über 5, neben der Gasbildung von CO₂ und H₂, durch die typische Säurebildung in Form von Acetat und Butyrat gekennzeichnet und wird daher als Säurephase („Acidogenesis“) bezeichnet. Durch die Bildung dieser Säuren kommt es zum Absinken des pH-Werts unter pH 5 und schließlich auch zur Anreicherung undissoziierter Säuren. Diese zwei Faktoren zusammen mit einem Überschuss an Glukose lösen beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase den sogenannten Lösungsmittel-„Shift“, also den Wechsel des Metabolismus von Säure- zu Lösungsmittelproduktion aus. Dabei nimmt die Zelle ein Teil der vorhandenen Säuren wieder auf und wandelt diese zusammen mit im Medium vorliegenden Zuckerkomponenten in die neutralen Lösungsmittel Aceton und Butanol als dominierende Gärungsprodukte um. Der Organismus befindet sich nun in der so genannten Lösungsmittelphase („Solventogenesis“) (Dürre, 2008b; Jones, 2001; Jones und Woods, 1986; Lee *et al.*, 2008b). Zusätzlich geht die Lösungsmittelbildung in typischen Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* mit einer Reihe von morphologischen Veränderungen der Zellen einher. Es kommt zunächst zur Bildung von zigarrenförmigen, Granulose akkumulierenden „clostridial stage“-Zellen (Jones *et al.*, 1982) und schließlich zur Endosporenbildung (Long *et al.*, 1984 a/b; Mitchell, 2001) (Abb. 1.1).

Aufgrund der Stoffwechsellleistungen von *C. acetobutylicum* wurde dieses Bakterium bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts zur biotechnologischen Produktion der Lösungsmittel Aceton und Butanol (Jones, 2001; Jones und Woods 1986) in empirischen Batch-Verfahren genutzt. Das aktuell wiederentdeckte Potential von *n*-Butanol als Ersatztreibstoff (Dürre, 2007; Lee *et al.*, 2008b; Ni und Sun, 2009) und die steigenden Rohölpreise führten zu einem wiederersticktem wirtschaftlichen Interesse an *C. acetobutylicum*. Obgleich der Hauptstoffwechselweg des Organismus mit all seinen beteiligten Enzymen seit über 20 Jahren bekannt ist (Jones *et al.*, 1986), gilt die genaue Regulation von Säure- und Lösungsmittelbildung und insbesondere des sogenannten Lösungsmittel-„Shifts“ bis heute als nicht aufgeklärt. Die intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten führte zu einem dazu, dass *C. acetobutylicum* sich zu einem Modellorganismus für apathogene Clostridien entwickelte. Zum anderen wurden gerade in den letzten zwei Jahrzehnten zahlreiche Methoden zur genetischen Modifikation des

Organismus entwickelt, vor allem um die Butanolausbeute zu erhöhen (Heap *et al.*, 2007; Mermelstein und Papoutsakis, 1993; Tumalla *et al.*, 1999; Tumalla *et al.*, 2003).

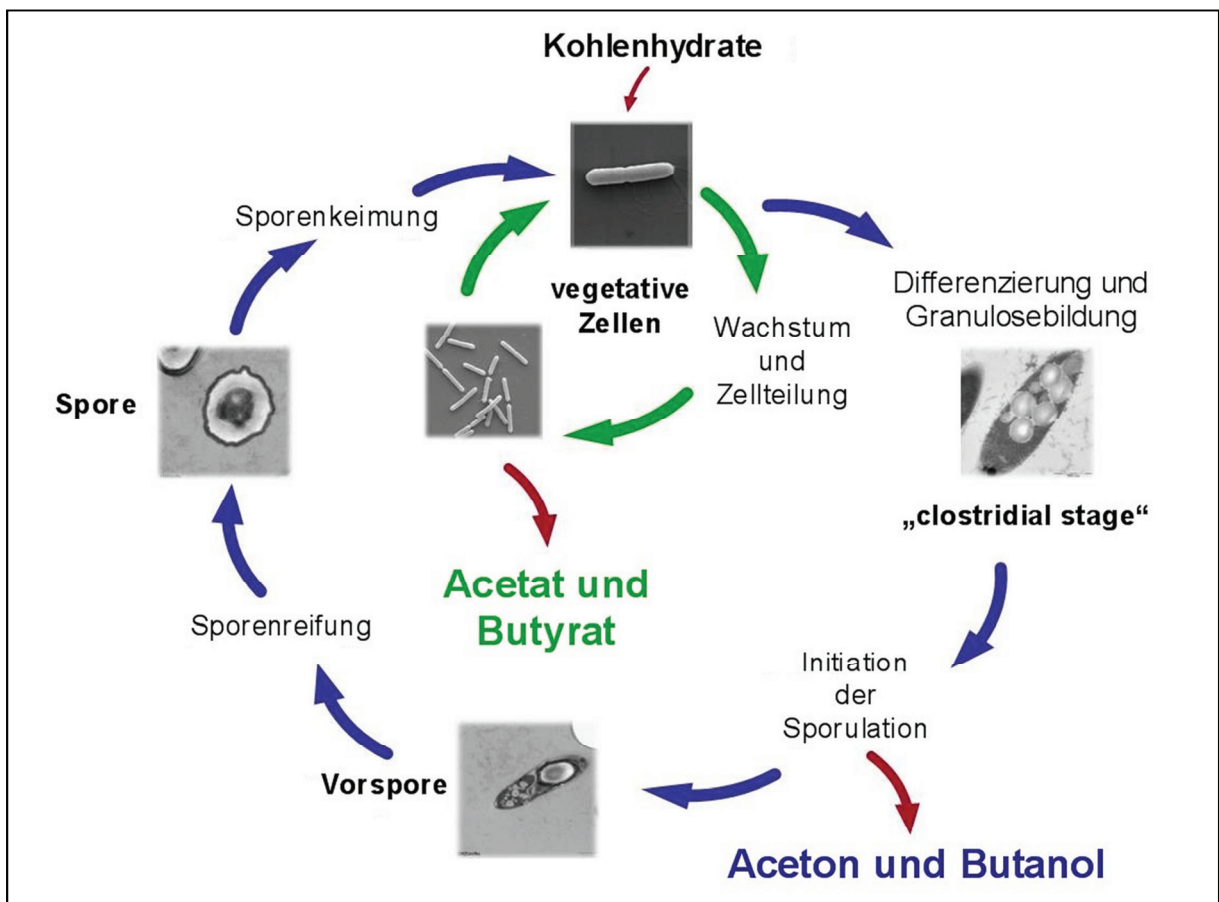


Abbildung 1.1: Zellzyklus von *C. acetobutylicum*. Dargestellt ist das biphasische Wachstum mit den charakteristischen Endprodukten in der Säure- (Acetat und Butyrat) und Lösungsmittelphase (Aceton und Butanol).

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.*, 2001) führte zu Transkriptionsanalysen des Bakteriums mittels DNA Micro Array Chips (Alsaker und Papoutsakis, 2005; Jones *et al.*, 2008; Tomas *et al.*, 2003a) sowie zu Proteomuntersuchungen (Schaffer *et al.*, 2002; Sullivan und Bennett, 2006). Diese „Omics“-Technologien erleichtern die Identifikation potentieller Gene/Proteine, die an der Regulation des Lösungsmittel-„Shifts“ beteiligt sind. Und obwohl die oben genannten Arbeiten wertvolle Informationen zur Aufklärung des Lösungsmittel-„Shifts“ lieferten, wurden alle Untersuchungen in Batch-Kulturen durchgeführt und unterliegen somit dem Nachteil schwieriger Reproduzierbarkeit. Ein wichtiger Schritt zur Untersuchung des biphasischen Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* unter definierten Wachstumsbedingungen und ohne wechselnde Umweltparameter war die Etablierung von Chemostat-Kulturen (Bahl *et al.*, 1982b). Im Chemostaten werden standardisierte Bedingungen mit einem maximalen Grad an Reproduzierbarkeit gewährleistet. Im so genannten Fließgleichgewicht („*steady-state*“) befinden sich alle Zellen im Chemostaten in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Wachstumsrate ist durch die Zuflussrate eines limitierenden Nährstoffes definiert. Dementsprechend entspricht die Wachstumsrate der

Bakterien der Durchflussrate, also der Geschwindigkeit, mit der frisches Medium zugeführt und Kultur abgeführt wird. Im *steady-state* sind alle endogenen und exogenen Parameter (z. B. Wachstumsrate, Substrat- und Produktkonzentration) konstant. Obwohl für die industriell relevante Butanolproduktion die kontinuierliche Kulturführung im Vergleich zur sogenannten Batch- oder Fed-Batch-Kultur als nicht wettbewerbsfähig angesehen wird (Jones *et al.*, 1986), ist der Chemostat für die Grundlagenforschung nützlich um spezifische Parameter unter annähernd gleichbleibenden Bedingungen untersuchen zu können (Bahl *et al.*, 1982a). Für *C. acetobutylicum* hat insbesondere die Nutzung phosphatlimitierter kontinuierlicher Kulturen zwei signifikante Vorteile: (1) Abhängig vom pH-Wert können die beiden Gärungsstoffwechselphasen über mehrere Tage (Säurephase) bis hin zu mehreren Monaten (Lösungsmittelphase) stabil aufrecht erhalten werden. (2) Es ist möglich Sporulation und Lösungsmittelbildung strikt voneinander zu trennen, was in statischen Kulturen nicht gegeben ist.

Im Rahmen des europäischen SysMO („systems biology of micoorganisms“)-Projektes COSMIC („Clostridium acetobutylicum systems microbiology“) (0313981D; www.sysmo.net), gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), werden unter Verwendung kontinuierlicher Kulturen, aufgrund der oben genannten Vorteile gegenüber statischer Kulturen, extensive Analysen der biologischen Prozesse unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines allgemeinen stöchiometrischen *in silico* Modells des Lösungsmittel-„Shifts“ von *C. acetobutylicum*. Es sollen u. a. potentielle Regulatoren aufgedeckt werden, die neben SPO0A~P (Harris *et al.*, 2002) in den definierten Wachstumsphasen eine tragende Rolle einnehmen. Zusätzlich soll die Untersuchung von verschiedensten Umwelteinflüssen, wie z. B. Butanol- oder oxidativer Stress, zur Aufdeckung von Stressproteinen führen und deren Einfluss auf den Lösungsmittel-„Shift“ herausgestellt werden. Die Untersuchung der pH- und phosphatbedingten Transition von der Säure- zur Lösungsmittelphase im Chemostaten liefert reproduzierbare und präzise experimentelle Daten. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung rechenbasierter *in silico* Modelle. Solche *in silico* Modelle wurden jüngst, meist auf Grundlage von Datenbanken oder verschiedenster Literaturdaten, für den Organismus *C. acetobutylicum* (Senger und Papoutsakis, 2008a/b; Lee *et al.*, 2008a) oder für die allgemeine Aceton-Butanol-Fermentation (Shinto *et al.*, 2007; 2008) entwickelt. Wie Grundlagenforschung an einem Organismus, unter der Anwendung der „Omics“-Technologien „Metabolomics“, „Transcriptomics“ und „Proteomics“, im Zusammenspiel mit *in silico* Modellen zum erweiterten Verständnis von biologischen Prozessen und insbesondere zur erhöhten Butanolproduktion beitragen kann, wurde von LEE *et al.* (2008b) eingehend als potentieller optimaler Bioprozess aufgezeigt (Abb. 1.2). Eine wichtige Voraussetzung für die Erstellung grundlegender *in silico* Modelle ist die Analyse eines Organismus unter dem Einfluss definierter Umweltfaktoren, die es erlauben die Auswirkungen der Veränderungen eines einzigen Parameters exakt zu untersuchen. Auf der Basis von kontinuierlichen Kulturen wurde daher im Rahmen dieser Arbeit ein systembiologischer Ansatz zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf den Metabolismus von *C. acetobutylicum* verfolgt.

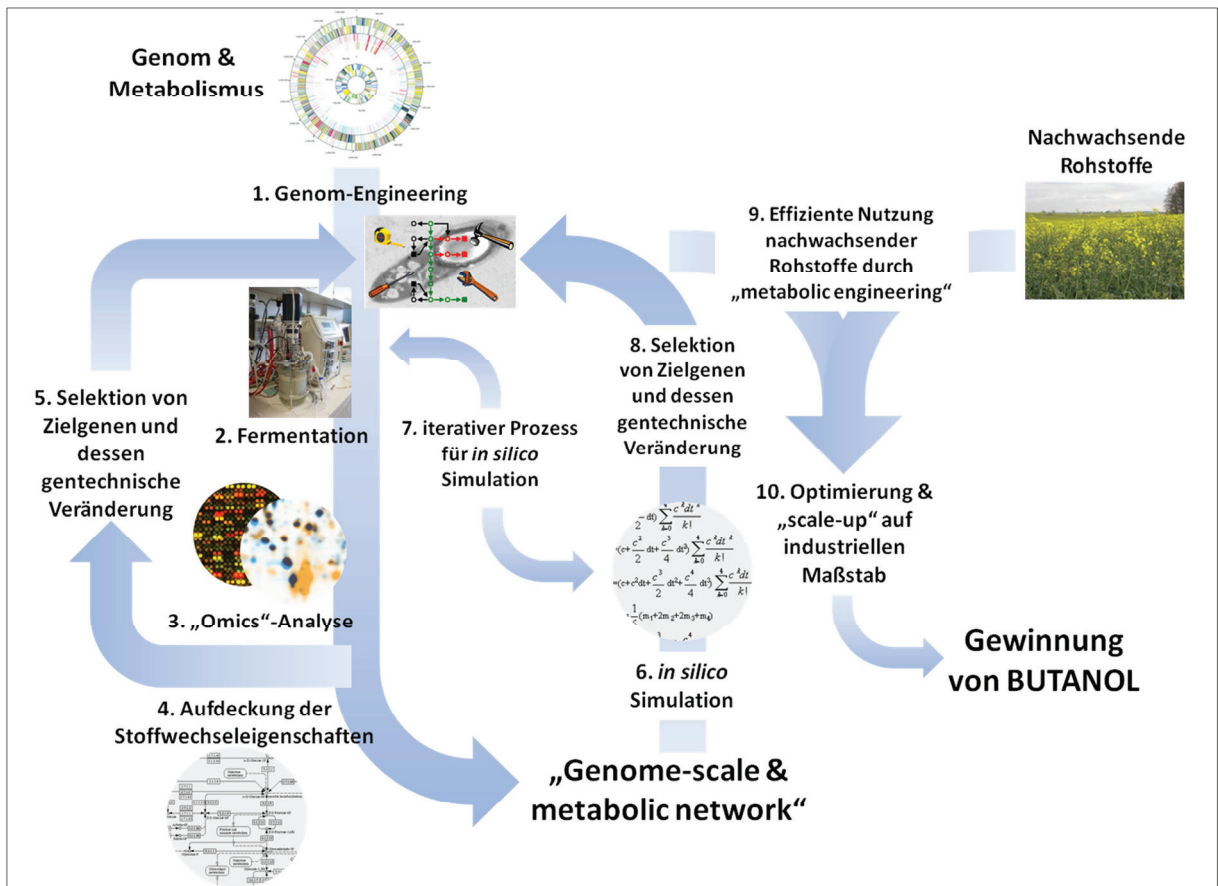


Abbildung 1.2: Entwicklung eines optimalen Bioprozesses für die Butanolproduktion. Darstellung des Zusammenspiels von Grundlagenforschung (Genomsequenz, Wachstumsdaten, „Omics“-Analysen) und *in silico* Modellen zur Optimierung des biologischen Prozesses der Butanolproduktion (mod. nach Lee *et al.*, 2008b).

Durch das stufenweise Einstellen des *steady state*-pHs sollte der kritische pH-Wert ermittelt werden, bei dem der Organismus von Säure- auf Lösungsmittelphase umschaltet. Für die Ausgangs-pH-Punkte wurden pH 5,7 für die Säurephase und pH 4,5 für die Lösungsmittelphase gewählt. Somit war es das Ziel das *steady state*-Wachstum von *C. acetobutylicum* bei den pH-Punkten 5,7, 5,5, 5,3, 5,1, 4,9, 4,7 und 4,5 genauer zu untersuchen, um den kritischen pH-Punkt zu ermitteln, bei dem der Metabolismus von Säure- zur Lösungsmittelbildung wechselt. Die erneute Untersuchung der *steady state*-pH-Werte, in Anlehnung an die historischen Versuche von BÄHL *et al.* (1982a/b), hatte den Grund der erstmaligen Durchführung einer integrativen „Omics“-Analyse von Proteom- und Transkriptom. Die Analyse des Proteoms in Kombination mit der Analyse des Transkriptoms hat eine hohe experimentelle Relevanz. Eine isolierte Analyse von entweder Proteom oder Transkriptom würde ein biologisches System nicht ausreichend repräsentieren (Park *et al.*, 2005).

Bei der Anwendung der „Proteomics“-Technologie wird die Gesamtheit aller vorhandenen cytosolischer Proteine (Proteom) mittels 2D PAGE (O’Farrell, 1975) dargestellt. Bei dieser Methode werden die Proteine zuerst anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) und anschließend anhand ihrer Masse aufgetrennt. Die so im Gel entstehenden Spots können dann ausgestochen und die entsprechenden Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden. Zusätzlich zum Gesamtproteinlevel der Zelle (Proteom) sollte parallel, unter Verwendung von DNA Micro Arrays

(Schena *et al.*, 1995), auch eine globale Analyse der Genexpression (Transkriptom) erfolgen. Dadurch können alle produzierten mRNA-Moleküle bzw. Transkripte dokumentiert werden. Die neu entwickelten DNA Micro Array Chips wurden im Rahmen des COSMIC-Projektes vom Kooperationspartner der Universität Göttingen (C. Grimmeler, A. Ehrenreich) zur Verfügung gestellt. Die Anwendung solch einer „Transcriptomic“-Technologie kann dann zur Aufdeckung einzelner Gene führen, die an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind. Darüber hinaus können die Transkriptomdaten auch der Identifikation von potentiellen Regulon- oder Operon-Strukturen dienen (Ye *et al.* 2001). Im Zuge dieser globalen Analyse des *steady state*-Wachstums bei unterschiedlichen pH-Werten, sollten abschließend potentielle Schlüssel- oder Markerkandidaten (Proteine, Gene) detektiert werden, welche in den Wechsel von Säure- zur Lösungsmittelphase involviert sind bzw. die Säure- und/oder Lösungsmittelphase reflektieren. Von detektierten Markerkandidaten sollten nach Möglichkeit Insertionsmutanten erzeugt werden (Heap *et al.*, 2007), um deren Relevanz auf den Stoffwechsel des Organismus oder dessen Regulation näher zu untersuchen. Auch bei der Analyse potentieller Mutanten sollte das *steady state*-Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten dokumentiert und vergleichende Proteom- und Transkriptomuntersuchungen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders dokumentiert wurden alle hitzestabilen Lösungen und Geräte bei 121 °C für 20 min autoklaviert, hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (Einwegfilter; Porengröße 0,2 µm).

2.1 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Tabelle 2.1: Organismen

Organismus	relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Wildtyp	COSMIC Stamm/ Laborsammlung #205
<i>Clostridium acetobutylicum</i> int::cap0036	cap0036::ClosTron/ ErmRAM_Int73	Prof. Dr. P. Dürre, Universität Ulm/ Laborsammlung #108

2.2. Oligonukleotide (Primer)

In der Tabelle 2.2 sind alle Primer aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2.2: Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m °C*
Eub1 (Fw)	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	56,7
Eub2 (Rev)	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	59,4
Cap0036_Fw	TGTTTTATCATAGAAAGCCTTTTG	49,9
Cap0036_Rev	GAAAATACAGCATCTCTTGTTTC	49,7
Cap0037_Fw	GAACAAGAGATGCTGTATTTTC	49,7
Cap0037_Rev	ACTTCTTGAGATAACTCATATTTTC	48,4

* T_m = 69,3 °C + 0,41 x GC % - 650/L (Chester und Marshak, 1993) (2.9.3.1)

2.3 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden direkt nach der Herstellung für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.3.1 Medien für *C. acetobutylicum*

Die Herstellung anaerober Nährmedien erfolgte nach Breznak und Costilow (1994). Durch das Aufkochen der Medien in einer Mikrowelle wurde gelöster Sauerstoff ausgetrieben, bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration im Medium: 0,0001 % [w/v]). Die anschließende Abkühlung erfolgte unter N₂-Begasung. Wenn keine Entfärbung des Mediums eintrat, wurde direkt vor dem Beimpfen vorhandener Restsauerstoff durch Zutropfen von Titanitriolotriessigsäure (Titan-III-NTA) reduziert.

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

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

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

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

Glukose	60	g
Mg ₂ SO ₄ x 7 H ₂ O	0,22	g
KH ₂ PO ₄	0,55	g
K ₂ HPO ₄	0,55	g
FeSO ₄ x H ₂ O	0,011	g
Eisessig	2,3	ml → pH auf 6,6 mit NH ₄ OH
p-Aminobenzoesäure (8 mg/l) **	5	ml
Biotin (0,08 mg/l) **	4	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 %, [w/v])	1	ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000	ml

* Basierend auf MS wurde CaCl₂ durch MES als Puffersubstanz ersetzt.

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

RCA (reinforced clostridial agar)*

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

* Der pH-Wert betrug 6,8. RCA wurde als fertiges Gemisch kommerziell bei der Firma Oxoid (Wesel) erworben.

Minimalmedium für Vorkulturen (MMfVK) (Fischer *et al.*, 2006)

Glukose (50 % [w/v])*	40	ml
CaCO ₃	1	g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
NaCl**	10	mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O**	10	mg

CaCl ₂ x 2 H ₂ O**	10	mg
MnSO ₄ x H ₂ O**	15	mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O**	15	mg
p-Aminobenzoesäure**	2	mg
Thiamin-HCl**	2	mg
Biotin**	0,1	mg
Resazurinlösung (0,1 % [w/v])	1	ml
Na ₂ S ₂ O ₄	35	mg
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1	l

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

** Diese Komponenten wurden zusammen als 100x Stammlösung angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert nach Auftauen und Verwendung in der benötigten Menge bis zu 3x wieder eingefroren werden.

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

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

Der pH-Wert des Mediums wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf 2 eingestellt. Anschließend wurde es mit N₂-Überdruck durch einen Filter EKS 14ØD (Pall SeitzSchenk Filtersysteme, Bad Kreuznach) in eine autoklavierte Mediumsvorratsflasche steril filtriert.

Herstellung von Titan-(III)-NTA-Lösung

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

Die Nitriлотriessigsäure (NTA) wurde in 30 ml *A. dest.* und unter Zugabe von 5 M NaOH gelöst und durch N₂-Begasung anaerobisiert. In der Anaerobenwerkbank erfolgte danach unter ständigem Rühren die gleichzeitige Zugabe der TiCl₃-Lösung und 2 M Na₂CO₃-Lösung, bevor mit anaerobem *Aqua dest.* auf 75 ml aufgefüllt und die fertige Titan-(III) NTA-Lösung steril filtriert werden konnte.

2.3.2 Medienzusätze

Um die gewünschte Selektion zu erhalten konnte den Medien das Antibiotikum Erythromycin (Stammlösung 50 mg/ml Ethanol [96 % v/v]) in einer Arbeitskonzentration von 20 µg/ml beigemischt werden. Dies erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf unter 50 °C.

2.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und *C. acetobutylicum* int::cap0036 erfolgte als jeweilige Sporensuspension im MS Medium (2.3.1) bei -20 °C.

2.5 Batch-Kultur von *C. acetobutylicum*

Die anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* erfolgte bei 37 °C unter abgeschlossener N₂-Atmosphäre in Hungate-Röhrchen für 10-ml-Batch-Kulturen oder in 500-ml-Müller&Krempel-Serumflaschen für Wachstumsanalysen. Ein 10-ml-Hungate Röhrchen mit CGM-Medium (2.2.1) wurde mit 0,1 Volumen einer MS-Sporensuspension (2.3.1) inokuliert und durch Pasteurisierung (15 min, 80 °C) restliche vegetative Zellen der Sporensuspension inaktiviert und die Sporen aktiviert. Danach wurde diese Vorkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert. Im Falle eines notwendigen Medienwechsels ließen sich die Komponenten des Komplexmediums CGM durch zwei Passagen in dem jeweils neuen Nährmedium ausdünnen. Bei Bedarf dienen 10-ml-Vorkulturen (0,1 Volumen) dann als Inokulum für die Batch-Hauptkulturen in 500-ml-Müller&Krempel-Serumflaschen, die aufgrund des Druckanstiegs durch Gasentwicklung nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens gefüllt wurden.

2.6 Anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

C. acetobutylicum konnte ebenfalls auf RCA-Festmedium (2.3.1) ausplattiert werden. Dies erfolgte bei 37 °C in einer Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-500-anaerobic workstation, meintrup dws laborgeräte, Lähden-Holte) unter N₂-Atmosphäre. Zur Reduktion von eingetragem Sauerstoff wurde eine maximale Konzentration von 5 % [v/v] an Wasserstoff zugegeben. Die Kontrolle der Sauerstoffkonzentration erfolgte regelmäßig mit Indikatorpapier (Anaerobic Indicator BR55, Oxoid, Wesel).

2.7 Kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum*

2.7.1 Vorkultur

Die Vorbereitung der Vorkulturen verlief wie unter 2.5 beschrieben. Zwei 10 ml MMfVK-Vorkulturen dienten zur Inokulation einer weiteren 200 ml MMfVK-Vorkultur. Diese wurde für 8 - 16 h bei 37 °C inkubiert. Ausschließlich gut gasende Kulturen dienten anschließend zum Beimpfen des Kulturgefäßes.

2.7.2 Kontinuierliche Kulturführung

Die kontinuierliche Kulturführung von *C. acetobutylicum* ATCC 824 wurde in einem Kulturgefäß mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 l (BBI, Melsungen) durchgeführt. Der schematische Aufbau ist in der Abbildung 2.1 dargestellt.

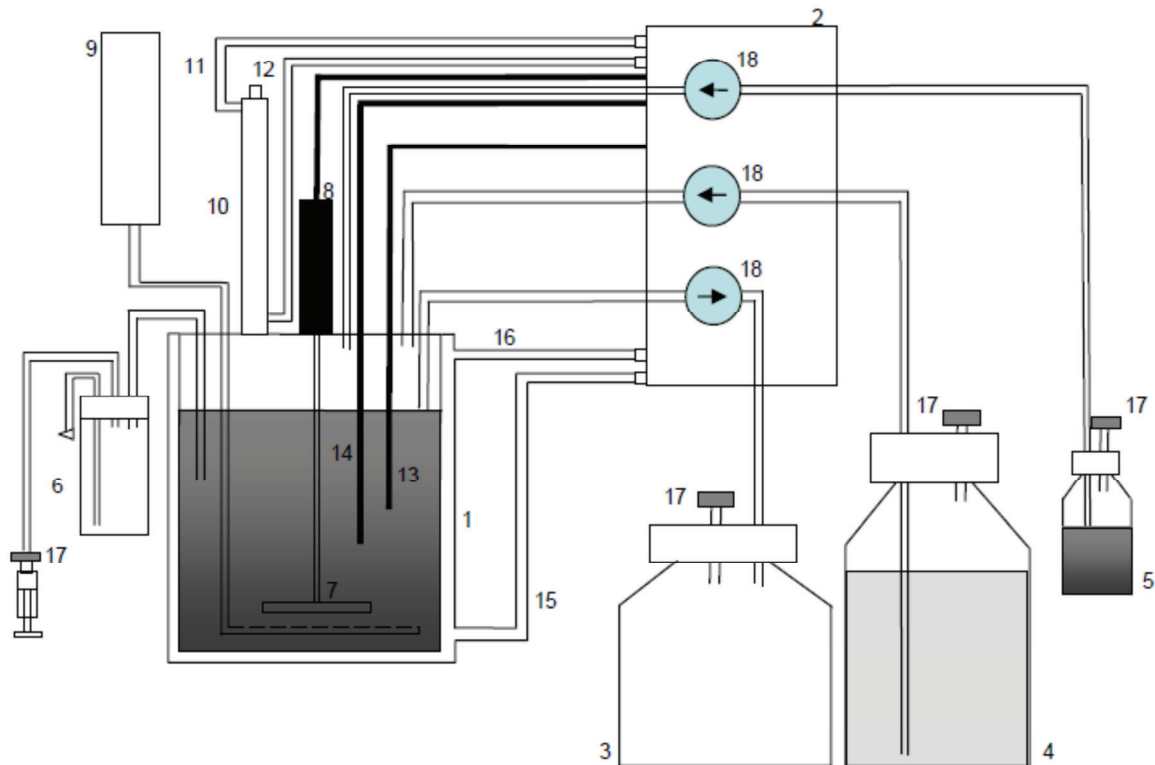


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Fermenters für die phosphatlimitierte kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum* (nach Fiedler, 2006).

(1) 1,5-l-Kulturgefäß mit Glasmantel zur Temperaturregulation; (2) BiostatB-Fermentations-Steuereinheit; (3) Auffanggefäß für Kulturüberstand (20-l-Steilbrustflasche); (4) Vorratsgefäß mit Medium (20-l-Steilbrustflasche); (5) Vorratsgefäß mit 2 M KOH; (6) Handprobennehmer; (7) Rührer; (8) Rührermotor; (9) Begasungsanlage; (10) Abluftkühler; (11) Kühlwasserabfluss; (12) Kühlwasserzulauf; (13) Temperaturfühler; (14) pH-Sonde; (15) Wasserzulauf für Glasmantel; (16) Wasserabfluss für Glasmantel; (17) Sterilfilter; (18) Schlauchpumpe (in Steuereinheit integriert, Pfeile geben die Pumprichtung an)

Der Fermentationsprozess wurde mit einer Regeleinheit vom Typ BIOSTAT B (BBI, Melsungen) gesteuert. Die Kulturführung verlief bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und der pH-Wert wurde durch Zufuhr von 2 M KOH reguliert. Die Zufuhr des phosphatlimitierten Minimalmediums (2.3.1) erfolgte mit einer Durchflussrate von 0,075 h⁻¹. Vor dem Animpfen wurde das mit 1,2 l MMfVK (2.3.1) gefüllte Kulturgefäß autoklaviert und anschließend während des Abkühlens mit Stickstoff durchgast. Vor dem Beimpfen des Kulturgefäßes mit 200 ml einer 8 - 16 h alten, logarithmisch wachsenden Vorkultur (2.7.1) wurde das Medium mit maximal 1 ml einer Titan-(III)-NTA-Lösung bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin reduziert. Nach dem Beimpfen des Kulturgefäßes wurde die N₂-Durchgasung beendet und die Rührung auf 50 Upm eingestellt. Nachdem die Kultur angewachsen war (OD₆₀₀: 2-3) wurde die Begasung ausgestellt und die Rührung auf 200 Upm erhöht. Zusätzlich erfolgte das Anschalten der Zufuhr des Vorratsmediums, was einhergeht mit dem Beginn der kontinuierlichen Kulturführung.

2.8 Bestimmung von physiologischen Parametern

2.8.1 Optische Dichte

Die optische Dichte dient als Wachstumsparameter für Flüssigkulturen und wurde zur Beurteilung des Zellwachstums bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer (Spekol 1100; Analytik Jena AG) gegen einen Medienleerwert in einer Plastikkuvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Bei Extinktionen über 0,3 erfolgte eine entsprechende Verdünnung.

2.8.2 Bestimmung der Trockenmasse

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

2.8.3 Messung des pH-Wertes

Extern wurde der pH-Wert der kontinuierlichen Kultur mit dem pH-Meter WTW pH 526 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) überprüft. Zur Vermeidung von Verunreinigungen des Diaphragmas der Elektrode erfolgte zunächst eine Zentrifugation (5 min, 11.000 x g, 4 °C) der Zellsuspension.

2.8.4 Gaschromatographie (nach Fiedler, 2006)

Die Analyse und Quantifizierung flüssiger Gärungsendprodukte erfolgte mit einem Chrompack CP 9001 Gaschromatographen (Chrompack, Frankfurt/Main) unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID). Als Trägergas diente N₂, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Neben Wasser und Sauerstoff konnten dadurch auch schweflige und chlorierte Substanzreste zurückgehalten werden. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff, wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt. Der Einsatz einer mit Chromosorb 101 (80-100 mesh) gepackten Säule erlaubte die Analyse sowohl von Alkoholen als auch von Carbonsäuren.

2.8.5 Phosphatbestimmung (Zilversmit und Davis, 1950)

Zur Bestimmung extrazellulärer Phosphatkonzentrationen wurde das Protokoll von Fiedler (2006) herangezogen. Dabei bildet Phosphat in salpetersaurer Lösung mit Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat einen gelblichen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge (λ) von 405 nm. Die Messung der Extinktion bei $\lambda = 405$ nm wurde in Plastikkuvetten mit 1 cm Schichtdicke gegen einen Chemikalienblindwert mit H₂O durchgeführt. Die Phosphatbestimmung erfolgte mit jeweils 500 μ l Kulturüberstand.

2.9 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.9.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte auf Grundlage der von Bertram (1989) entwickelten Methode. Dazu wurden 2 ml Zellaliquots aus einer kontinuierlichen Kultur sedimentiert (5 min, 16.000 x g, 4 °C) und anschließend in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei -20 °C eingefroren. Die DNA wurde nach Fiedler (2006) mittels eines standardisierten Protokolls isoliert.

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

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte nach Oelmüller *et al.* (1990). Von der Kultur wurden 2-ml-Proben entnommen, zentrifugiert (1 min, 16.000 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die abzentrifugierten Zellen wurden sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und daraufhin bei -70 °C gelagert.

Die RNA wurde mit Hilfe einer Phenol-Extraktion nach folgendem Protokoll präpariert:

1. Zugabe von 15 µl 25 %iger (w/v) SDS-Lösung zu 1,2 ml saurer Phenol-Lösung (Phenol, wassergesättigt, stabilisiert, pH 4,0; AppliChem, Darmstadt) in ein 2-ml-Reaktionsgefäß, Erhitzen auf 65 °C
2. Suspendieren des gefrorenen Zellpellets in 600 µl AE-Puffer, sofortiger Transfer der Suspension in die heiße Phenol-SDS-Lösung und vortexen
3. Inkubation: 10 min, 65 °C, wiederholtes vortexen
4. Zentrifugation: 15 min, 9.000 x g, 4 °C
5. Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein frisches 2-ml-Reaktionsgefäß und Zugabe von 100 µl 2 M Natriumacetat (pH 5,2)
6. Zugabe von 600 µl Phenol-Lösung (pH 4,0), Invertierung
7. Zentrifugation: 15 min, 9.000 x g, 4 °C
8. Wiederholung der Schritte 5.-7.
9. Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein frisches 2-ml-Reaktionsgefäß
10. Fällung der RNA durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt)
11. Inkubation 2 h, -20 °C (auch über Nacht möglich)
12. Zentrifugation: 1 h, 16.000 x g, 4 °C
13. Waschen des Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
14. Trocknung des Pellets bei RT
15. Suspension des Pellets in 15 µl TE-Puffer
(entweder Lagerung der RNA bei -70 °C oder weiter mit DNase I-Behandlung)
16. Suspension der RNA in 180 µl DNase-Puffer und 5 µl DNase (50 U RNase-freie DNase)
17. Inkubation: 30 min, 37 °C
18. Zugabe von 15 µl 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 500 µl Phenol-Lösung (pH 4,0), Mischen
19. Zentrifugation: 15 min, 9.000 x g, 4 °C
20. Wiederholung der Schritte 9.-14.
21. Suspension des Pellets in 15 µl TE-Puffer
22. Lagerung bei -70 °C

Anschließend wurden die RNA-Proben bei -70 °C gelagert. Eine Überprüfung der Qualität der RNA-Präparationen wurde durch eine Elektrophorese im sterilen 1 %igen Agarosegel (2.9.5.1) erreicht. Die Konzentration jeder RNA-Probe wurde photometrisch bestimmt (2.9.6).

AE-Puffer

Na ₂ Acetat x 3 H ₂ O	272	mg
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37,2	mg
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100	ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit Eisessig auf 5,5 eingestellt.

Natriumacetat

Na ₂ Acetat x 3 H ₂ O	27,22	g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100	ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit Eisessig auf 5,2 eingestellt.

DNase-Puffer

Tris-HCl	0,48	g	40	mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,12	g	6	mM
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 100	ml		

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit HCl auf 7,5 eingestellt.

2.9.3 PCR-Techniken

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde gezielt eingesetzt, um Fragmente zur Herstellung von Sonden zu gewinnen. Die Amplifikation fand in Thermocyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biometra) statt. Zur Gewährleistung einer möglichst geringen Fehlerrate während der Amplifikation wurde für Standard-PCRs die *Pwo*-Polymerase (PeqLab, Erlangen) genutzt, die sich u. a. durch ihre „proofreading-Aktivität“ auszeichnet. Um Fragmente mit einer Größe von mehr als 2.000 Bp zu amplifizieren, wurde ein „High Fidelity Enzyme Mix“ (Fermentas) verwendet. Dieser Enzym-Mix ist ein Gemisch aus einer *proof-reading*- und einer *Taq*-Polymerase. Alle Amplifikationen wurden anschließend mittels Gelelektrophorese kontrolliert (2.9.5.1).

2.9.3.1 Primerdesign

Zur Klonierung der Fragmente wurden Primer (2.2) so abgeleitet, dass sich am 5'- und 3'-Ende des Amplifikats Restriktionsstellen befanden. Nach der Formel von Chester und Marshak (1993) wurden die Schmelztemperaturen der Primer wie folgt berechnet.

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + 0,41 * \text{GC \%} - 650/L$$

GC % gibt hierbei den prozentualen Anteil an Guanin und Cytosin in der Oligonukleotidsequenz an und L die Länge der Sequenz. Ferner wurde darauf geachtet, dass Primer und Gegenprimer nahezu die gleiche Schmelztemperatur besitzen.

2.9.3.2 Standard-PCR

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

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

Die PCR-Reaktion erfolgte gemäß folgendem Programm:

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

2.9.3.3 High Fidelity PCR

Für Amplifikationen unter Verwendung der High Fidelity Polymerase (Fermentas) wurde ein spezifischer Reaktionsansatz verwendet:

Template	100-200	ng
dNTPs (je 10 mM)	1	µl
10x PCR-Puffer + 15 mM MgCl ₂	5	µl
MgCl ₂	2	µl
Fw-Primer (10 µM)	5	µl
Rev-Primer (10 µM)	5	µl
HI-FI PCR Enzyme Mix	1,5	µl
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i> 50	µl

Die PCR-Reaktion erfolgte gemäß folgendem Programm:

Denaturierung	94 °C	3	min	1 x
Denaturierung	94 °C	1	min	← 11 Zyklen
Anlagerung	45 °C	1	min	
Elongation	68 °C	1	min/kBp	
Denaturierung	94 °C	1	min	← 21 Zyklen
Anlagerung	45 °C	3	min	
Elongation	68 °C	1	min/kBp + 10 s	
Elongation	68 °C	3	min	1 x
Lagerung	4 °C	∞		

2.9.3.4 Eub-PCR

Zur Herstellung einer 16S-rRNA-Sonde wurde die Eub-PCR (Hillmann *et al.*, 2009) verwendet (Oligonukleotide Siehe Tab. 2.2). Die Eub-PCR wurde ebenfalls verwendet, um DNA Kontaminationen von DNase I behandelten RNA-Proben auszuschließen, bevor diese für Micro-Array Analysen zum Einsatz kamen (2.9.8). Der PCR-Ansatz entspricht der Standard-PCR (2.9.3.2), jedoch unterschied sich das PCR-Programm (Siehe Folgeseite).

Denaturierung	94 °C	5	min		1 x
Denaturierung	94 °C	20	s	←	9 Zyklen
Anlagerung	48 °C	30	s	←	
Elongation	72 °C	2	min	←	
Denaturierung	94 °C	20	s	←	19 Zyklen
Anlagerung	55 °C	20	s	←	
Elongation	72 °C	1	min	←	
Elongation	72 °C	10	min		
Lagerung	4 °C	∞			

2.9.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.9.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook und Russell, 2001)

Die Aufreinigung und Deproteinierung von DNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Nach Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) zu der DNA-Lösung entstand eine Emulsion. Durch Zentrifugation (Biofuge Fresco; Heraeus) für 3 min bei 6.000 x g und RT, wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Um noch vorhandene Phenolreste aus der Interphase zu entfernen, wurde die Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) und die anschließende Zentrifugation wiederholt, bis die Interphase phenolfrei war. Der letzte Schritt beinhaltete eine Fällung der DNA, wobei PCR-Ansätze mittels Ammoniumacetat (2.9.4.3) präzipitiert wurden.

2.9.4.2 Natriumacetatfällung (Sambrook und Russell, 2001)

Das Gesamtvolumen der Nukleinsäurelösung wurde auf 300 µl erhöht und mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt) versetzt, gründlich gemischt und bei -20 °C für 1 h (alternativ 4 °C ü. N. bzw. -70 °C für 30 min) inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C für 20 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Ethanol (70% [v/v], reinst, eiskalt) gewaschen, anschließend getrocknet und in entsprechender Menge TE-Puffer bzw. *A. dest* aufgenommen. Verwendung fand diese Methode bei der Fällung von chromosomaler DNA.

2.9.4.3 Ammoniumacetatfällung (Sambrook und Russell, 2001)

Wässrige DNA-Lösungen wurden mit 1 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M, pH 7,5) und 3 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt) versetzt, gründlich gemischt und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.9.4.2 beschrieben. Anwendung fand diese Methode bei der Fällung von PCR-Fragmenten. Ihr Vorteil besteht in der geringen Kopräzipitation von Salzen und Oligonukleotiden.

2.9.4.4 DNA-Extraktionen aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die gewünschte DNA-Bande wurde nach der Färbung im Ethidiumbromidbad aus

0,8 - 2 %igen Agarosegelen unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und den Angaben des Herstellers entsprechend mit den im Kit zur Verfügung gestellten Puffern aus der Agarose extrahiert. Abschließend erfolgte eine Kontrolle mittels Gelelektrophorese (2.9.5.1).

2.9.5 Agarosegelelektrophorese

2.9.5.1 Standard-Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001)

Die Analyse von DNA erfolgte mittels Auftrennung in horizontalen Agarosegelen in Agarosegel-Mini-Kammern (Whatman Biometra, Göttingen). In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 2 % ([w/v] in 1x TAE-Puffer). Die RNA-Agarosegelelektrophorese fand mit gesondert gereinigten Elektrophoreseutensilien (2.9), steriler Agarose und sterilem Laufpuffer statt. Die Elektrophoresen wurden in der Regel für 0,5-1,5 h bei 70 - 100 V durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt, um sie zu beschweren und die Lauffront zu visualisieren. Die Nukleinsäuren im Gel konnten durch 30-minütige Inkubation in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml *A. dest.*) gefärbt und bei einer Wellenlänge von 254 nm in einer Photodokumentationsanlage (Gelprint 2000i, MWG Biotech, Ebersberg) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

6x Loading Dye

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

50x TAE-Puffer Stammlösung (Sambrook und Russell, 2001)

Tris-HCl (pH 7,5)	2	M
Eisessig	1	M
EDTA	50	mM

2.9.5.2 Denaturierende Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001)

Für Northern Blots (2.9.9.2) wurde RNA unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel aufgetrennt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Zugabe von Formaldehyd und Formamid zu den RNA-Proben sowie Formaldehyd zu Laufpuffer und Agarosegel verhinderte während der Auftrennung die Ausbildung intramolekularer Basenpaarungen. Für die Herstellung des Agarosegels wurde eine 1,5 %ige Agaroselösung autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit Formaldehyd (Endkonzentration 0,7 % [v/v]) und 10 % (v/v) 10x Laufpuffer versetzt. Die RNA-Proben (0,5-15 µg) wurden mit 0,2 Vol. RNA-Auftragspuffer versetzt, anschließend für 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis überführt und kurz an zentrifugiert. Zusätzlich wurden 4 µl Längenstandard aufgetragen. Unter einer konstanten Spannung von 50 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mit Hilfe von 1x Laufpuffer.

10x Laufpuffer

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

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

1x Laufpuffer

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

Formaldehyd wurde nach dem Autoklavieren zugesetzt.

RNA-Auftragspuffer

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

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

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

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

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

2.9.6 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen wurde photometrisch (Ultraspec 3000; Amersham) mittels Messung der Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten durchgeführt. Für eine OD₂₆₀ von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt (Sambrook und Russell, 2001). Die Reinheit der DNA-Lösung ließ sich aus der Ratio (Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀) abschätzen. Für reine DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 (SAMBROOK und RUSSELL, 2001). Zur Konzentrationsbestimmung von isolierter RNA wurden die Proben 1:400 verdünnt und ebenfalls bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Bei einer Ratio zwischen 1,7 und 2,0 liegt die RNA-Lösung rein vor.

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren stellt die Überprüfung im Agarosegel (2.9.5.1.) dar. Die Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration im Gel erfolgte durch Auftrennung der DNA-Fragmente parallel zu einem Marker (MassRuler™ DNA Ladder Mix, SM0403, Fermentas) mit Fragmenten bekannter Konzentrationen. Die Ermittlung der Konzentration konnte dann visuell nach Ethidiumbromidfärbung im Vergleich zur Markerkonzentration erfolgen.

2.9.7 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.9.7.1 Sondenherstellung

Zur Detektion von RNA-Fragmenten in Northern Blots (2.9.9.2) wurden zunächst Sonden entsprechend den Herstellerangaben des „DIG-DNA Labeling Kits“ (Roche, Mannheim) hergestellt. Dabei wurde die Sonden-DNA durch den Einbau von Desoxyuridin-Nukleotiden (dUTPs) mit kovalent gebundenem Digoxigenin markiert. Die Synthese des neuen DNA-Strangs wurde durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Verwendung von hexameren „random“-Primern ermöglicht. Als Matrize für die Markierungsreaktion dienten gelulierte (2.9.4.4) PCR-Produkte mit einer Länge zwischen 500 und 1000 Bp. Die Menge an DNA im Markierungsansatz betrug 100-500 ng. Zur Überprüfung der Markierung wurden 5 µl Kontroll-DNA mitgeführt. Die Matrizen-DNA wurde für 10 min bei 100 °C im Heizblock denaturiert und sofort auf Eis überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Komponenten des „DIG DNA Labeling Kits“ auf Eis:

Hexanukleotid-Mix (10x)	2	µl
dNTP-Markierungs-Mix (10x)*	2	µl
Klenow-Enzym (2 U/µl)	1	µl
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	20	µl

*(1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP, pH 7,5)

Der vollständige Reaktionsansatz wurde gemischt, für 20 h bei 37 °C inkubiert und dann bei 65 °C für 10 min abgestoppt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

2.9.7.2 Northern Blot

Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode, die zur Detektion spezifischer RNA Transkripte genutzt wird. Hierbei wird isolierte RNA elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf die Nylonmembran übertragen. Hierzu wurde die Gesamt-RNA im denaturierenden Agarosegel (2.9.5.2) aufgetrennt und anschließend die Gele zur partiellen Hydrolyse für 5 min in 50 mM NaOH inkubiert und anschließend für 5 min in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) neutralisiert. Die Strangbrüche durch die Hydrolyse sind notwendig, um den Transfer der RNA auf die Membran zu gewährleisten. 4 Lagen Whatman-Papier (Schleicher&Schuell, Dassel) und Nylonmembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und vor dem Aufbau des Blots mit 10x SSC befeuchtet. Auf 10 cm Filterpapier wurden das Whatman-Papier und darauf die befeuchtete Nylonmembran platziert, bevor das Agarosegel luftblasenfrei aufgelegt wurde. Der Blot wurde durch eine gereinigte Glasscheibe und einem Gewicht stabilisiert. Nach 20 h wurde der Blot abgebaut und die Nylonmembran kurz mit 5x SSC-Puffer befeuchtet. Im Anschluss wurde die RNA auf der Nylonmembran mittels 120 kJ UV-Licht (245 nm; UV-Ulliminator) unwiderruflich fixiert. Die Nylonmembran wurde bis zur Hybridisierung bei RT gelagert.

2.9.7.3 Northern Blot- Hybridisierung

Die kovalent an die Membran gebundene RNA sollte nun mit der Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert werden. Hierzu wurde die trockene Membran so in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt,

dass die Membranseite mit der gebundenen RNA nach Innen zeigte. Bevor die tatsächliche Hybridisierung stattfand, erfolgte eine Prähybridisierung mit 15 ml Hybridisierungslösung für 1 h bei 42 °C im Hybridisierungsöfen, wodurch unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Die Sonden wurden in einem Reaktionsgefäß für 10 min bei 100 °C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Daraufhin wurde die Sonde in 10 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und nach dem Entfernen der Prähybridisierungslösung auf die Membran gegeben und inkubiert wie oben beschrieben. Nach etwa 20 h wurde die Hybridisierung durch waschen der Membran für 2 x 5 min in 2x SSC-Puffer mit 0,1 % SDS (w/v) bei RT und 2 x 15 min in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS (w/v) bei 68 °C beendet.

Prä-/Hybridisierungslösung

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

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

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

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

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

2.9.7.4 Detektion Digoxigenin-markierter DNA (Northern Blot)

Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte mit einem Konjugat aus Anti-Digoxigenin-Antikörper und einer alkalischen Phosphatase (Roche, Mannheim). Die alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des Substrats Cyclodioxetanphosphat (CDP), wodurch dieses zerfällt und Licht mit einer Wellenlänge von 466 nm abgibt. Die Detektion der Chemilumineszenzen erfolgte mittels einer entsprechend sensitiven Kamera. Zur Detektion wurde die Membran bei RT wie folgt behandelt:

1. Inkubation der Membran 1 min in Waschpuffer
2. Inkubation für 30 min mit 40 ml Puffer 2 (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) → danach Puffer 2 verwerfen
3. Inkubation mit 20 ml Puffer 2 und 4 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper-Konjugat
4. 2x Waschen mit Puffer 1 für 15 min (Entfernung ungebundener Antikörper)
5. Äquilibrierung der Membran für 2 min mit Puffer 3
6. Inkubation der Membran für 5 min in 5 ml Puffer 3 mit 50 µl CDP-*Star*TM-Stammlösung
7. Membran verpackt in Frischhaltefolie → Signaldetektion mittels Raytest bei 15 s bis 30 min Exposition

Waschpuffer

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

Puffer 1 (pH 7,5)

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

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren eingestellt. Dies erfolgte bis zu einem pH-Wert von 6,7 mit NaOH-Plättchen, danach mit 10 M NaOH.

Puffer 2

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

Puffer 3 (pH 9,5)

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

2.9.8 DNA Micro Array

Die Methode der DNA Micro Array Analyse, entwickelt um die Arbeitsgruppe von Patrick O. Brown (Skena *et al.*, 1995) dient der umfassenden Transkriptionsanalyse eines ausgewählten Organismus. Der Vorteil dieser Methodik ist, dass die Expressionsveränderungen aller Gene simultan untersucht werden können. Die Herstellung und Analysen von Micro Arrays für *C. acetobutylicum*, mit einer Abdeckung für 3840 proteinkodierende Gene, erfolgten in der Abteilung Allgemeine Mikrobiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen (COSMIC [0313981D]-Projekt-Partner C. Grimmmler und Dr. A. Ehrenreich).

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA und deren DNase I Behandlung (2.9.2), folgte die Kontrolle der RNA Integrität im Agarosegel (2.9.5.1), sowie die photometrische Konzentrationsbestimmung (2.9.6). Vor der weiteren Verwendung wurden 2-4 µg RNA einer Kontroll-PCR unterzogen (2.9.3.4), um DNA Kontaminationen auszuschließen. Die weitere Verarbeitung DNA freier RNA-Proben und das darauffolgende Umschreiben in cDNA mit dazugehörigem Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe Cyanin3 (Cy3 Anregungswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm) und Cyanin5 (Cy5 Anregungswellenlänge: 649 nm, Emissionswellenlänge: 670 nm) verlief nach folgendem Protokoll:

1. Zugabe von 2 µl Hexamer Primer Random p(dN)₆ (5 µg/µl) (Roche, Mannheim) zu 25 µg RNA; *ad* 11 µl RNase freies *A. dest*
2. Ansatz vorsichtig mischen und Inkubation für 10 min bei 70 °C („primer annealing“)
3. Proben sofort auf Eis und Zugabe folgender Komponenten
 - 4 µl 5x First strand buffer (Invitrogen, Carlsbad, USA)
 - 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen, Carlsbad, USA)
 - 1 µl dNTP Nukleotid-Mix (0,4 mM dCTP; jeweils 1 mM von dATP, dTTP und dGTP) (Roche, Mannheim)
 - 1 µl dCTP-CyDye-markierte Nukleotide (50 µM Cy3 oder 50 µM Cy5) (GE Healthcare, München)
 - 1 µl SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA)
4. Ansatz vorsichtig mischen und 3 h bei 42 °C inkubieren
5. Proben vor Licht schützen und sofort auf Eis

Nach der Amplifikation der cDNA erfolgte deren Aufreinigung mittels „CyScribe GFX Purification Kit“ (GE Healthcare, München):

8. Zugabe von 2 μ l 2,5 M NaOH; 10 s vortexen, anschließend anzentrifugieren
9. Ansatz bei 37 °C, 15 min inkubieren
10. Zugabe von 10 μ l 2 M HEPES, 10 s vortexen, anschließend anzentrifugieren
11. Vorbereitung der GFX Säule in ein „collection tube“ und Zugabe von 500 μ l „capture buffer“
12. cDNA Ansatz mit „capture buffer“ gut mischen (Reaktions-Gefäß mit 25-50 μ l „capture buffer“ spülen)
13. GFX Säule 30 sec bei 16000 x g zentrifugieren (Durchfluss verwerfen)
14. Zugabe von 600 μ l Waschpuffer auf GFX Säule
15. Siehe Schritt 13.
16. Schritte 14.-15. 3 mal wiederholen
17. nicht gefüllte Säule für 10 s bei 16000 x g zentrifugieren → entfernt Reste des Waschpuffers
18. Überführung der GFX Säule in neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß
19. Zugabe von 40 μ l erhitzten Elutionspuffer (70 °C) auf GFX Säule
20. 5 min bei RT inkubieren
21. GFX Säule bei 16000 x g, 1 min zentrifugieren
22. gereinigte Cy3- oder Cy5-markierte cDNA liegt vor

Die qualitative Analyse der cDNA, deren Hybridisierung mit dem DNA Micro Array Chip für *C. acetobutylicum*, sowie dessen Auswertung und Analyse wurde in Hillmann *et al.* (2009) beschrieben.

2.10 Arbeiten mit Proteinen

2.10.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall zur Isolierung von Gesamtprotein

Zur Gewinnung von Proteinproben für die Analyse in zweidimensionalen Gelen wurden 20 ml Kultur von *C. acetobutylicum* mittels Handprobennehmer aus dem Fermenter entnommen, in vorgekühlte Sarstedt-Röhrchen überführt und auf Eis gehalten. Den Proben wurden 10 mM EDTA und 5 mM PMSF zugesetzt, die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert, der Überstand dekantiert und die Zellen bis zum Aufschluss mit Hilfe einer der folgenden Methoden für 1-10 Tage bei -20 °C gelagert. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese aufgetaut und in 1 ml Aufschlusspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10 mM EDTA, 5 mM PMSF) suspendiert, diese Suspension in 2-ml- Reaktionsgefäße überführt und sofort unter Kühlung mind. 6 und maximal 12 Mal für je 3 min bei einer Intensität von 30 W und einer Frequenz von 20 kHz mit einem Ultraschallgerät (Ultraschall Homogenisator Sonopuls HD60; Bandelin electronic, Berlin) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 20-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C pelletiert und der Proteingehalt im klaren Überstand mittels Bradford-Assay (2.10.2) bestimmt.

2.10.2 Protein-Konzentrationsbestimmung (nach Bradford, 1976)

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde die Methode nach Bradford (1976) angewandt. Die nach dem Zellaufschluss (2.10.1) gewonnenen klaren Überstände wurden 1:10-1:200 mit *A. dest.* verdünnt und je 50 μ l davon mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert mit 50 μ l

A. dest. und 1 ml Bradford-Reagenz im Photometer (Ultrospec 3000, AMERSHAM Buchler GmbH&Co. KG, Braunschweig) gemessen. Mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichgerade im Bereich von 0-0,15 mg/ml konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben errechnet werden. Alle Proteinbestimmungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Bradford-Reagenz

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

* AppliChem, Darmstadt

Das Reagenz wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

2.10.3 Zweidimensionale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

(nach Schwarz *et al.*, 2007)

2.10.3.1 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung auf die 2D PAGE wurde das Gesamtprotein von *C. acetobutylicum* isoliert (2.10.1), die Proteinkonzentration bestimmt (2.10.2) und nach folgendem Protokoll bearbeitet:

1. Lyophilisierung von 300 µg Protein (Vakuum Konzentrator NVZ150, Zirbus Apparate- und Maschinenbau GmbH, Bad Grund)
2. Proben wurden sofort weiterbearbeitet oder bei -20 °C gelagert
3. Lösen der lyophilisierten Proteinprobe in 400 µl Rehydratisierungspuffer (Vortexen)
4. Überstände in Reswelling Tray (GE Healthcare, München) überführen
5. luftblasenfreies Auflegen eines IPG-Strip pH 4-7 (BioRad Laboratories, München) mit der Gelseite nach unten
6. Inkubation des IPG-Strips mit der Probe für 12-18 h bei RT

Rehydratisierungspuffer

Thioharnstoff	2	M
Pharmalyte (3-10) (v/v)	0,5	%
Bromphenolblau	1	Spatelspitze

Der Rehydratisierungspuffer wurde stets frisch angesetzt.

2.10.3.2 Isoelektrische Fokussierung

Die IPG-Strips mit den rehydratisierten Proteinproben wurden für die Isoelektrische Fokussierung in eine Multiphor II-Anlage (GE Healthcare, München) eingesetzt. Das Protokoll verlief genau nach Fiedler (2006). Zunächst wurden 10 ml DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare, München) auf die auf 20 °C vorgekühlte Kühlplatte der Multiphor II-Anlage gegeben und darauf die IPG-Kammer luftblasenfrei positioniert. Danach wurden ebenfalls 10 ml DryStrip Cover Fluid auf die IPG-Kammer pipettiert und eine DryStrip Aligner-Folie (GE Healthcare, München) luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auflegen der IPG-Strips wurden diese kurz in *A. dest.* gespült, um überschüssigen Harnstoff aus dem Rehydratisierungspuffer zu entfernen. Beim Auflegen der IPG-Strips war darauf zu achten, dass diese mit dem sauren Ende in Richtung Anode und der Gelseite nach oben in die entsprechenden

Rinnen der Aligner-Folie eingelegt wurden. Auf die auf einer Linie zueinander ausgerichteten IPG-Strips wurde nun je ein 11 cm langer, mit *A. dest.* befeuchteter Elektroden-Strip (GE Healthcare, München) am sauren und am basischen Ende so aufgelegt, dass er die Gelkante knapp berührte. Anschließend konnten die Elektroden auf die feuchten Elektroden-Strips aufgesetzt und leicht angedrückt werden. Durch Befüllen der IPG-Kammer mit ca. 80 ml Dry Strip Cover Fluid wurden die IPG-Strips vor dem Austrocknen geschützt. Im Anschluss erfolgte die Elektrophorese. Nach Ende der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Strips entweder sofort weiterbearbeitet oder in Alufolie bei -20 °C gelagert (Fiedler, 2006).

2.10.3.3 Zweidimensionale SDS-PAGE

Nach der isoelektrischen Fokussierung (2.10.3.2) erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Alle benötigten Puffer und Lösungen wurden nach Fiedler (2006) angefertigt. Vorbereitend konnten in einem Gießstand (Millipore, Schwalbach) maximal 5 Gele der Größe 25 x 25 cm gleichzeitig gegossen werden. Nach 1,5-2 h waren die Gele vollständig auspolymerisiert und konnten in den unteren Puffertank eines Investigator™ 2D Running System (Genomic Solutions, Saint-Marcel, Frankreich) eingesetzt werden. Der Puffertank wurde mit ca. 10 l auf 15 °C vorgekühltem 1x Laufpuffer gefüllt. Mit Hilfe der eingesetzten Dichtungen wurde die obere gegen die untere Pufferkammer abgedichtet. Nacheinander wurden nun die IPG-Strips für je 15 min in den Äquilibriumslösungen A und B inkubiert. Jeder vorbereitete IPG-Strip konnte dann auf eine Gelkante aufgelegt werden. Zusätzlich wurde pro Gel ein 5 x 5 mm großes Filterpapierstück mit 20 µl Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas) aufgesetzt. Der IPG-Strip und das Filterpapierstück wurden anschließend mit Einbettungsagarose überschichtet. Nachdem der obere Puffertank mit 1x Laufpuffer gefüllt war, konnte die Elektrophorese gestartet werden. Der Probeneinlauf erfolgte bei einer Leistung von 16 W pro Gel für ca. 15 min. Die Leistung konnte dann auf 1200-2000 mW pro Gel abgesenkt und die Elektrophorese über Nacht bei konstanter Kühlung des Puffers auf 15 °C durchgeführt werden. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele einer kolloidalen Coomassie-Färbung (2.10.4) unterzogen.

2.10.4 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

Die zweidimensionalen Gele (2.10.3), aus denen später Proteine für die Identifizierung mittels Massenspektrometrie (2.10.6) ausgestochen wurden, wurden mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Zunächst wurden die Gele für mindestens 12-24 h in 100 ml Fixierer geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 250 ml Färbelösung für mindestens 24 h. Die Gele wurden mit *A. dest.* entfärbt und mittels eines Scanners (UMAX 2100, Biostep Jahnsdorf, Deutschland) dokumentiert (2.10.5). Bis zur weiteren Verwendung wurden die 2D-Gele in 0,05 % (w/v) Natriumazid in Folie eingeschweißt bei 4 °C gelagert.

Fixierer

Essigsäure (v/v)	10	%
Ethanol (96 % [v/v], reinst)	50	%

Färbelösung

Coomassie Brillant Blue G250*	0,75	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	75	g
o-Phosphorsäure (85 % [v/v])	15	ml
Methanol	250	ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000
		ml

* Appli Chem GmbH, Darmstadt

2.10.5 Spotdetektion und –quantifizierung

Zur Detektion der Proteinspots wurden die kolloidal gefärbten 2D-Gele mittels eines Scanners (UMAX 2100, Biostep Jahnsdorf, Deutschland) dokumentiert. Die densitometrische Quantifizierung der Spots in den Gelen erfolgte mit Hilfe der Delta 2D Software (Version 3.5) (DECODON, Greifswald). Für die quantitative Analyse wurden je 2 Gele von 2 unabhängigen Experimenten herangezogen und nur Veränderungen in der Spotintensität um den Faktor 2 wurden als signifikant erachtet und dokumentiert.

2.10.6 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden in Kooperation mit dem BaCell-Projekt (SysMO 0313978A) (Universität Greifswald, Abteilung Mikrobiologie, AG Hecker) durchgeführt. Die Analyse der Proteinspots erfolgte mit einem Proteomics Analyzer 4800 (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Voigt *et al.* (2006). Die Proteinproben wurden zur Vorbereitung auf die Massenspektrometrie mittels Trypsin hydrolysiert. Die Messung von Peptidmassen erfolgte dann mittels MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionisation/time of flight*). Dabei kam es durch den Beschuss der präparierten Peptidgemische mit einem Laser zum Verdampfen der Peptide. Diese wurden anschließend durch ein elektrisches Feld beschleunigt und trafen nach einer von ihrer Größe und Ladung abhängigen Flugzeit auf einem Detektorschirm auf. Zum Vergleich wurden Proteinproben mitgeführt von denen das Molekulargewicht bekannt war. Deren Flugzeit konnte auf die gemessenen Spektren der Proben übertragen werden und anschließend in deren Molekulargewichte umgerechnet werden. Eine Suche der erhaltenen Peptidmassen gegen die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde mit Hilfe der „Mascot search engine“ (Matrix Science, London, UK) durchgeführt (Voigt *et al.*, 2006).

2.11 Bezugsquellen

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

Tabelle 2.4: Bezugsquellen

Firma	Produkte
AppliChem, Darmstadt	CHAPS, EDTA, Acrylamid (40 %, [w/v]), DMSO, Formaldehyd, Formamid, RNaseA, Lysozym, NBT, BCIP, Erythromycin, NTA, Hefeextrakt, Phenol pH 4.0, Brilliant Blue G-250, TEMED, Tris, Glukose, Biotin, PMSF
Biomers.net, Ulm	Oligonukleotide
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
Fermentas, St. Leon-Rot	Protein Molecular Weight Marker (SM0431, SM0441), GeneRuler 1kb DNA Ladder (SM0311), MassRuler (SM403), RNA High Range Ladder (SM0432), 6x Loading Dye, High Fidelity Enzyme Mix
GE Healthcare, München	DNase I, Pharmalyte, Cyanin3, Cyanin5, CyScribe GFX Purification Kit,
Invitrogen, Carlsbad, USA	SuperScript III Reverse Transcriptase, 5x First Strand Buffer, DTT
Merck, Darmstadt	Proteinase K, Isobutanol, p-Aminobenzoesäure
OXOID, Wesel	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
PeqLab, Erlangen	<i>Pwo</i> -Polymerase, 10x <i>Pwo</i> -Puffer
Qiagen, Hilden	QIAquick Gel Extraktion Kit
Roche, Mannheim	Blocking Reagenz, DIG DNA Labeling Kit, DIG labeled DNA-/RNA-Molecular Weight Marker, dNTP's, Hexamer Primer Random p(dN) ₆
Roth, Karlsruhe	Ethidiumbromid, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
Sarstedt	Einwegfilter; Porengröße 0,2 µm
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Thiamin

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum*

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit bestand darin, verschiedene Wachstumsparameter (2.8), intrazelluläre Proteinmuster (2D-PAGE) (2.10.3), sowie das Transkriptom (DNA Micro Arrays) (2.9.8) von *C. acetobutylicum* bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 5,7 und pH 4,5 zu erfassen. Durch den anschließenden Vergleich dieser Parameter sollten potentielle Schlüssel- oder Markerproteine bzw. RNA-Transkripte von Zellen der einzelnen Wachstumsphasen bzw. pH-Werte aufgedeckt werden. Um eine reproduzierbare Qualität der Proben bei unterschiedlichen pH-Werten zu gewährleisten, wurde *C. acetobutylicum* in einem Chemostaten mit einem Kulturvolumen von 1,5 l (2.7) unter Phosphatlimitierung (2.3.1) kultiviert. Unter diesen Bedingungen war gewährleistet, dass bis auf die Variation des pH-Werts, alle anderen Kulturbedingungen konstant gehalten werden konnten. Die Anwendung der kontinuierlichen Kultur war somit der Ausgangspunkt, um *C. acetobutylicum* im *steady state* oder dynamischen Verlauf bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5,7, 5,5, 5,3, 5,1, 4,9, 4,7 und 4,5) zu charakterisieren.

3.1.1 *Steady state*-Wachstum bei pH 5,7 und pH 4,5

Die Abbildung 3.1 zeigt den Verlauf der Optischen Dichte einer kontinuierlichen Kultur (2.7) beim Wechsel zwischen Säurephase (pH 5,7) und Lösungsmittelphase (pH 4,5) dargestellt (Janssen *et al.*, 2010). Nach Anschalten der Medienzufuhr (t_0) und einer Etablierungsphase der Zellen, wurde die Kultur (Säure- oder Lösungsmittelphase) nur durch den externen Parameter pH kontrolliert (Abb. 3.1). Diese sogenannte „Master“-Fermentation ließ sich in 4 verschiedene Phasen unterteilen (I-IV). Phase I spiegelte den Zeitverlauf nach Anschalten der Medienzufuhr wieder, in der die Zellen von einer anwachsenden Batch-Kultur in die kontinuierliche pH-kontrollierte Wachstumsphase bei pH 5,7 übergingen. Charakteristisch für diese Phase waren die hohe Zelldichte (bis zu $OD_{600}=10$) und in Konsequenz daraus auch die höchsten Acetat- und Butyrat-Konzentrationen die im Verlauf der Fermentation erreicht wurden. Nach etwa 3 Tagen ($t = 65-80$ h) erreichte die Kultur Phase II, die das etablierte *steady state* Wachstum in der Säurephase einer Kultur kennzeichnete. Dabei wies die Kultur eine stabile Zelldichte von $OD_{600}=5 (\pm 0,5)$ und Produktkonzentrationen von ~ 35 mM für Acetat und ~ 60 mM für Butyrat auf.

Phase II beinhaltete die erste Probennahme (*steady state* pH 5,7, „Acidogenesis“, $t = 96-120$ h) für Proteom und DNA Micro Array Analysen. Zu diesem Zeitpunkt war die Kultur schon mindestens 24 h im *steady state*-Wachstum bei pH 5,7. und gewährleistete, dass die Zellen bereits stabile *steady state*-Bedingungen erreicht hatten. Danach wurde die Übergangsphase III durch Abschalten der pH-Kontrolle eingeleitet. Durch die Säureproduktion erfolgte ein rapider Abfall des externen pH-Wertes bis die pH-Kontrolle bei pH 4,5 wieder eingeschaltet wurde. Damit war ein signifikanter Einbruch der Optischen Dichte auf $\sim 2,5$ und die Induktion der Lösungsmittelproduktion festzustellen.

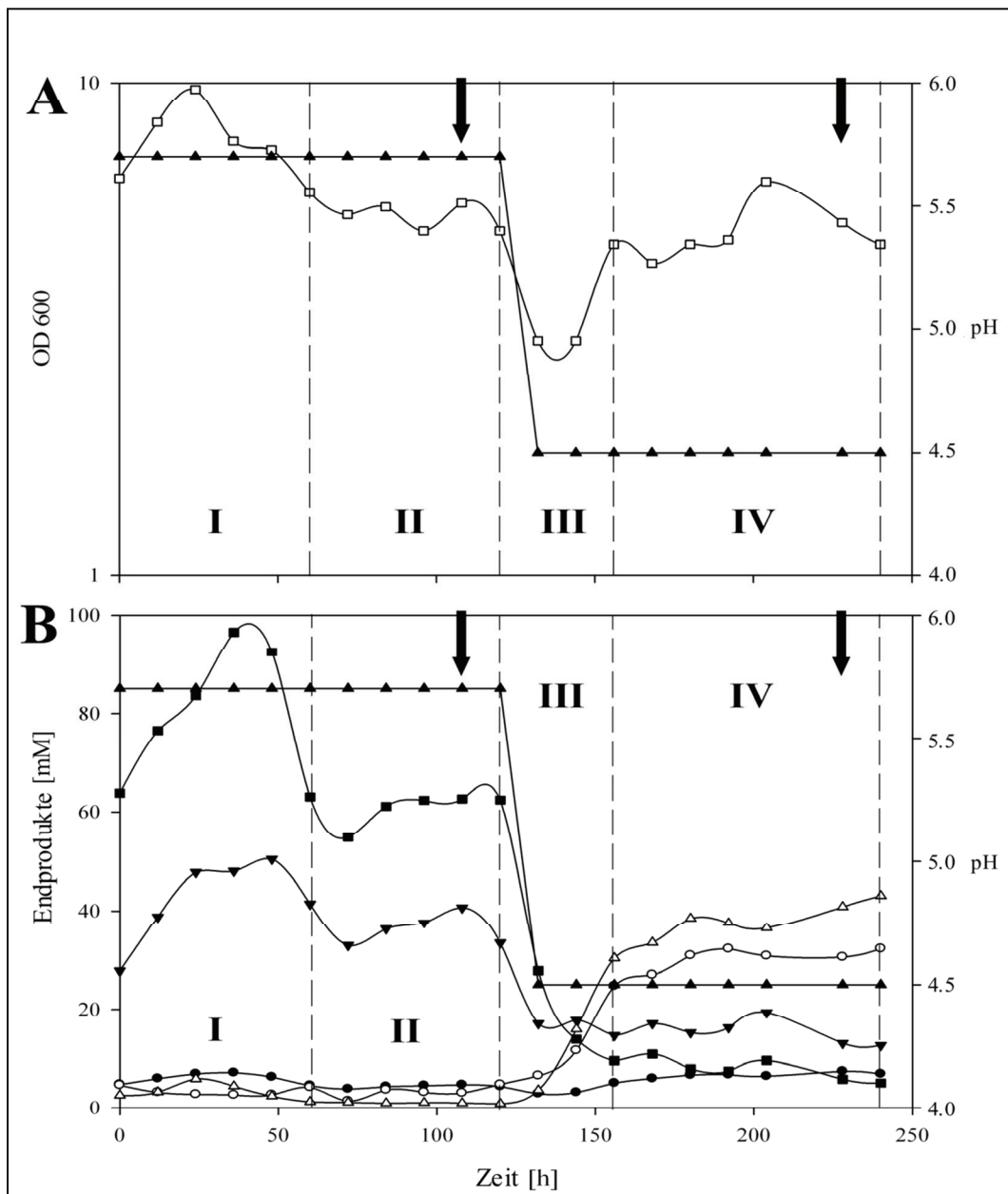


Abbildung 3.1: „Master“-Fermentation von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 4,5. (A) zeigt den extern kontrollierten pH-Verlauf (▲) und die Optische Dichte (□) über den Zeitverlauf von 240 h. (B) weist den pH-Verlauf zusammen mit den Fermentationsprodukten Butyrat (■), Acetat (▼), Butanol (Δ), Aceton (○), und Ethanol (●). Die römischen Zahlen stehen für die 4 verschiedenen Wachstumsphasen (I: Start der kontinuierlichen Kultur; II: Etablierung des *steady state*-Wachstums bei pH 5,7; III: Veränderung von pH 5,7 auf 4,5; IV: Etablierung des *steady state*-Wachstums bei pH 4,5) während einer Fermentation. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Zellernte für Proteom und DNA Micro Array Analysen.

Erneutes *steady state*-Wachstum der Kultur bei pH 4,5 wurde innerhalb von 48 h erreicht ($OD_{600}=5\pm 0,5$) und reflektierte den Beginn der Phase IV. Mindestens 3 Tage später (~10 Tage oder 240 h nach Start der kontinuierlichen Kultur) erfolgte die zweite Probennahme (*steady state* pH 4,5, „Solventogenese“) zur Untersuchung von Zellen aus der Lösungsmittelphase. In dieser eindeutig definierten Lösungsmittelphase bei pH 4,5, wiesen der Kulturüberstand ~31 mM Aceton und ~40 mM Butanol auf und die Säurebildung war zurückgegangen auf ~13 mM Acetat und ~6 mM Butyrat.

3.1.2 *Steady state*-Wachstum bei pH-Werten zwischen pH 5,7 und pH 4,5

Ausgehend von der „Master“-Fermentation (Abb. 3.1) und dem Wissen das der Organismus seinen Stoffwechsel, basierend auf Änderung des externen pH-Wertes (pH 5,7 auf pH 4,5) umstellt, erfolgte nun die systematische Erfassung von *steady state*-Zuständen zwischen pH 5,7 und pH 4,5. Damit sollte der kritische externe pH-Bereich zwischen pH 5,7 und pH 4,5 erfasst werden, bei dem die Zellkultur vom säure- zum lösungsmittelbildenden Metabolismus wechselt. Dies bedeutete, dass entsprechend der „Master“-Fermentation (2.7) mehrere kontinuierliche Kulturen etabliert wurden, welche ausgehend von pH 5,7 jeweils einen um 0,2 pH-Stufen tieferen *steady state*-Endwert aufwiesen mit den pH-Werten pH 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7, von denen wie oben Proben für Proteom und DNA Micro Array Analysen entnommen wurden.

Die erste kontinuierliche Kultur von pH 5,7 zu pH 5,5 ist in Abb. 3.2 dargestellt. Die Kultur blieb nach dem Wechsel des pH-Wertes auf 5,5 weiterhin in der Säurephase mit den dominierenden Endprodukten Butyrat (~44 mM) und Acetat (~37 mM). Es erfolgte keine Induktion der Lösungsmittelbildung über den gesamten Wachstumsverlauf. Nach Herabsetzen des pH-Werts auf 5,5 blieb die Optische Dichte allerdings im Vergleich zur Fermentation pH 5,7 zu pH 4,5 (Abb. 3.1) stabil ($OD_{600} 5 \pm 0,5$).

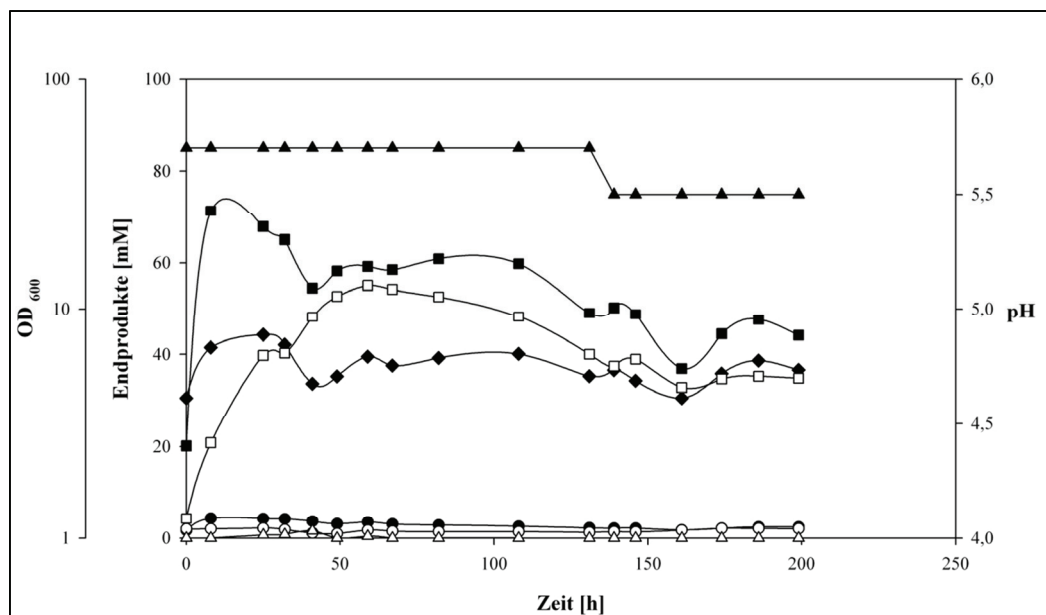


Abb. 3.2: Fermentationsprodukte und Wachstum von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 5,5. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Fermentationen. Optische Dichte (□), pH (▲), Butyrat (■), Acetat (◆), Butanol (Δ), Aceton (○), und Ethanol (●).

Die zweite *steady state*-Analyse erfolgte beim pH-Endpunkt 5,3 (Abb. 3.3). Auch hier änderte sich nach dem Wechsel des pH-Wertes das Verhalten der kontinuierlichen Kultur bzw. des Metabolismus nicht. Die Zellen befanden sich weiterhin in einer klar definierten Säurephase und produzierten ebenso deutlich die Endprodukte Butyrat (~54 mM) und Acetat (~39 mM), sowie keine signifikanten Mengen an Lösungsmitteln. Auch die Optische Dichte zeigte, wie beim „Shift“ von pH 5,7 zu pH 5,5, im

Gegensatz zur „Master“-Fermentation keinen signifikanten Einbruch und wies stabile Werte zwischen 4,7 und 5,3 auf.

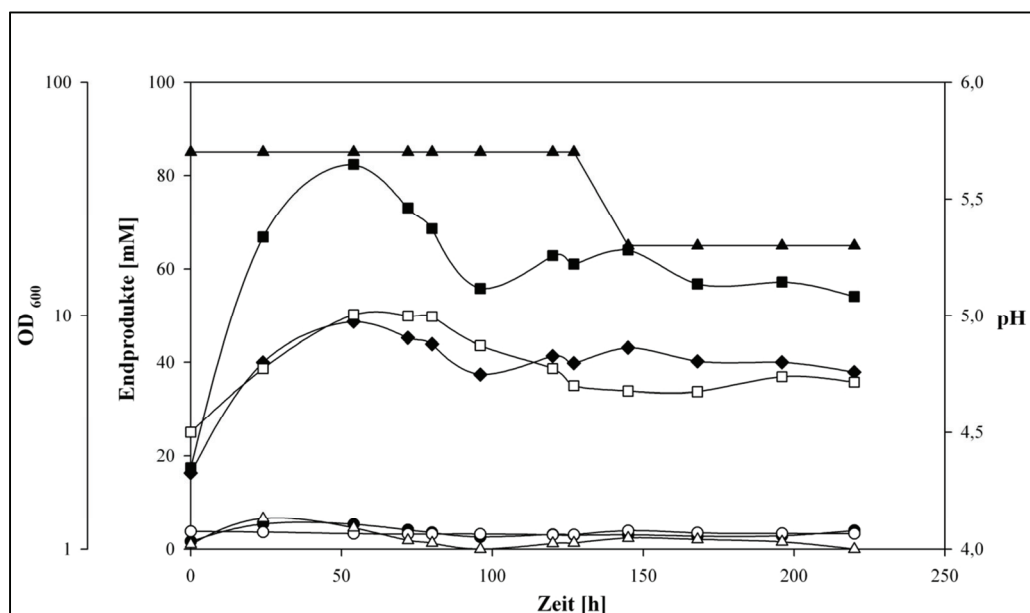


Abb. 3.3: Fermentationsprodukte und Wachstum von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 5,3. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Fermentationen. Optische Dichte (\square), pH (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge), Butanol (\triangle), Aceton (\circ), und Ethanol (\bullet).

Erst in der dritten Versuchsreihe, beim „Shift“ des pH-Wertes von 5,7 auf 5,1, änderte sich das Verhalten der Kultur. Wie in Abb. 3.4 dargestellt ist, repräsentieren die Zellen bei pH 5,1 im *steady-state* eine sogenannte „Transitionsphase“ zwischen Säure- und Lösungsmittelphase. Es war ein signifikanter Abfall von Butyrat (~12 mM) und Acetat (~18 mM) zu erkennen und ebenso signifikante Mengen der Lösungsmittel Butanol (~25 mM) und Aceton (~22 mM) im Kulturüberstand verzeichnet.

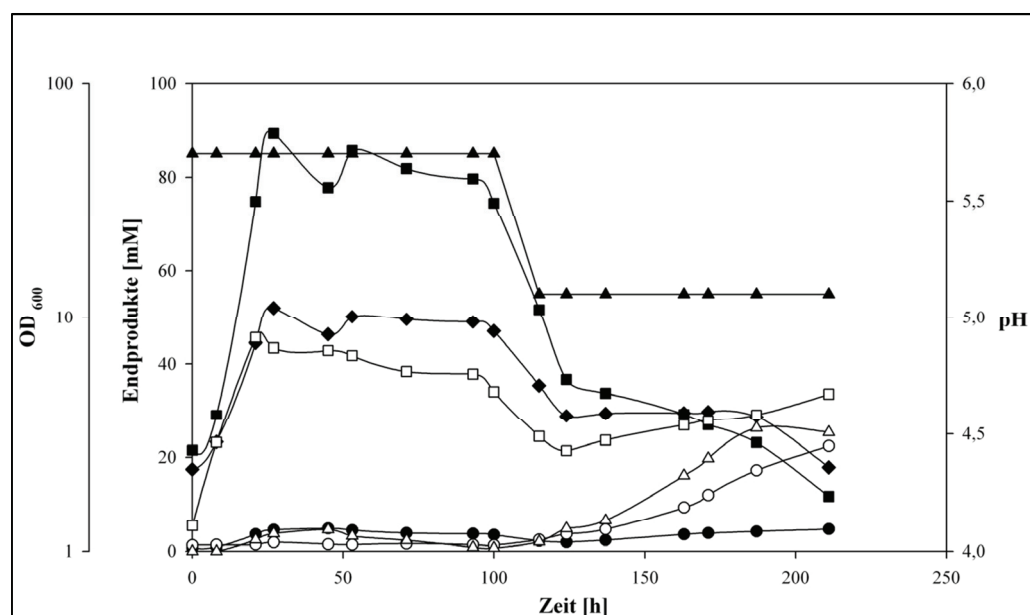


Abb. 3.4: Fermentationsprodukte und Wachstum von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 5,1. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Fermentationen. Optische Dichte (\square), pH (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge), Butanol (\triangle), Aceton (\circ), und Ethanol (\bullet).

Nichtsdestotrotz erreichten Butanol und Aceton nicht die gleichen Konzentrationen wie in einer Lösungsmittelphase bei pH 4,5 (Butanol ~40 mM, Aceton ~31 mM) (Abb. 3.1 und Tab. 3.1). Allerdings konnte nach Wechsel des pH-Wertes von 5,7 auf 5,1 ein ähnlich starker Abfall der Optischen Dichte dokumentiert ($OD_{600} \sim 2,7$) werden wie bei dem pH-Wechsel von 5,7 auf 4,5 (Abb. 3.1, Phase III). Die Zellen regenerierten sich und zeigten im *steady-state* eine Optische Dichte von ~5,0.

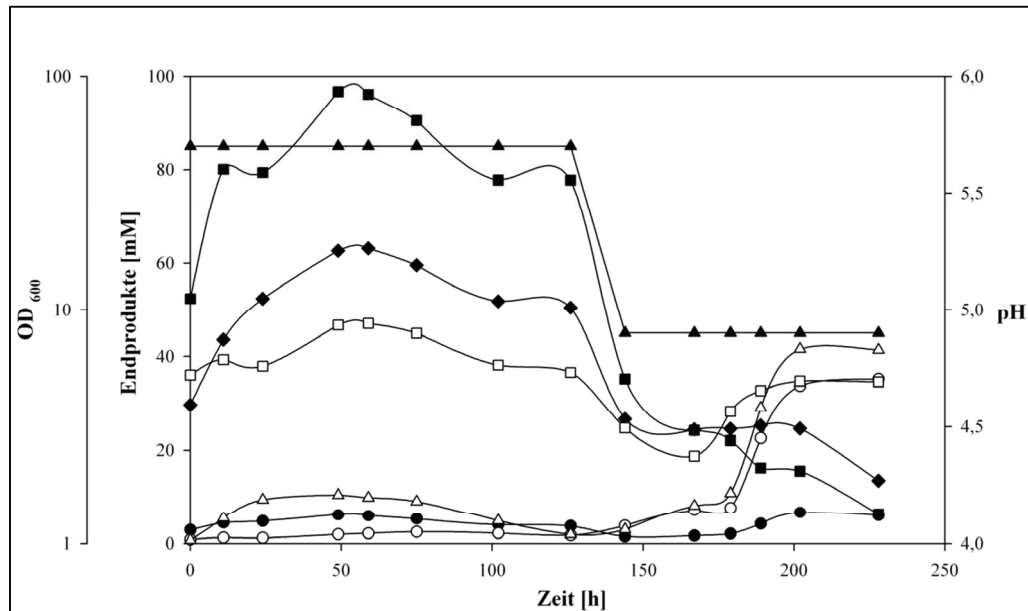


Abb. 3.5: Fermentationsprodukte und Wachstum von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 4,9. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Fermentationen. Optische Dichte (\square), pH (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge), Butanol (\triangle), Aceton (\circ), und Ethanol (\bullet).

In den Chemostat-Ansätzen mit dem pH-Endpunkt 4,9 konnte eine Lösungsmittelbildung ausgelöst werden (Abb. 3.5). Bei diesem pH-Punkt produzierte die Kultur im *steady state* überwiegend die Lösungsmittel Butanol (~41 mM) und Aceton (~35 mM). Auch ein Einbruch der Optischen Dichte auf ~2,3 konnte nach dem Absenken des pH-Wertes verzeichnet werden. Nach Regeneration der Zellen erreichte die Kultur im *steady-state* eine optische Dichte von ~4,7.

Der letzte „Shift“ einer *steady state*-Kultur von pH 5,7 auf pH 4,7 führte, wie erwartet, ebenso zu einer klar definierten Lösungsmittelphase. Nach dem „Shift“ produzierte die Kultur überwiegend die Endprodukte Butanol (~43 mM) und Aceton (~36 mM). Auch die Optische Dichte sank nach dem Wechsel des pH-Wertes rapide und signifikant ab, aber erholte sich ebenso wie bei den pH-Werten 5,1 und 4,9 bis zum Ende der Fermentation nach ca. 220 h (Abb. 3.6).

Somit ist festzuhalten, dass die pH-Punkte 5,7, 5,5 und 5,3 im *steady state*-Wachstum eindeutig die Säurephase reflektierten ohne erkennbare Induktion der Lösungsmittelbildung und überwiegend die Säuren Butyrat und Acetat produziert wurden. Ebenso konnte dokumentiert werden, dass die Optische Dichte keinen Einbruch erfuhr, nachdem der externe pH-Wert gewechselt worden ist. Bei pH-Endpunkt 5,1 repräsentiert die Kultur eine „Transitionsphase“ zwischen Säure- und Lösungsmittelbildung. Erste Lösungsmittel konnten detektiert werden und auch ein Einbruch der Optischen Dichte wurde verzeichnet. Bei den pH-Endpunkten 4,9 und 4,7 wiesen die Kulturen im

steady state-Wachstum eine klar induzierte Lösungsmittelphase auf und produzierten hauptsächlich die Fermentationsprodukte Butanol und Aceton, ähnlich zur „Master“-Fermentation (Abb. 3.1).

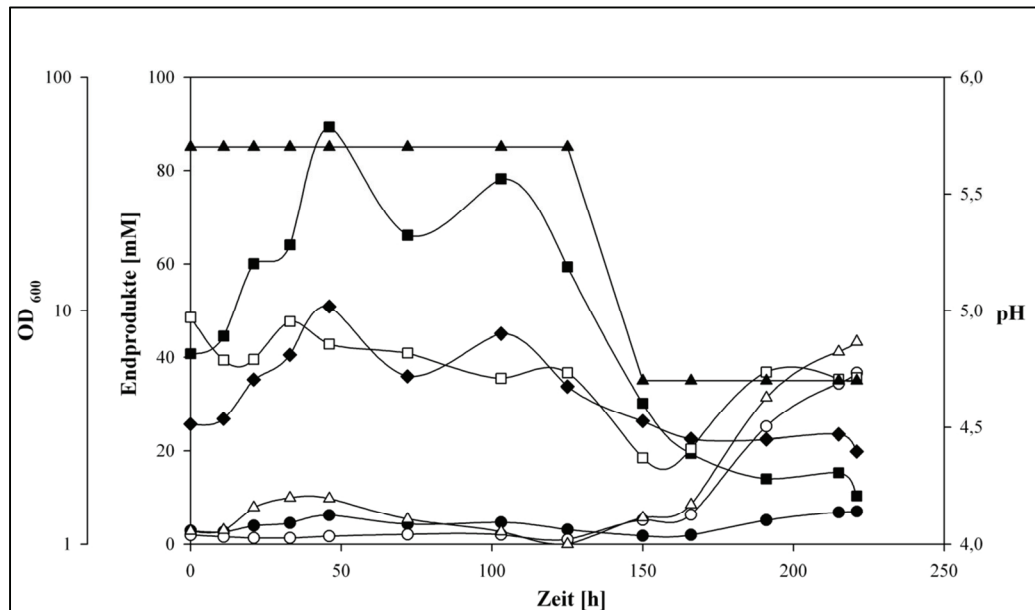


Abb. 3.6: Fermentationsprodukte und Wachstum von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 4,7. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Fermentationen. Optische Dichte (□), pH (▲), Butyrat (■), Acetat (◆), Butanol (Δ), Aceton (○), und Ethanol (●).

Ein Überblick über alle Werte (Endprodukte, Optische Dichte, Trockengewicht) der einzelnen *steady state*-Wachstumsversuche ist in der Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Überblick über alle *steady state*-Daten von *C. acetobutylicum*. Gezeigt sind Konzentrationen der Fermentationsprodukte in mM, Optische Dichte (OD₆₀₀) und Trockengewicht (TG) in mg/ml.

Produkte [mM]	pH 5,7	pH 5,5	pH 5,3	pH 5,1	pH 4,9	pH 4,7	pH 4,5
Ethanol	3,9	2,4	4,0	4,7	6,1	7,0	5,9
Acetat	42	37	38	18	14	20	13
Butyrat	68	44	54	12	7,0	10	6,2
Aceton	3,4	2,1	3,3	22	35	36	31
Butanol	0,4	0,0	0,0	25	42	43	40
OD ₆₀₀	4,9	5,0	5,2	4,7	4,9	5,2	4,8
TG	1,31	1,22	1,36	1,29	1,44	1,42	1,12

3.1.3 Dynamisches Shift Experiment von pH 5,7 zu pH 4,5

Zusätzlich zu den Analysen der *steady state*-Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten erfolgten ebenso dynamische „Shift“ Experimente. Während des Absinkens des pH-Werts beginnend bei pH 5,7 wurden alle 0,2 pH-Stufen (5,5, 5,3, 5,1, 4,9, 4,7 und 4,5) „beprob“ und wie oben analysiert (Grimmler *et al.*, 2010; Haus *et al.*, 2010). Diese Zellen reflektieren somit Momentaufnahmen während des dynamischen „Shifts“ von der Säure- zur Lösungsmittelphase. Der Verlauf eines dynamischen „Shift“-Experiments ist identisch zum Wachstum einer „Master“-Fermentation (Abb. 3.1) und im Anhang dargestellt (Abb. A1). Die Dauer des dynamischen „Shifts“, d. h. das Absinken des pH-Wertes von 5,7 bis 4,5 aufgrund der Säureproduktion der Kulturen, betrug nach Analyse dreier unabhängiger Experimente im Durchschnitt 29 h. In Tabelle 3.2 sind alle Zwischenstufen der pH-Werte im Detail dargestellt. Zu Beginn des „Shifts“ sank der pH-Wert sehr rapide ab. Die Zeitspannen zwischen den pH-Werten 5,7, 5,5, 5,3 und 5,1 waren nicht größer als bis zu 2 h. Danach wurden erheblich längere Zeitspannen bis zum Erreichen des jeweiligen nächsten pH-Werts gemessen, von 4 h für den Übergang zwischen pH 5,1 und pH 4,9 und bis zu 13 h für das Intervall zwischen pH 4,7 und pH 4,5. Weiterhin war zu erkennen, dass die Optische Dichte ab dem pH-Wert 4,7 signifikant geringer wurde. Bis zum pH 4,9 wies die Kultur eine stabile Optische Dichte von $5 \pm 0,3$ auf.

Tabelle 3.2: Vergleich der Fermentationsprodukte und Optische Dichte (OD_{600}) des dynamischen „Shifts“ zwischen pH 5,7 und 4,5 von *C. acetobutylicum*. Angegeben ist die Zeit, die vergangen ist bis der nächste pH-Wert erreicht wurde. *s.s.*, *steady state*; *dyn.*, dynamisch

Zeitspanne	1 h → 1.5 h → 2 h → 4 h → 7.5 h → 13 h → 117 h							
	pH 5,7 <i>s.s.</i>	pH 5,5	pH 5,3	pH 5,1	pH 4,9	pH 4,7	pH 4,5 <i>dyn.</i>	pH 4,5 <i>s.s.</i>
Ethanol	3,6	3,5	3,3	3,4	3,4	2,2	2,2	6,3
Acetat	41	39	39	40	39	29	24	13
Butyrat	65	66	66	60	58	40	25	8,0
Aceton	1,1	1,0	0,9	1,6	1,6	2,8	9,3	48
Butanol	1,6	1,8	1,7	1,7	1,6	2,2	10	52
OD_{600}	5,1	5,3	4,7	5,0	5,0	3,6	1,8	4,6

Die Kultur befand sich bis zum pH-Wert von 4,9 in einer typischen Säurephase. Die Hauptprodukte, bis zu diesem Zeitpunkt der dynamischen Fermentation, waren die Säuren Acetat (~39 mM) und Butyrat (~58 mM). Erst mit dem Absinken des pH-Werts auf 4,7 zeigte sich eine signifikante Verringerung der Säurebildung (Acetat ~29 mM und Butyrat ~40 mM) unter lediglich geringfügiger Zunahme der Lösungsmittel. Diese konnten erst mit Erreichen des pH-Werts 4,5 in größeren Mengen

nachgewiesen werden (Aceton: ~9 mM, Butanol: ~10 mM), einhergehend mit dem weiteren Abfall der Säuremengen (Acetat: ~24 mM, Butyrat: ~25 mM).

3.2 Proteomanalysen von *C. acetobutylicum*

Eine Hauptaufgabe dieser Arbeit war es Proteomkarten für das *steady state*-Wachstum der Säure- (pH 5,7) und Lösungsmittelphase (pH 4,5) zu erstellen und anschließend miteinander zu vergleichen. Dadurch sollten potentielle Schlüsselproteine beider Wachstumsphasen aufgedeckt werden. Zur Auftrennung intrazellulärer Proteine mit einem *pI* zwischen 4 und 7 mittels 2D-PAGE, wurden die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen kontinuierlichen Kulturen herangezogen. Es wurden kolloidal Coomassie gefärbte 2D-Gele von je 300 µg cytosolischem Protein angefertigt (2.10.3), eingescannt und mittels Delta 2D-Software 3.5 (DECODON, Greifswald) analysiert (2.10.5). Die massenspektrometrische Analyse zur Identifizierung von Proteinspots erfolgte wie unter 2.10.6 beschrieben.

3.2.1 *Steady state*-Proteome bei pH 5,7 und pH 4,5

Repräsentative, kolloidal Coomassie gefärbte und analysierte 2D-Gele von Proteinpräparationen aus der Säure- und Lösungsmittelphase sind in den Abbildungen 3.7 und 3.8 dargestellt. Gegenüber dem jeweils anderen pH-Wert hervortretende Proteinspots sind darin gekennzeichnet und in den Tabellen 3.3 und 3.4 aufgelistet. Ergänzende detaillierte Proteomkarten sind im Anhang in der Abbildung A2 zusammen mit Tabelle A2 bzw. Abbildung A3 im Zusammenhang mit Tabelle A3 gezeigt. In Proben aus der Säurephase (pH 5,7) konnten 357 Spots detektiert werden, die 178 verschiedene Proteine repräsentierten. In der Lösungsmittelphase (pH 4,5) ließen sich 205 verschiedene Proteine in 415 Spots finden. Insgesamt wurden 21 % aller cytosolischen Proteine von *C. acetobutylicum* mit einem kalkulierten isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 7 und einem Molekulargewicht zwischen 10 und 200 kDa (Hiller *et al.*, 2006) visualisiert.

Vergleichsanalysen zur Identifizierung von Schlüssel- oder Indikatorproteinen für die beiden Wachstumszustände erfolgten auf der Basis der Spotmengen, die in den einzelnen 2D-Gelen analysiert und quantifiziert (2.10.5) wurden (Delta 2D-Software 3.5; DECODON, Greifswald). Als Grundlage dienten je 2 Gele von 2 unabhängigen Experimenten. Lediglich Veränderungen in der Spotintensität um mindestens den Faktor 2 wurden als signifikant erachtet (Fiedler, 2006; Schwarz, 2007).

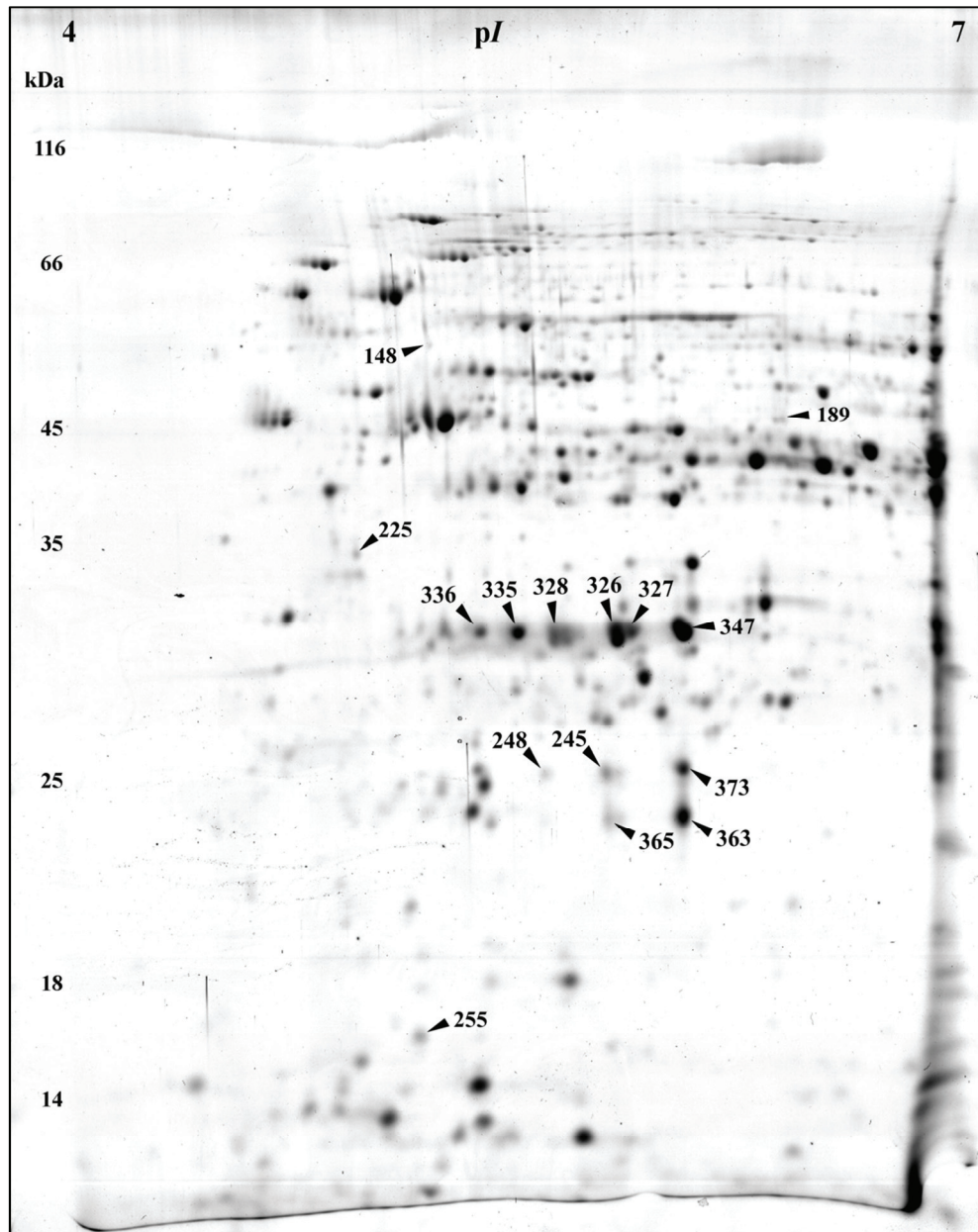


Abbildung 3.7: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine aus Zellen der Säurephase (pH 5,7). Die Nummern markieren Proteinspots mit signifikant höherer Proteinmenge im Vergleich zur Lösungsmittelphase (pH 4,5) (Erläuterungen Siehe Text und Tab. 3.3).

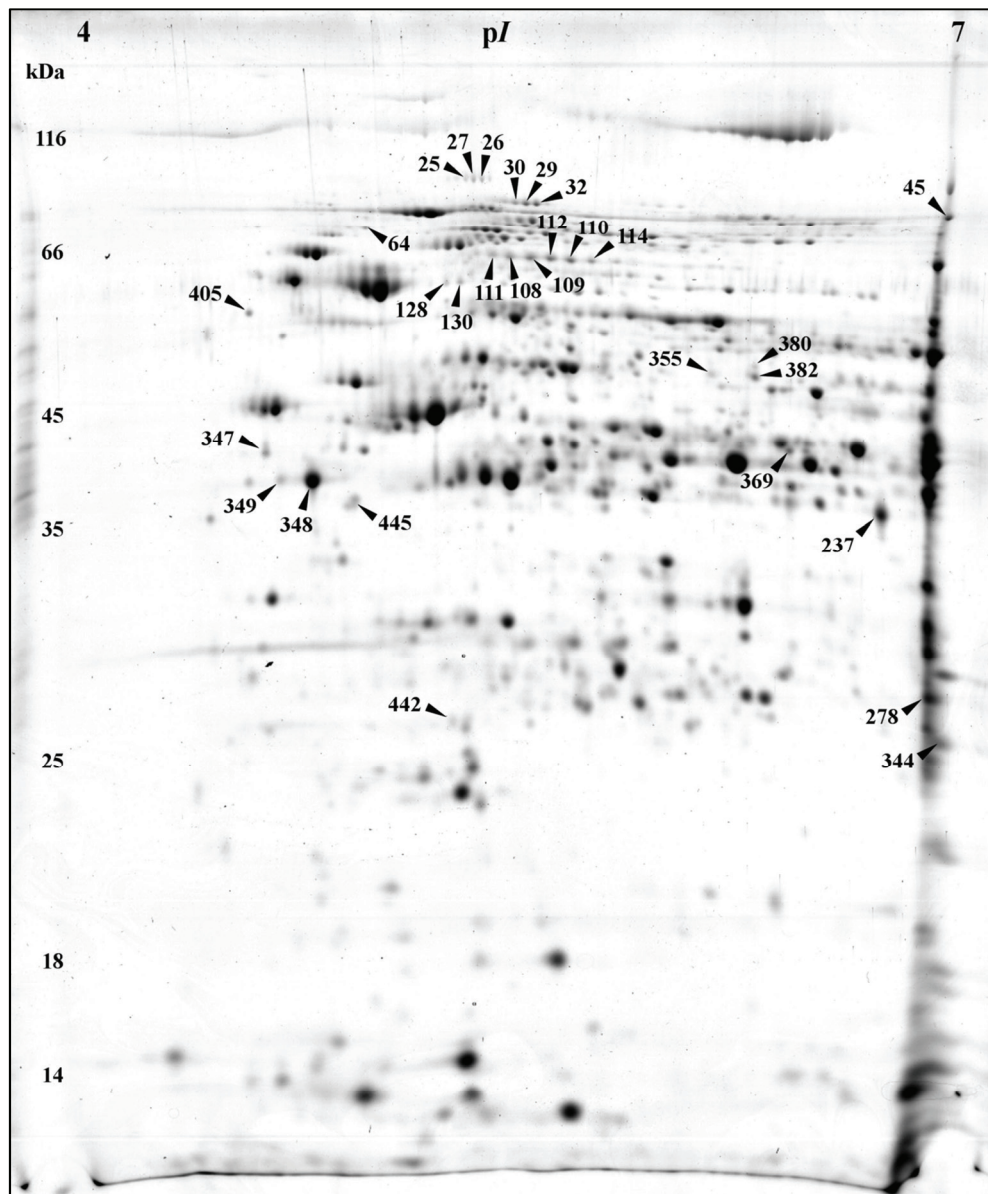


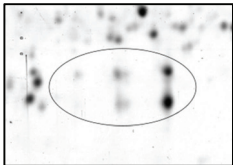
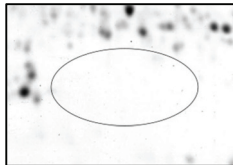
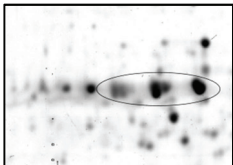
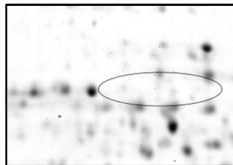
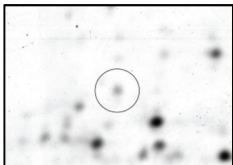
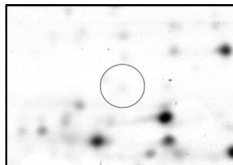
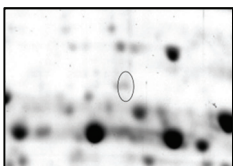
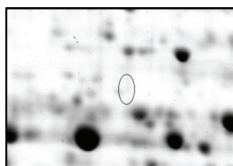
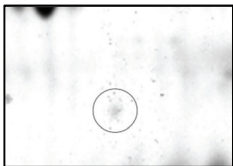
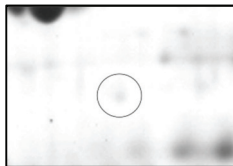
Abbildung 3.8: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Zellen der Lösungsmittelphase (pH 4,5). Die Nummern markieren Proteinspots mit signifikant höherer Proteinmenge im Vergleich zur Säurephase (pH 5,7) (Erläuterungen Siehe Text und Tab. 3.4).

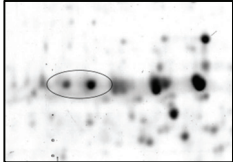
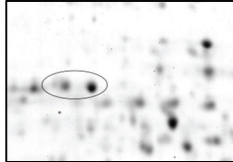
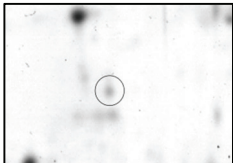
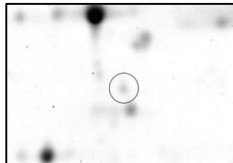
3.2.2 Proteine mit signifikant erhöhter Spotintensität bei pH 5,7

In der Säurephase wiesen insgesamt 15 Proteinspots eine signifikant höhere Spotintensität im Vergleich zur Lösungsmittelphase auf (Abb. 3.7 und Tab. 3.3). Die stärkste Induktion zeigten die Proteine CAP0037 und CAP0036. Die Gene beider Proteine sind auf dem Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997) kodiert und bisher als „Uncharacterized gene products with unknown function“ annotiert (Nölling *et al.*, 2001). Beide Proteine wurden in multiplen Spots detektiert, mit bis zu 5 Spots für CAP0037 und 4 Spots für CAP0036 (Abb. 3.7 und Tab. 3.3). Keines der beiden Proteine konnte in 2D-Gelen der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 gefunden werden. Die horizontale Spotverteilung lässt mindestens 3 unterschiedliche isoelektrische Punkte vermuten, hervorgerufen durch variierende Proteinladungen. Darüber hinaus könnten dem Protein CAP0037 auch zwei unterschiedliche apparente molekulare Massen von ~22 kDa und ~25 kDa zugeordnet werden.

Ein weiteres Protein mit signifikant erhöhter Abundanz und multiplen Spots in der Säurephase (~2,0-fach) bei pH 5,7 wurde als EtfB („Electron transfer flavoprotein beta-subunit“, CAC2710) identifiziert. Zwei Proteinspots mit ~4,3- und ~4,0-fach erhöhter Proteinmenge bei pH 5,7 enthielten mehr als ein Protein. Beide Spots enthielten mindestens drei verschiedene Polypeptide. Im ersten Spot wurden (i) ein „18 kDa heat shock protein“ (CAC3714), (ii) ein „Putative uncharacterized protein“ (CAC0056) und (iii) ein „Transcriptional regulator of the Lrp family (AsnC, CAC0977) identifiziert. Ein Grund für die gleiche Lage der drei Proteine in den 2D-Gelen könnte die identische Größe (~17,5-18 kDa) und der sehr ähnliche isoelektrische Punkt (CAC0056 $pI = 4,95$, AsnC $pI = 5,16$, Hsp18 $pI = 5,27$) sein. Der zweite Spot enthielt (i) ein „Protein identified as related to HTH domain of SpoOJ/ParA/ParB/RepB family, involved in chromosome partitioning“ (CAC0016), (ii) ein „Putative S-layer protein“ (CAC3558) und (iii) ein „ATP Phosphoribosyltransferase regulatory subunit“ (HisZ, CAC0935) auf. Alle drei genannten Proteine haben ähnliche molekulare Massen (~46 bis 48 kDa), aber auffällig unterschiedliche pI 's von 5,78 (CAC0016), 6,32 (CAC0935) und 8,26 (CAC3558). Das identifizierte Protein CAC2584 (~2,5-fach) konnte ebenso in der Arbeit von Fiedler (2006) als phosphatinduziert bei pH 4,5 dokumentiert werden.

Tabelle 3.3: Proteine mit erhöhter ($\geq 2,0$) Spotintensität in der Säurephase bei pH 5,7.

ORF# ^a	Proteinfunktion ^b	Spot # ^c	pH 5,7	pH 4,5	Ratio ^{d, e}
CA_P0037	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B. subtilis</i>	248, 245, 373, 365, 363			∞
CA_P0036	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B. subtilis</i>	328, 326, 327, 347			∞
CAC3714 CAC0056 CAC0977 (<i>asnC</i>)	(i) 18 kDa heat shock protein (ii) Uncharacterized protein (iii) Transcriptional regulator	255			~ 4,3
CAC0016 CAC3558 CAC0935 (<i>hisZ</i>)	(i) SpoOJ protein (ii) Probable S-layer protein (iii) ATP phosphoribosyltransferase	189			~ 4,0
CAC2584	Protein containing ChW-repeats	148			~ 2,5

CAC2710 (<i>etfB</i>)	Electron transfer flavoprotein beta- subunit	336, 335			~ 2,1
CAC3032	Galactose mutarotase- like protein	225			~2,0

^a: Proteinspots, die mehr als ein Polypeptid aufwiesen, sind in der Reihenfolge ihrer Identifikation aufgeführt.

^b: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^c: Dazugehörige Spotnummer in Abbildung A2 (Siehe Anhang).

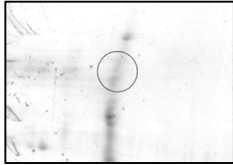
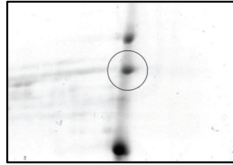
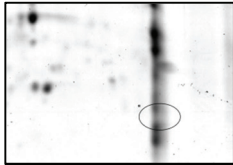
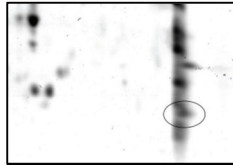
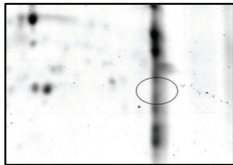
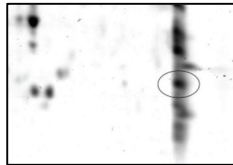
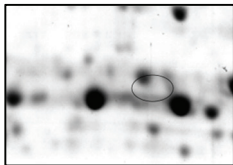
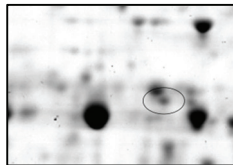
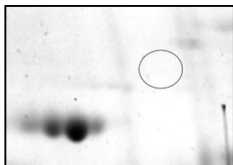
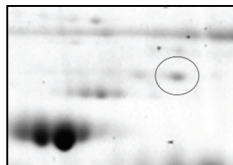
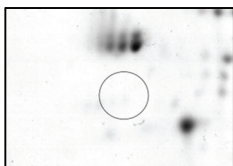
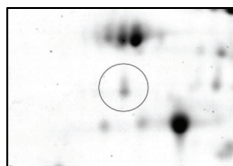
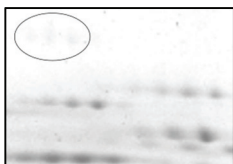
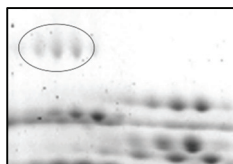
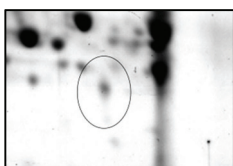
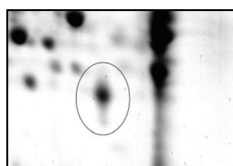
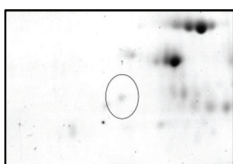
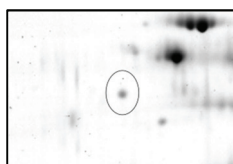
^d: Bei Identifikation von mehreren Spots für ein Protein, wurde der Mittelwert dargestellt.

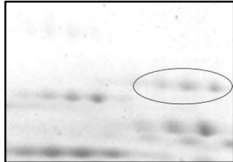
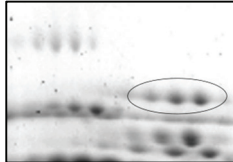
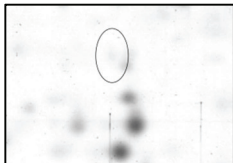
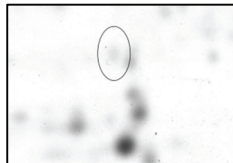
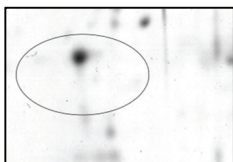
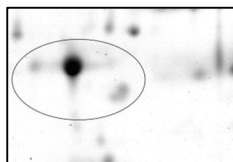
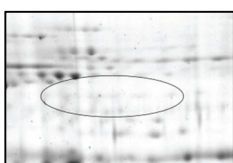
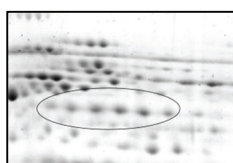
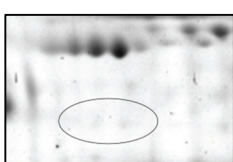
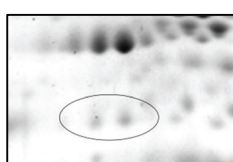
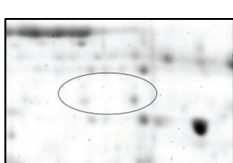
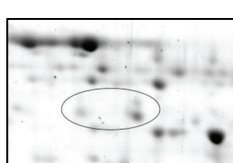
^e: Das Unendlichkeitszeichen (∞) bedeutet, dass ein Protein in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 nicht detektiert wurde.

3.2.3 Proteine mit signifikant erhöhter Spotintensität bei pH 4,5

In der Lösungsmittelphase konnten insgesamt 29 verschiedene Proteinspots mit erhöhter Proteinabundanz im Vergleich zur Säurephase bei pH 5,7 detektiert werden. Alle Spots sind in Abbildung 3.8 und Tabelle 3.4 aufgeführt. Die ersten drei Proteine in Tabelle 3.4 repräsentieren die Genprodukte des *sol* Operon (CAP0162-CAP0164), die „Aldehyde-alcohol dehydrogenase 1“ (AdhE1) und die beiden „Subunits of the CoA-transferase“ (CtfA, CtfB). Alle drei Proteine waren in der Säurephase nicht nachweisbar. Das Auffinden dieser Proteine bei pH 4,5 kam nicht unerwartet, da diese Enzyme in die Produktion von Butanol involviert sind. Ein weiteres Protein mit einer Funktion in der Lösungsmittelbildung, die „NADH-dependent butanol dehydrogenase B“ (CAC3298, BdhB), wurde ebenfalls ausschließlich bei pH 4,5 gefunden. Die Wichtigkeit und Funktion der anderen signifikant erhöhten Proteine für die Lösungsmittelphase bei pH 4,5 bleibt unklar (Tab. 3.4). Es handelt sich hierbei zum einen um die „Carbon-monoxide dehydrogenase“ (CAC0116) mit ~2.4-fach erhöhter Spotintensität und das „Flagellin“ FlaC (bzw. „Hook associated flagellin protein Hag“; CAC2203), welche jeweils in multiplen Spots auftraten. Das FlaC-Protein wies in den 2D-Gelen im Vergleich zur kalkulierten Masse von ~29,5 kDa sichtbar höhere molekulare Massen von ~42 kDa auf. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf erhebliche Glykosylierungen zurückführbar, wie sie von Lyristis *et al.* (2000) beschrieben wurden. Weitere Proteine mit erhöhter Abundanz bei pH 4,5 sind interessanterweise mutmaßlich extrazelluläre Proteine wie z. B., eine „Extracellular neutral metalloprotease“ (CAC2517) oder eine „Processive endoglucanase“ (CAC0911).

Tabelle 3.4: Proteine mit erhöhter ($\geq 2,0$) Spotintensität in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5.

ORF# ^a	Proteinfunktion ^b	Spot # ^c	pH 5,7	pH 4,5	Ratio ^d e
CA_P0162 (<i>adhe1</i>)	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	45			∞
CA_P0163 (<i>ctfA</i>)	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit A	344			∞
CA_P0164 (<i>ctfB</i>)	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B	278			∞
CAC3298 (<i>bdhB</i>)	NADH-dependent butanol dehydrogenase B	369			∞
CAC0911	Processive endoglucanase	64			∞
CAC2517 (<i>mrpE</i>)	Extracellular neutral metalloprotease	347			∞
CAC3006	Zn-dependent peptidase, insulinase family	25, 27, 26			$\sim 3,3$
CAC0147	ABC transporter, ATP- binding protein	237			$\sim 2,8$
CAC3086 CAC3085	(i) Protein cont. cell adhesion domain (ii) TPR-repeat- containing protein	405			$\sim 2,6$

CAC2846 (<i>secA</i>)	Protein translocase subunit SecA	30, 29, 32			~2,5
CAC3220	Response regulator	442			~2,3
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin	349, 348, 445			~2,2
CAC0116	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain	111, 108, 109, 112, 110, 114			~2,1
CAC3087	Phosphoenolpyruvate- protein kinase (PTS system enzyme I)	128, 130			~2,1
CAC0021 (<i>serS1</i>)	Seryl-tRNA synthetase	355, 380, 382			~2,0

^{a, b, d}: Siehe Legende Tabelle 3.3.

^c: Dazugehörige Spotnummer in Abbildung A3 (Siehe Anhang).

^e: Das Unendlichkeitszeichen (∞) bedeutet, dass ein Protein in der Säurephase bei pH 5,7 nicht detektiert wurde.

3.2.4 Ausgewählte Proteine bei pH 5,7 und pH 4,5

Zusätzlich zu den signifikant stärker auftretenden Proteinen, wurden noch ausgewählte Proteine des Hauptstoffwechselweges dargestellt. Da es beim Wechsel des pH-Wertes auch zum signifikanten Wechsel des Stoffwechsels kommt, Säurephase zur Lösungsmittelphase, lag die Vermutung nahe, dass Proteine des Hauptstoffwechselweges eine Veränderung im Auftreten zeigen würden. Insgesamt 11 Proteine mit einer Funktion für die Säurephase konnten identifiziert werden und sind im Anhang (Tab. A4) dargestellt. Interessanterweise zeigte lediglich EtfB eine signifikante Steigerung der Spotintensität (~2,0-fach) in der Säurephase (3.2.2.1). Weitere Proteine des Hauptstoffwechselweges sind zwar sehr gut in den 2D-Gelen nachweisbar, unterschreiten jedoch in ihren Spotintensitätssteigerungsraten den Grenzwert von 2-fach deutlich (~0,9-1,3-fach). Auffällig waren sogar geringere Spotmengen im Falle der „Phosphotransacetylase“ (Pta) (CAC1742) (~0,6-fach) und der „Acetate kinase“ (Ack) (CAC1743)

(~0,9-fach) bei pH 5,7, welchen essentielle Funktionen auf dem Weg zur Bildung von Acetat zugesprochen werden (Boynton *et al.*, 1996). Darüber hinaus zeigten eine Reihe von Proteinen multiple Spots in der 2D-Gel Analyse (z. B. Hbd, EtfA, EtfB, Bcd und Crt).

Für die Lösungsmittelphase bedeutende Proteine sind ebenfalls in Tabelle A4 (Siehe Anhang) aufgelistet. Insgesamt 5 entscheidende Enzyme konnten detektiert werden, davon wiesen die Proteine des *sol* Operon (Adhe1, CtfA und CtfB) und das BdhB-Protein signifikant erhöhte Proteinmengen auf (3.2.3). Interessanterweise konnte auch die „Acetoacetate decarboxylase“ (Adc), die den letzten Schritt der Acetonproduktion katalysiert (Andersch *et al.*, 1983; Petersen *et al.*, 1990), ebenfalls zwar in gesteigerter Menge bei pH 4,5 (~1,3-fach), allerdings nicht als signifikant erhöht detektiert werden, obwohl gerade dieses Enzym in statischen Kulturen als hervorgehoben exprimiert beschrieben wurde (Sullivan und Bennett, 2006).

3.2.5 *Steady state*-Proteome der pH-Stufen 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7

Zur systematischen Katalogisierung der Veränderungen auf Proteomebene beim Wachstum im Chemostaten wurden auch Zellen der pH-Stufen 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7 analysiert. Dabei dienten die beschriebenen Chemostatkulturen bei den oben genannten pH-Werten (3.1.2) als Auswertungsgrundlage. Die Proteome bei den jeweiligen pH-Werten wurden mit dem Referenzproteom der „Master“-Fermentation von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 (Säurephase) verglichen. Repräsentative 2D Gele der pH-Stufen von 5,5 bis 4,7 sind im Anhang in den Abb. A4-A8 dokumentiert. Die Ergebnisse der einzelnen Vergleiche sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Wie oben angeführt (3.1.2) charakterisieren Zellen in phosphatlimitierenden kontinuierlichen Kulturen bei pH 5,5 und 5,3 basierend auf den Fermentationsprodukten eindeutig eine typische Säurephase. Dies spiegelte sich auch auf der Ebene der Proteome wider und nur wenige signifikante Änderungen in den Proteinmengen konnten detektiert werden. Bei den pH-Stufen 5,5 und 5,3 wurden jeweils die gleichen drei Proteinspots im Vergleich zu pH 5,7 signifikant vermindert dokumentiert. Es handelte sich hierbei um „Flagellin“ (CAC2203, FlaC) (~0,2-fach), ein „Lipase-esterase related protein“ (CAC0816) (~0,4-fach) und eine „Aspartate aminotransferase“ (CAC2832) (~0,5-fach). Das generelle Stressprotein „18 kDa heat shock protein“ (CAC3714; Hsp18) (Sauer und Dürre, 1993) war sowohl bei allen untersuchten pH-Stufen im Vergleich zu pH 5,7 leicht erhöht.

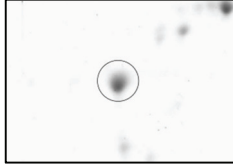

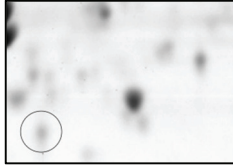
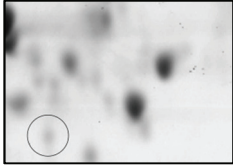
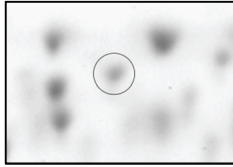
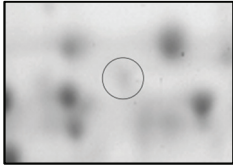
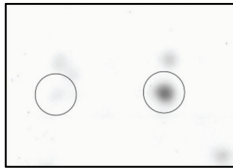
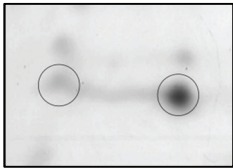
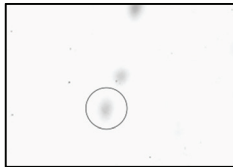
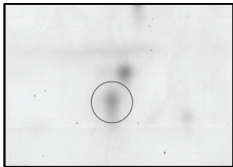
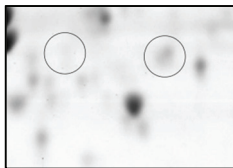
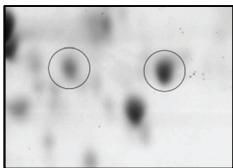

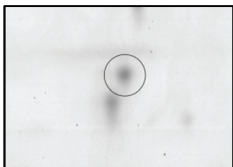
Bei pH-Stufe 5,5 waren zudem drei weitere Proteine im Vergleich zu pH 5,7 induziert, darunter die „Acetoacetate decarboxylase“ (CAP0165; Adc) oder das Stressprotein GrpE (CAC1281). Die Adc wurde zusätzlich in einem zweiten Spot (Schaffer *et al.*, 2002) detektiert (~2,9-fach). Obwohl die Adc direkt an der Produktion von Aceton beteiligt ist (Andersch *et al.* 1983; Petersen *et al.*, 1990), konnten bei pH 5,5 keine signifikanten Mengen an Aceton gemessen (~2 mM) (Tab. 3.1) werden. Überraschenderweise war bei keinem anderen pH-Wert eine größere Menge Adc im 2D Gel nachweisbar, als bei der Kultivierung von *C. acetobutylicum* bei pH 5,5.

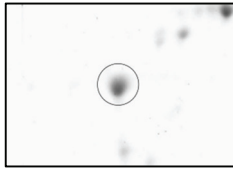
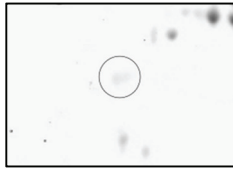
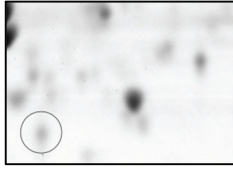
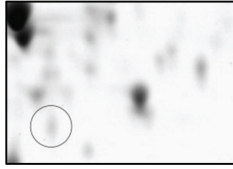
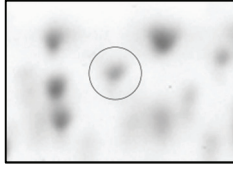
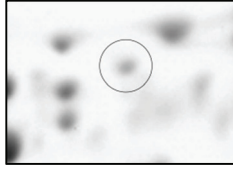
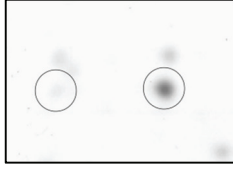
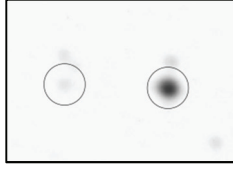
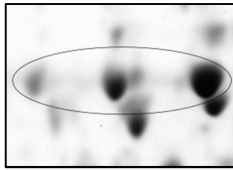
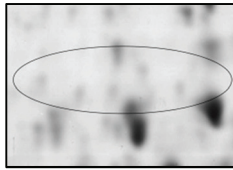
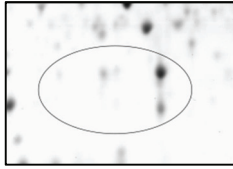
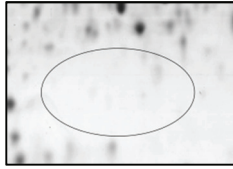
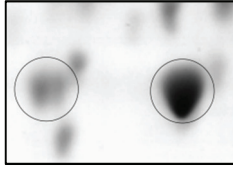
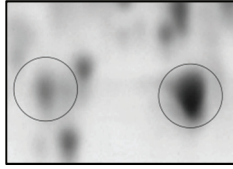
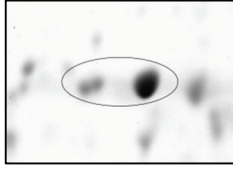
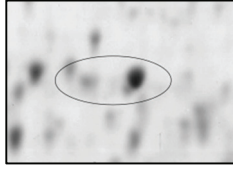

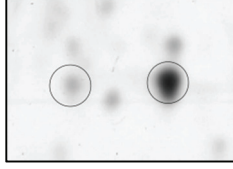
Mit besonderer Spannung wurden die Proteomanalysen der *steady state*-Zellen beim Wachstum bei pH 5,1 erwartet, da sich bei diesem pH die Zellen quasi in einer metabolischen Zwischenstufe auf dem

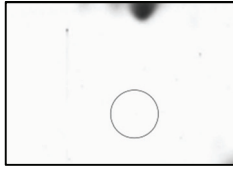
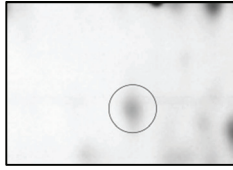
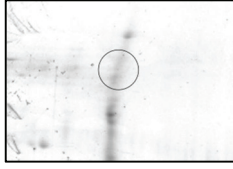
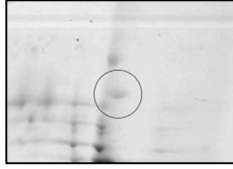
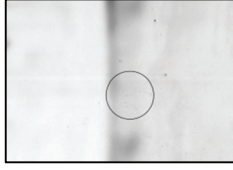
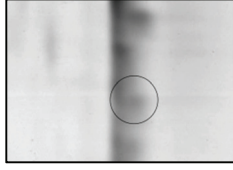
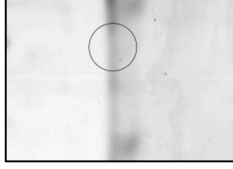
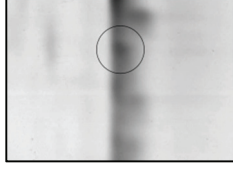
Weg zur maximalen Butanolsynthese befanden. Insgesamt 9 Proteine mit veränderter Spotintensität wurden identifiziert. Die beiden Indikatorproteine der Säurephase (pH 5,7) CAP0037 und CAP0036 (Tab. 3.3) waren in den Proteinextrakten aus der Kultivierung bei pH 5,1 nicht mehr detektierbar. Auch das in der Säurephase (pH 5,7) induzierte Protein „Electron transfer flavoprotein beta-subunit“ (CAC2710; EtfB) war bei pH 5,1 in den 2D Gelen schwächer vertreten (~0,4-fach), sowie das Protein „Electron transfer flavoprotein alpha-subunit“ (Cac2709; EtfA) (~0,4-fach). Im Gegenzug wurden auch Indikatorproteine der Lösungsmittelphase (pH 4,5) bereits bei pH 5,1 stärker exprimiert als bei pH 5,7. Dazu gehören die Proteine des *sol* Operon, wie die „Aldehyde-alcohol dehydrogenase“ (CAP0162; AdhE1), die „Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit A“ (CAP0163; CtfA) und die „Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B“ (CAP0164; CtfB). Als weiteres Indikatorprotein der Lösungsmittelphase konnte die „Extracellular neutral metalloprotease“ (CAC2517) unter pH 5,1 nachgewiesen werden. Das Interessante für Zellen der pH-Stufe 5,1 war somit, dass alle Proteine für die Lösungsmittelbildung, wie bei pH 4,5, detektiert worden sind, aber keine maximale Produktion der Lösungsmittel erreicht wurde.

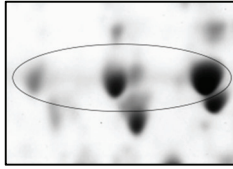
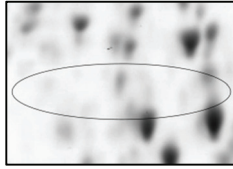
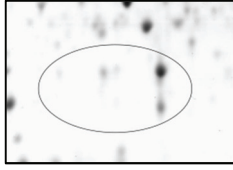
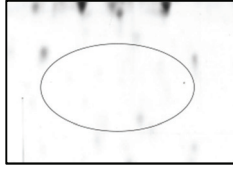
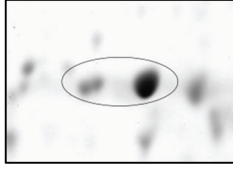
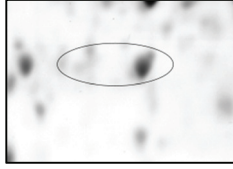
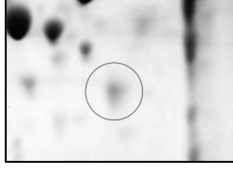
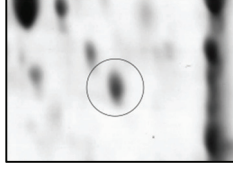

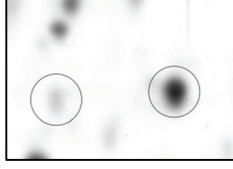
Erwartungsgemäß wurden die Proteine des *sol* Operon und von CAC2517 auch bei weiterer Absenkung des pH-Wertes auf 4,9 bzw. 4,7 ebenfalls detektiert. Interessant war das Verhalten des Proteins FlaC. Während die Menge des in den Gelen detektierten FlaC bei den pH-Werten 5,5 und 5,3 signifikant geringer war als bei pH 5,7, konnte bei pH 5,1 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei pH 4,9 und pH 4,7 wurde das Protein dann signifikant induziert, wie es auch für die Referenzbedingungen der Lösungsmittelphase (pH 4,5) gezeigt werden konnte (Tab. 3.4).

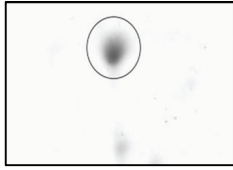
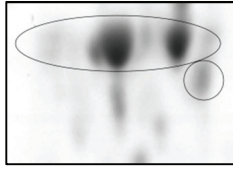

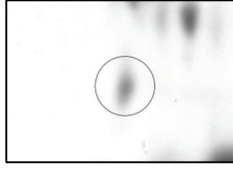
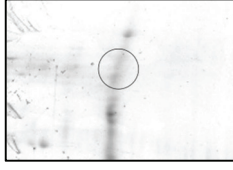
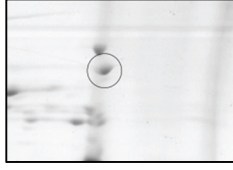
Tabelle 3.5: Proteomvergleich einzelner pH-Stufen im Vergleich zum Referenzproteom pH 5,7 (Säurephase). Dargestellt sind Proteine mit signifikant erhöhter ($\geq 2,0$) oder verminderter ($\leq 0,5$) Spotintensität bei den untersuchten *steady state*-pH-Werten (5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7).

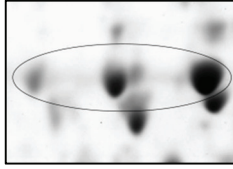
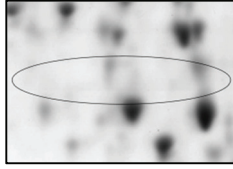
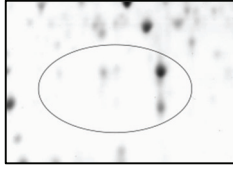
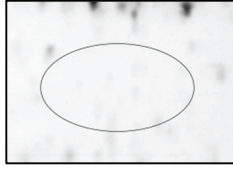
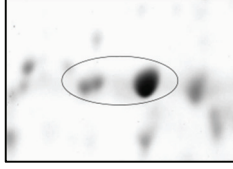
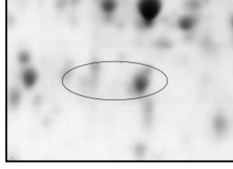

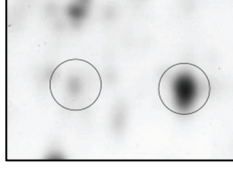
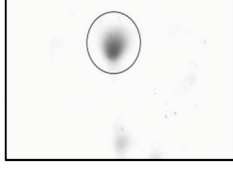
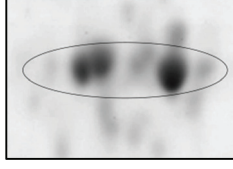

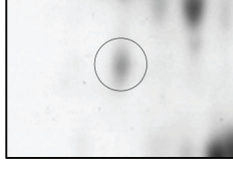
ORF#	Proteinfunktion ^a	Proteinspots		Ratio ^{b,c}
		<u>pH 5,7</u>	<u>pH 5,5</u>	
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin			~0,2
CAC0816	Lipase-esterase related protein			~0,4
CAC2832	Aspartate aminotransferase			~0,5
CAC3714 (<i>hsp18</i>)	18 kDa heat shock protein			~2,7
CAC1281 (<i>grpE</i>)	Protein GrpE			~2,7
CA_P0165 (<i>adc</i>)	Acetoacetate decarboxylase			~2,9
CAC2118	Cell division protein DivIVA			~3,2

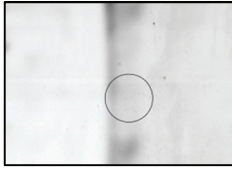
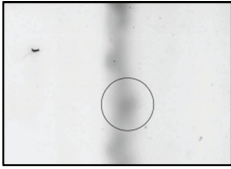
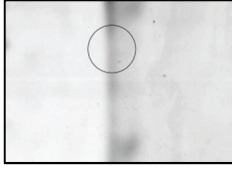
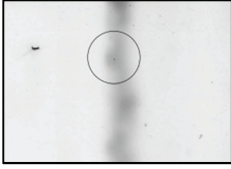
Fortsetzung		<u>pH 5,7</u>	<u>pH 5,3</u>	
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin			~0,2
CAC0816	Lipase-esterase related protein			~0,4
CAC2832	Aspartate aminotransferase			~0,5
CAC3714 (<i>hsp18</i>)	18 kDa heat shock protein			~2,1
		<u>pH 5,7</u>	<u>pH 5,1</u>	
CA_P0036	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i>			∞
CA_P0037	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i>			∞
CAC2709 (<i>etfA</i>)	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit			~0,4
CAC2710 (<i>etfB</i>)	Electron transfer flavoprotein beta-subunit			~0,4
CAC3714 (<i>hsp18</i>)	18 kDa heat shock protein			~2,6

	Fortsetzung	<u>pH 5,7</u>	<u>pH 5,1</u>	
CAC2517 (<i>nrpE</i>)	Extracellular neutral metalloprotease			∞
CA_P0162 (<i>adhe1</i>)	Aldehyde-alcohol dehydrogenase			∞
CA_P0163 (<i>ctfA</i>)	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit A			∞
CA_P0164 (<i>ctfB</i>)	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B			∞

		<u>pH 5,7</u>	<u>pH 4,9</u>	
CA_P0036	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i>			∞
CA_P0037	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i>			∞
CAC2710 (<i>etfB</i>)	Electron transfer flavoprotein beta-subunit			~0,4
CAC0147	ABC transporter, ATP-binding protein			~2,3
CAC3714 (<i>hsp18</i>)	18 kDa heat shock protein			~2,5

	Fortsetzung	pH 5,7	pH 4,9	
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin			~3,4
CAC2517 (<i>nrpE</i>)	Extracellular neutral metalloprotease			∞
CA_P0162 (<i>adhe1</i>)	Aldehyde-alcohol dehydrogenase			∞

		pH 5,7	pH 4,7	
CA_P0036	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i>			∞
CA_P0037	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i>			∞
CAC2710 (<i>etfB</i>)	Electron transfer flavoprotein beta-subunit			~0,3
CAC3714 (<i>hsp18</i>)	18 kDa heat shock protein			~2,0
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin			~2,1
CAC2517 (<i>nrpE</i>)	Extracellular neutral metalloprotease			∞

	Fortsetzung	pH 5,7	pH 4,7	
CA_P0163 (<i>ctfA</i>)	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit A			∞
CA_P0164 (<i>ctfB</i>)	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B			∞

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^b: Eine Protein-Ratio $\geq 2,0$ zeigt eine signifikante Induktion und eine Protein-Ratio $\leq 0,5$ zeigt eine signifikante Repression beim untersuchten pH-Wert (5,5 bis 4,7).

^c: Das Unendlichkeitszeichen (∞) bedeutet, dass ein Protein im vergleichenden pH-Wert nicht detektiert wurde.

3.3 Transkriptomanalysen von *C. acetobutylicum*

Neben den Proteomanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch auf der mRNA-Ebene die Unterschiede zwischen den verschiedenen Wachstumsbedingungen systematisch und umfassend untersucht. Die DNA-Micro Array Analysen aus den gleichen Kulturen und Probenmaterialien ermöglichten erstmalig einen umfassenden direkten Vergleich von Transkriptomdaten mit den oben geschilderten Proteomdaten.

3.3.1 *Steady state*-Transkriptom bei pH 5,7 und pH 4,5

In analoger Vorgehensweise erfolgte zunächst der direkte Vergleich der spezifischen mRNA-Mengen in Zellen aus der „Master“-Fermentation (3.1.1; Abb. 3.1), d. h. beim säurebildenden Wachstum bei pH 5,7 und unter lösungsmittelbildenden Bedingungen bei pH 4,5.

Um eine qualitativ und quantitative Auswertung von Expressionsunterschieden zu gewährleisten, wurden für den Vergleich beider Zustände 2 biologisch unabhängige Replikate herangezogen. Zusätzlich wurde für die Auswertung das sogenannte Dye-Flip- bzw. Dye-Swap-Verfahren angewandt. Dabei wurde im ersten Hybridisierungsverfahren für den ersten DNA Micro Array cDNA von pH 5,7 mit dem Farbstoff Cy3 und die cDNA von pH 4,5 mit dem Farbstoff Cy5 markiert (2.9.8). Um farbstoffspezifische Unterschiede zu vermeiden, wurde ein experimentelles Replikat angefertigt, der sogenannte Dye-Flip bzw. Dye-Swap. Dabei wurden im Hybridisierungsverfahren des wiederholten DNA Micro Arrays, die Farbstoffe für die cDNA von pH 5,7 und pH 4,5 getauscht (pH 5,7: Cy5 / pH 4,5: Cy3). Die gesamten Daten der Analyse sind im Anhang dokumentiert (Siehe Anhang DNA Micro Array pH 5,7 vs. pH 4,5). Die Abbildung 3.9 zeigt eine Übersichtsdarstellung mit den auffälligsten Unterschieden, wobei einige Gene oder Genorte bereits markiert sind. Zusätzlich wurden interessante Gene herausgesucht und ihr Expressionsverhalten in Tabelle A5 (Siehe Anhang)

aufgelistet. Dabei handelt es sich vor allem um Gene mit einer Funktion in der Stress-Antwort, der Glykolyse oder des primären Hauptstoffwechsels für Säure- und Lösungsmittelbildung.

Insgesamt wurden in Zellen der Säurephase bei pH 5,7 53 Gene (1,4 %) und in lösungsmittelbildenden Zellen bei pH 4,5 95 Gene (2,5 %) identifiziert, welche im Vergleich zum jeweils anderen Zustand signifikant erhöhte Transkriptmengen aufwiesen ($\geq 3,0$ -fach). Die Mehrheit aller Gene (66,3 %) zeigte keine signifikante Beeinflussung und 29,8 % der Gene wiesen kein Transkript auf bzw. erfüllten nicht die erforderlichen Filterkriterien (Hillmann *et al.*, 2009) im Analyseverfahren des DNA Micro Arrays.

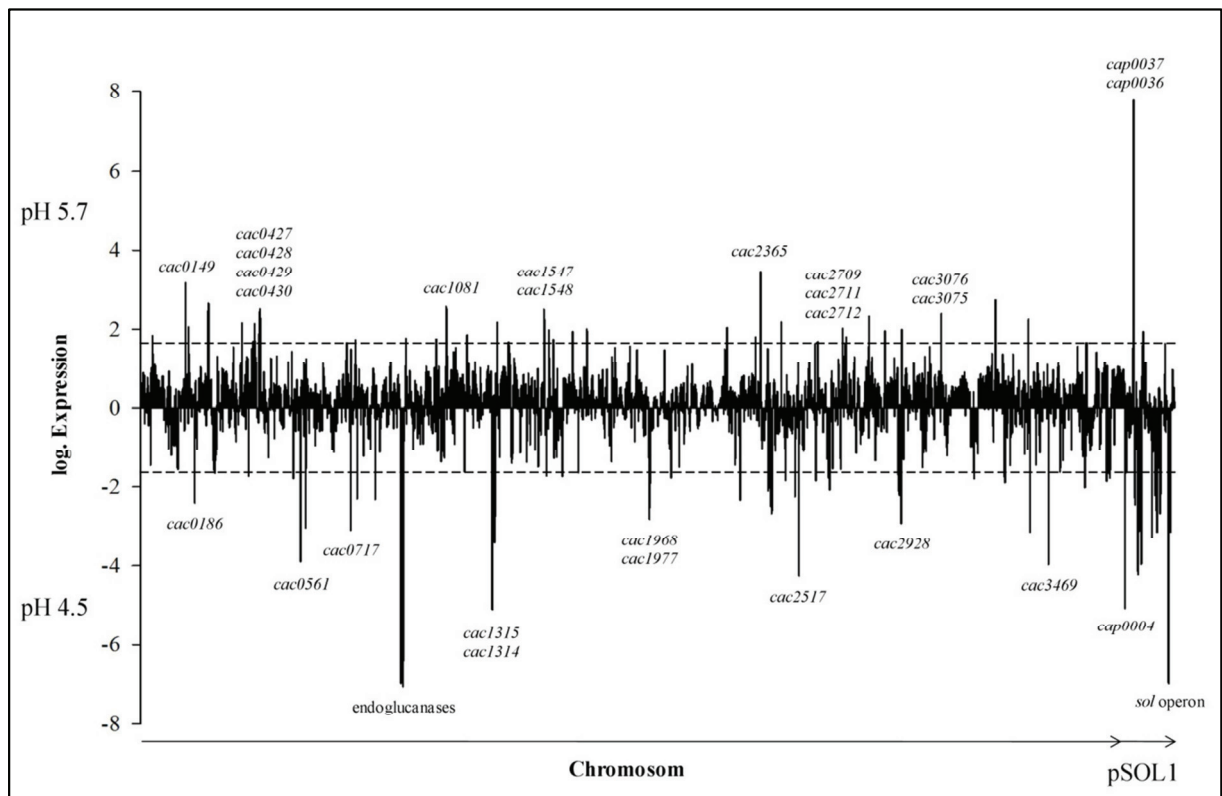


Abbildung 3.9: Überblick über die Transkriptlevel der einzelnen Gene in der Säurephase bei pH 5,7 und der Lösungsmittelphase bei pH 4,5. Gezeigt ist die log. Expression der Ratio (zur Basis 2) zwischen Säure- und Lösungsmittelphase. Alle Gene mit einer positiven log. Expression $\geq 1,6$ (gleich $\geq 3,0$ -fach) sind signifikant induziert bei pH 5,7 und Gene mit einer negativen log. Expression $\leq -1,6$ (gleich $\leq 0,33$ -fach) sind signifikant induziert bei pH 4,5. Somit zeigten alle Gene zwischen den gestrichelten Linien keinen signifikanten Einfluss bei einer bestimmten Wachstumsphase.

3.3.2 Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase bei pH 5,7

Die detaillierten Ergebnisse aller 53 signifikant induzierten Gene, welche mindestens ein $\geq 3,0$ -fach erhöhtes Transkript bei pH 5,7 aufwiesen, sind in Tab. 3.6 dargestellt. Sieben dieser Gene sind vom Megaplasmid pSOL1 kodiert (Cornillot *et al.*, 1997), zwei davon *cap0037* und *cap0036*, wiesen maximale Transkriptverstärkungen (~ 140 - 220 -fach) auf, die bei keinen anderen Genen festgestellt werden konnten. Dieses Ergebnis korrelierte mit den oben beschriebenen Proteomdaten (3.2.2), in denen CAP0037 und CAP0036 ebenfalls in hohen Konzentrationen ausschließlich in der Säurephase detektiert wurden (Tab. 3.3). Die fünf anderen auf dem pSOL1 kodierten Gene wiesen eine wesentlich

geringere Induktion von ~3 bis 4-fach auf. Die Gene *cap0073* und *cap0074* bilden ein putatives Operon und *cap0072*, *cap0038* und *cap0149* stellen einzelne Gene dar (Karp *et al.*, 2005). Die Funktionen sind bisher unbekannt („Hypothetical“ oder „Uncharacterized proteins“), lediglich partielle Ähnlichkeiten zu einem ABC-Transporter (CAP0073) oder zu einer DNA-Bindedomäne (CAP0149) wurden bisher postuliert (Nölling *et al.*, 2001).

Von den chromosomal kodierten Genen wies *cac2365* den höchsten Transkriptanstieg (~11-fach) bei pH 5,7 auf. Dieses Gen kodiert für ein SspA-Protein und ist als „Small acid-soluble DNA binding spore protein“ annotiert mit mutmaßlicher Schutzfunktion für das Sporen-Genom. Weiterhin ist bekannt, dass *sspA* in Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* bei Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase hochreguliert wird (Jones *et al.*, 2008; Shi und Blaschek, 2008). Allerdings bilden exponentiell wachsende Zellen in einer kontinuierlichen Kultur keine Sporen aus und die Funktion unter den gegebenen Bedingungen bleibt unklar. Die transkriptionelle Induktion von *sspA* kann vielleicht mit dem simultanen Transkriptanstieg (~2,0-fach) von *sigG* (CAC1696) erklärt werden (Siehe Anhang DNA Micro Array pH 5,7 vs. pH 4,5), denn in *B. subtilis* reguliert σ^G die Synthese von SspA (Jones *et al.*, 2008).

Wenig überraschend war die erhöhte Transkription von den Genen *ptb* („Phosphotransbutyrylase“, CAC3076) und *buk* („Butyrate kinase“, CAC3075) (~5-fach) in der Säurephase, da beide Genprodukte direkt die Butyratbildung bedingen (Hartmanis, 1987; Walter *et al.*, 1993; Wiesenborn *et al.*, 1989a). Ähnliche Steigerungsraten wurden für Gene gefunden, die in die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA involviert sind, z. B. die „Thiolase A“ (*thlA*, CAC2873), „Crotonase“ (*crt*, CAC2712), „Butyryl-CoA dehydrogenase“ (*bcd*, CAC2711) und die „Electron transfer flavoprotein alpha-subunit“ (*etfA*, CAC2709). Weiterhin waren 7 Gene 4 verschiedener ABC Transportsysteme bei pH 5,7 signifikant in ihren Transkriptmengen erhöht, z. B. ein „Putative ATP binding protein involved in sugar transport“ (*msmX*, CAC3237) und die Gene *cac0427*, *cac0428* und *cac0429* eines „Glycerol-3-phosphate ABC transporter systems“. Die ein putatives Operon mit einer „Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase“ (*cac0430*) bilden (Karp *et al.*, 2005). Zusätzlich zeigten noch 10 offene Leserahmen ein erhöhtes Transkript (~3 bis 9-fach) bei pH 5,7, welche für hypothetische Proteine kodieren.

Tabelle 3.6: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevels bei pH 5,7. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, mit einer durchschnittlichen Induktion (durchs. Ratio) von $\geq 3,0$ und wenn mindestens drei der vier Werte der einzelnen Micro Arrays $\geq 2,0$ waren. Zusätzlich aufgelistet ist die Standardabweichung (SD).

ORF#	Gen	Proteinfunktion ^a	1. Array	2. Array	3. Array	4. Array	durchs. Ratio	SD	COG ^b
CAC0029		Distantly related to cell wall-associated hydrolase, similar to <i>yycO B. subtilis</i>	2,1	1,5	7,5	3,2	3,6	2,7	S
CAC0149		Hypothetical protein	5,9	5,2	14,5	10,1	8,9	4,3	-
CAC0164		ABC transporter, ATP binding-protein	2,4	2,0	9,4	2,9	4,2	3,5	V
CAC0231		Transcriptional regulator of sugar metabolism	3,5	2,7	12,1	3,7	5,5	4,4	K,G

CAC0232	<i>fruB</i>	1-phosphofruktokinase	2,2	1,9	11,8	2,9	4,7	4,8	G
CAC0233		PTS system, IIA component	2,5	2,0	18,2	2,3	6,2	8,0	G,T
CAC0234		PTS system, fructoso-specific IIBC component	2,2	2,1	8,1	3,0	3,9	2,9	G
CAC0360		Transcriptional regulator	3,1	2,6	6,5	5,6	4,5	1,9	K
CAC0407		PP2C phosphatase family	2,7	2,1	4,6	3,5	3,2	1,1	T
CAC0409		Hypothetical protein	2,1	1,9	5,7	3,2	3,2	1,8	-
CAC0410		Hypothetical protein	2,0	1,8	5,6	2,6	3,0	1,8	S
CAC0411		Hypothetical protein	2,8	2,3	7,3	5,3	4,4	2,3	S
CAC0412		TPR-repeat-containing protein	2,0	1,7	5,5	3,9	3,3	1,8	R
CAC0427		Glycerol-3-phosphate ABC-transporter, permease component	3,1	3,1	5,7	2,9	3,7	1,3	G
CAC0428		Sugar permease	4,2	2,7	11,2	3,5	5,4	3,9	G
CAC0429		Glycerol-3-phosphate ABC-transporter, periplasmic component	4,6	3,3	9,2	5,7	5,7	2,5	G
CAC0430		Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	2,2	3,5	7,1	6,8	4,9	2,4	C
CAC0742		Phosphatase domain-containing protein	2,2	1,8	6,3	3,1	3,3	2,0	I
CAC0946		ComE-like protein	2,8	2,4	4,6	3,9	3,4	1,0	R
CAC1081		Hypothetical protein	2,1	2,1	13,0	5,6	5,7	5,1	S
CAC1230		Hypothetical protein	2,6	2,6	6,9	2,3	3,6	2,2	-
CAC1231		Predicted dehydrogenase	2,0	1,7	7,1	3,8	3,6	2,5	R
CAC1547	<i>trxA</i>	Thioredoxin	4,1	3,4	8,3	6,8	5,6	2,3	O
CAC1548	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	3,3	3,6	6,9	5,2	4,8	1,7	O
CAC1549	<i>bsaA</i>	Glutathione peroxidase	2,8	2,7	8,3	3,2	4,2	2,7	O
CAC1583		Predicted P-loop ATPase	2,4	2,2	3,5	5,3	3,3	1,4	E
CAC1702		Hypothetical protein	3,2	3,0	4,9	5,0	4,0	1,1	-
CAC1703		Methyl-accepting chemotaxis protein (fragment)	2,4	2,5	5,2	4,4	3,6	1,4	N,T
CAC1704		Hypothetical protein	2,8	2,8	4,9	5,0	3,9	1,2	-
CAC2252		Alpha-glucosidase	1,9	2,3	7,1	5,2	4,1	2,5	G
CAC2342		Predicted membrane protein	4,1	4,3	2,1	3,4	3,5	1,0	R
CAC2365	<i>sspA</i>	Small acid-soluble spore protein	13,1	13,9	6,1	-	11,0	4,3	-
CAC2438		Predicted phosphatase	5,3	4,7	3,4	4,8	4,5	0,8	-
CAC2601		S-adenosylmethionine decarboxylase	1,9	2,1	5,2	3,2	3,1	1,5	E
CAC2702		Possible signal transduction protein	4,0	3,7	3,6	5,0	4,1	0,6	T
CAC2709	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	2,3	2,0	5,4	2,4	3,0	1,6	C
CAC2711	<i>bcd</i>	Butyryl-CoA dehydrogenase	2,0	1,8	6,1	2,4	3,1	2,0	I
CAC2712	<i>crt</i>	Enoyl-CoA hydratase	2,1	1,8	7,2	2,9	3,5	2,5	I
CAC2810		Glucoamylase family protein	2,7	2,2	10,1	4,9	5,0	3,6	G
CAC2873	<i>thlA</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	2,3	1,7	8,1	3,5	3,9	2,9	I
CAC2938		Hypothetical protein	2,4	1,9	6,5	5,2	4,0	2,2	R
CAC3075	<i>buk</i>	Butyrate kinase	4,0	2,8	8,1	5,7	5,1	2,3	C
CAC3076	<i>ptb</i>	Phosphate butyryltransferase	3,4	2,5	9,5	5,4	5,2	3,1	C
CAC3236		Transcriptional regulator	2,7	2,1	13,2	8,5	6,6	5,3	T,Q
CAC3237	<i>msmX</i>	Sugar ABC-transporter, ATP-binding protein	2,5	2,2	10,9	8,1	5,9	4,3	G

CAC3379		Hypothetical protein	3,6	3,5	5,6	6,3	4,7	1,4	S
CA_P0036		Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B. subtilis</i>	90,4	19,0	270,0	200,0	144,9	111,8	M
CA_P0037		Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B. subtilis</i>	114,9	54,1	451,9	250,0	217,7	176,3	-
CA_P0038		Uncharacterized conserved protein, YCII family	4,2	3,4	3,2	2,5	3,3	0,7	S
CA_P0072		Hypothetical protein	2,0	2,1	6,0	2,0	3,0	2,0	-
CA_P0073		ABC ATPase containing transporter	2,7	2,4	7,6	2,1	3,7	2,6	V
CA_P0074		Hypothetical protein	2,9	2,2	8,3	2,0	3,9	3,0	-
CA_P0149		Xre family DNA binding domain and TPR repeats containing protein	2,6	2,6	4,2	3,2	3,1	0,8	K

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^b: „Cluster of orthologous groups“ (COG) nach Tatusov *et al.* (2000).

3.3.3 Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase bei pH 4.5

Im Vergleich zur Säurephase bei pH 5,7 zeigten bei pH 4,5 wesentlich mehr Gene deutlich verstärkte Transkriptmengen. So wiesen 95 Gene eine um mindestens den Faktor 3 gestiegene mRNA-Menge auf (Tab. 3.7). Außergewöhnlich hohe Induktionen (~125-fach) konnten für die Gene des *sol* Operons (*cap0162-cap0164*) dokumentiert werden, was im Umkehrschluss ebenso eine Repression in der Säurephase bei pH 5,7 bedeutete (~0,008-fach). Die stark gestiegene Expression dieser Gene bei pH 4,5 erklärt die Funktion ihrer Produkte (AdhE1; „Subunits of CoA-transferase“) für die Lösungsmittelbildung (Fischer *et al.*, 1993; Nair *et al.*, 1994; Wiesenborn *et al.*, 1989b) und korreliert gut mit den Proteomanalysen in denen diese Proteine ausschließlich in der Lösungsmittelphase detektiert wurden (Tab. 3.4). Ähnlich stark erhöhte Transkriptlevel wurden für die chromosomalen Gene *cac0910-cac0915* und *cac0918-cac0919* gemessen. Ihre Genprodukte sind als „Endoglucanases“ annotiert und sollten daher eine Rolle im Abbau von Cellulose spielen (Nölling *et al.*, 2001). Bereits in den Proteomanalysen wurde eine „Processive endoglucanase“ (CAC0911) ausschließlich bei pH 4,5 detektiert (Tab. 3.4). Die erhöhte Transkription dieser Gene war aber überraschend, da Glukose während der gesamten Dauer der Fermentation die einzige Kohlenstoffquelle im Medium darstellte und nicht wachstumslimitierend war. Ebenso wiesen Gene deren Produkte am Abbau von Xylan beteiligt sind (*cap0053-cap0054*, *cap0118-cap0120*), sowie eine „Pectate lyase“ (*cap0056*) und ein „Cellulose CelE like protein“ (*cac0561*), sowie weitere „Endoglucanases“ (*cac0826*, *cac3469*) stark erhöhte Transkriptmengen auf (~5-20-fach). Die Verbindung zur Lösungsmittelbildung oder dem Wachstum bei pH 4,5 ist für diese Gene allerdings bisher unbekannt.

Zusätzlich wurden verschiedene proteolytische Enzyme mit einem signifikanten Anstieg des mRNA-Levels (~5 bis 30-fach) bei pH 4,5 gefunden, z. B. eine „Cysteine protease“ (*cap0004*), eine „Secreted metalloprotease“ (*cap0065*), eine „Secreted metal-dependent protease“ (*cac0746*), und eine „Extracellular neutral metalloprotease NPPE“ (*cac2517*). Das Protein CAC2517 wurde ebenfalls ausschließlich in der Lösungsmittelphase festgestellt (Tab. 3.4). Auch offene Leserahmen deren

Produkte „Hypothetical proteins“ (mind. 12) oder Membranproteine sind (mind. 5), zeigten stark erhöhte Transkriptmengen bei pH 4,5, z. B. *cap0044*, *cap0102*, *cac0717*, *cac1324*, *cac2053*, *cac2497*.

Tabelle 3.7: Gene mit einer signifikanten Induktion des Transkriptlevel bei pH 4,5. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Als signifikant induziert gelten alle Gene, mit einer durchschnittlichen Induktion (durchs. Ratio) von $\leq 0,33$ und wenn mind. drei der vier Werte der einzelnen Micro Arrays $\leq 0,5$ waren. Zusätzlich aufgelistet ist die Standardabweichung (SD).

ORF#	Gen	Proteinfunktion ^a	1. Array	2. Array	3. Array	4. Array	durchs. Ratio	SD	COG ^b
CAC0186		Xre family DNA-binding domain and TPR-repeat-containing protein	0,19	0,15	0,24	0,19	0,19	0,04	-
CAC0254	<i>nifHD</i>	Nitrogen regulatory protein PII (nitrogen fixation nifHD)	0,21	0,17	0,53	0,43	0,33	0,17	E
CAC0255	<i>nifHD</i>	Nitrogen regulatory protein PII (nitrogen fixation nifHD)	0,22	0,20	0,41	0,46	0,32	0,13	E
CAC0256	<i>nifD</i>	Nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha chain (nitrogenase component I)	0,21	0,16	0,42	0,47	0,32	0,15	C
CAC0392		Peptidoglycan-binding domain	0,30	0,28	0,25	0,36	0,30	0,04	M
CAC0538		ChW repeat-containing mannanase ManB	0,35	0,34	0,24	0,22	0,29	0,07	G
CAC0561		Cellulase CelE like protein	0,04	0,05	0,11	0,07	0,07	0,03	-
CAC0574		Pectate lyase H (FS)	0,08	0,08	0,19	0,14	0,12	0,05	-
CAC0717		Predicted membrane protein	0,10	0,12	0,15	0,10	0,12	0,02	-
CAC0746		Secreted protease metal-dependent protease	0,14	0,15	0,27	0,25	0,20	0,07	S
CAC0826		Endoglucanase family 5	0,16	0,16	0,29	0,19	0,20	0,06	G
CAC0910		Cellulosomal scaffolding protein	0,007	0,007	0,012	0,007	0,008	0,003	G
CAC0911		Processive endoglucanase	0,007	0,007	0,012	0,010	0,009	0,002	-
CAC0912		Non-processive endoglucanase	0,007	0,006	0,013	0,007	0,008	0,003	G
CAC0913		Non-processive endoglucanase	0,010	0,008	0,012	0,008	0,009	0,002	-
CAC0914		Cellulosome integrating cohesin-containing protein, secreted	0,009	0,008	0,009	-	0,008	-	-
CAC0915		Endoglucanase A	0,015	0,016	0,010	0,008	0,012	0,004	-
CAC0918		Non-processive endoglucanase	0,009	0,007	0,008	0,006	0,008	0,001	-
CAC0919		Sialidase	0,009	0,013	0,013	0,013	0,012	0,002	-
CAC1214		Xre family DNA-binding domain and TPR-repeat containing protein	0,30	0,25	0,38	0,36	0,32	0,06	-
CAC1314		Hypothetical protein	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,002	-
CAC1315		Peptidoglycan-binding domain containing protein	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,004	M
CAC1322	<i>glpA</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,06	0,09	0,15	0,08	0,09	0,04	R
CAC1323		NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	0,13	0,16	0,29	0,19	0,19	0,07	O
CAC1324		Hypothetical protein	0,13	0,15	0,14	0,19	0,15	0,03	S
CAC1554		Heavy metal-binding domain-containing protein	0,32	0,34	0,30	0,24	0,30	0,05	S
CAC1611		Cation efflux pump (multidrug resistance protein)	0,34	0,33	0,27	0,26	0,30	0,04	V
CAC1673	<i>gltA</i>	Large subunit of NADH-dependent glutamate synthase	0,22	0,26	0,36	0,43	0,32	0,09	E
CAC1968		Pectate lyase related enzyme	0,12	0,11	0,14	0,20	0,14	0,04	-
CAC1977		Predicted membrane protein	0,16	0,19	0,18		0,17	0,02	-

CAC1980		Predicted ATPase involved in pili biogenesis	0,25	0,26	0,28	0,28	0,27	0,01	U
CAC2052		DNA-dependent RNA polymerase sigma subunit	0,24	0,19	0,47	-	0,30	0,15	K
CAC2053		Hypothetical protein	0,27	0,19	0,43	0,26	0,29	0,10	-
CAC2293		Hypothetical protein	0,11	0,19	0,21	0,28	0,20	0,07	-
CAC2392		ABC transporter, ATPase component	0,18	0,19	0,34	0,22	0,23	0,07	V
CAC2393		ABC transporter, ATPase component	0,21	0,18	0,40	0,18	0,24	0,10	V
CAC2396		Xylanase/chitin deacetylase	0,25	0,29	0,29	0,21	0,26	0,04	G
CAC2404		Glycosyltransferase	0,21	0,17	0,20	0,13	0,18	0,03	R
CAC2405		Glycosyltransferase	0,18	0,14	0,28	0,14	0,19	0,07	M
CAC2406		O-antigen transporter permease	0,12	0,16	0,20	0,15	0,16	0,03	R
CAC2407		CheY-like domain-containing protein	0,18	0,15	0,20	0,14	0,17	0,03	T
CAC2408		Glycosyltransferase	0,14	0,12	0,24	0,18	0,17	0,05	M
CAC2450		Desulfoferrodoxin	0,28	0,35	0,27	0,21	0,28	0,06	C
CAC2497		Hypothetical protein	0,17	0,28	0,19	0,22	0,21	0,05	-
CAC2517	<i>nrpE</i>	Extracellular neutral metalloprotease, NPRE	0,06	0,06	0,06	0,04	0,05	0,01	E
CAC2606		Hypothetical protein	0,18	0,19	0,37	0,36	0,28	0,10	G
CAC2607		Gluconate 5-dehydrogenase	0,20	0,19	0,52	0,28	0,30	0,15	I,Q,R
CAC2650	<i>pyrD</i>	Dihydroorotate dehydrogenase	0,15	0,14	0,53	0,38	0,30	0,19	F
CAC2651	<i>pyrZ</i>	Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit	0,15	0,13	0,56	0,32	0,29	0,20	H,C
CAC2652	<i>pyrF</i>	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	0,16	0,12	0,63	0,30	0,30	0,23	F
CAC2653	<i>pyrI</i>	Aspartate carbamoyltransferase regulatory subunit	0,21	0,21	0,44	0,33	0,30	0,11	F
CAC2654	<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	0,15	0,12	0,34	0,34	0,24	0,12	F
CAC2920	<i>tenI</i>	Thiamine monophosphate synthase	0,18	0,16	0,52	0,36	0,31	0,17	H
CAC2921	<i>thiH</i>	Thiamine biosynthesis protein ThiH	0,15	0,13	0,56	0,33	0,29	0,20	H,R
CAC2922	<i>thiG</i>	Thiazole synthase	0,15	0,14	0,39	0,24	0,23	0,11	H
CAC2923		Thiamine biosynthesis protein ThiF	0,15	0,14	0,37	0,24	0,23	0,11	H
CAC2924	<i>thiS</i>	Hypothetical protein	0,15	0,15	0,35	0,21	0,22	0,10	H
CAC2928		Predicted membrane protein	0,22	0,15	0,10	0,06	0,13	0,07	S
CAC3166		Predicted DNA-binding protein	0,32	0,27	0,37	-	0,32	0,05	R
CAC3167		Hypothetical protein	0,26	0,20	0,44	0,24	0,29	0,11	S
CAC3276	<i>nrdF</i>	Ribonucleotide-diphosphate reductase beta subunit	0,38	0,49	0,17	0,14	0,30	0,17	F
CAC3279		ChW repeat-containing protein	0,26	0,28	0,33	0,20	0,27	0,05	N
CAC3280		ChW repeat-containing protein	0,33	0,30	0,34	0,21	0,29	0,06	N
CAC3387		Pectate lyase	0,16	0,17	0,06	0,07	0,11	0,06	-
CAC3469		Endoglucanase family protein	0,05	0,04	0,10	0,06	0,06	0,03	G
CAC3526		FMN-binding protein	0,30	0,22	0,40	0,37	0,32	0,08	-
CAC3612		Hypothetical protein	0,27	0,23	0,22	0,26	0,25	0,03	-
CAC3684		Polygalacturonase	0,21	0,20	0,42	0,27	0,27	0,10	M
CAC3693		Hypothetical protein	0,30	0,41	0,24	0,31	0,31	0,07	-
CAC3694		TPR-repeat-containing protein	0,32	0,37	0,30	0,31	0,32	0,03	R
CAC3695		Transcriptional regulator, containing DNA-binding domain of xre family	0,27	0,30	0,31	0,28	0,29	0,02	-

CAC3696		Hypothetical protein	0,43	0,31	0,30	0,29	0,33	0,07	S
CA_P0004		Cysteine protease	0,02	0,02	0,04	0,04	0,03	0,01	O
CA_P0009		Response regulator	0,25	0,28	0,51	0,24	0,32	0,13	T
CA_P0010	<i>bglA</i>	Beta-glucosidase	0,30	0,32	0,35	0,33	0,32	0,02	G
CA_P0040		Xre family DNA-binding domain and TPR repeats containing protein	0,21	0,19	-	0,26	0,22	0,03	-
CA_P0044		Hypothetical protein	0,18	0,17	0,29	0,19	0,21	0,05	-
CA_P0045		Glycosyl transferase	0,19	0,18	0,23	0,14	0,18	0,04	G,C
CA_P0053	<i>xynB</i>	Xylanase	0,06	0,07	0,05	0,05	0,06	0,01	G
CA_P0054		Xylanase/chitin deacetylase family protein	0,06	0,06	0,06	0,04	0,05	0,01	G
CA_P0056	<i>pell</i>	Pectate lyase	0,10	0,09	0,16	0,11	0,12	0,03	-
CA_P0065		Secreted metalloprotease	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,004	-
CA_P0102		Membrane protein	0,11	0,10	0,12	0,08	0,10	0,02	R
CA_P0112		Hypothetical protein	0,27	0,25	0,18	0,17	0,22	0,05	-
CA_P0116		Xylanase	0,17	0,17	0,28	0,28	0,22	0,06	G
CA_P0117		Beta-xylosidase	0,12	0,12	0,22	0,19	0,17	0,05	-
CA_P0118		Xylan degradation enzyme	0,14	0,16	0,18	0,16	0,16	0,02	M
CA_P0119		Xylan degradation enzyme	0,09	0,09	0,15	0,12	0,11	0,03	M
CA_P0120		Xylan degradation enzyme	0,09	0,10	0,16	0,13	0,12	0,03	G
CA_P0128		Permease, MDR related	0,30	0,25	0,05	0,04	0,16	0,13	G
CA_P0129		Glycogen-binding regulatory subunit of S/T protein phosphatase I	0,19	0,21	0,22	0,25	0,22	0,02	-
CA_P0162	<i>adhe1</i>	Aldehyde dehydrogenase	0,012	0,009	0,008	0,004	0,008	0,003	C
CA_P0163	<i>ctfa</i>	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit A	0,009	0,010	0,009	0,004	0,008	0,003	I
CA_P0164	<i>ctfb</i>	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B	0,014	0,010	0,007	0,004	0,008	0,004	I
CA_P0168	<i>amyA</i>	Alpha-amylase	0,11	0,09	0,16	0,09	0,11	0,03	G

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^b: „Cluster of orthologous groups“ (COG) nach Tatusov *et al.* (2000).

3.3.4 Überprüfung der Transkriptmengen von *cap0036* und *cap0037*

Da in den DNA Micro Array- und Proteomdaten die beiden Gene *cap0036* und *cap0037* bzw. deren Produkte in der Säurephase bei pH 5,7 die signifikantesten Induktionen aufwiesen (Tab. 3.3 und Tab. 3.6), wurden diese Gene zur Verifikation der DNA Micro Array Daten ausgewählt. Dies erfolgte mittels Detektion der Transkripte von *cap0036* und *cap0037* in Northern Blot Analysen (2.9.7.2). Es ließen sich für beide Gene Transkripte einheitlicher Größe (1,4 kB) nachweisen und zwar ausschließlich unter säurebildenden Wachstumsbedingungen bei pH 5,7. Damit konnten die Befunde der DNA Micro Array Analyse und der 2D Gele bestätigt werden. Die einheitliche Größe von 1,4 kB deutete auf ihre Organisation in einem biscistronischem Operon hin. Unterstützend entspricht die Transkriptlänge von 1400 Nukleotiden nahezu exakt der Summe (1377 Bp) der Nukleotidanzahlen der beiden Gene (729 Bp + 630 Bp) plus intergenischem Bereich (18 Bp) sowie einer 5' untranslatierten Region (UTR). Die stärkeren Hybridisierungssignale der *cap0036* spezifischen Sonde können auf eine

bessere spezifische Hybridisierungsrate aufgrund der individuellen Nukleotidsequenz der Sonde und gegebenenfalls auf unterschiedliche Markierungseffizienzen zurückgeführt werden.

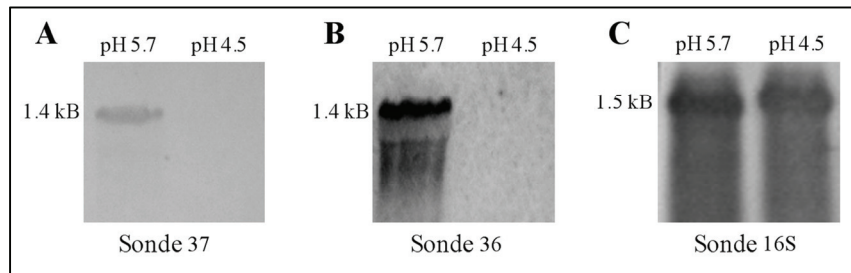


Abb. 3.10: Northern Blot Analysen von *cap0037* und *cap0036*. Gesamt-RNA (15 µg pro Spur in A und B; 1 µg in C) von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 4,5 (markiert). Die Hybridisierung erfolgte mit DIG-markierten Sonden gegen *cap0037* (A), *cap0036* (B) und das 16S rRNA-Transkript (C) als Kontrolle der RNA-Integrität.

3.3.5 *Steady state*-Transkriptome der pH-Stufen 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7

Analog zu den Proteomanalysen (3.2.3) wurden von den zusätzlich angefertigten Chemostatkulturen (3.1.2) bei den Zwischen-pH-Werten 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7 analog zur „Master“-Fermentation im *steady state*-Wachstum Transkriptomanalysen durchgeführt. Um die einzelnen DNA Micro Arrays der verschiedenen pH-Werte untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils die gleiche Referenzprobe, in diesem Fall RNA aus Zellen im *steady-state* bei pH 4,5, herangezogen. Die DNA Micro Arrays erfolgten gemäß Standardprotokoll (2.9.8) und ihre Daten sind im Anhang (DNA Micro Arrays pH 5,7 bis pH 4,5) dokumentiert. Die Auswertung der Daten und das jeweilige Clustern der Gene zueinander wurde mittels der Software „Gene Spring GX“ durchgeführt (Engelmann, Vektorologie und Experimentelle Gentherapie, Universität Rostock). Als Grundlage dienten die Transkriptionsanalysen zwischen den Ausgangs-pH-Stufen 5,7 und 4,5 (3.3.1, Tab. 3.6; Tab. 3.7). Es galt auf dieser Basis zu zeigen, welche pH-bedingten Transkriptionsveränderungen zwischen den Extremwerten der „Master“-Fermentation auftraten.

3.3.5.1 Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase bei pH 5.7

Der direkte Vergleich der beiden Ausgangs-pH-Stufen 5,7 und 4,5 ermittelte 53 Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase (3.3.2, Tab. 3.6). Diese Gene wurden nun hinsichtlich ihres Transkriptmusters in den einzelnen *steady state*-Wachstumsphasen von pH 5,5 bis 4,7 näher betrachtet. Für 39 der 53 Gene konnten auswertbare Transkriptmuster nach den genutzten Filterkriterien (Hillmann *et al.*, 2009) gemessen werden (Abb. 3.11). Auffällig waren erneut die Transkripte der Gene *cap0037* und *cap0036*. Sie zeigten bei pH-Werten mit eindeutigem Säuremetabolismus (pH 5,5 und 5,3) (basierend auf Tab. 3.1) gegenüber der Lösungsmittelphase (pH 4,5) die stärksten Induktionen (~100-600-fach). Bei den pH-Werten 5,1, 4,9 und 4,7 waren die Transkriptmengen auf einem sehr geringen Basallevel, wie es bereits für pH 4,5 bekannt war. Diese Erkenntnis bestätigte die bereits zuvor erzielte Proteomanalyse. Auch hier konnten die Proteine CAP0037 und CAP0036 ab dem pH-Punkt 5,1 nicht mehr detektiert werden (Tab. 3.5). Weitere Gene,

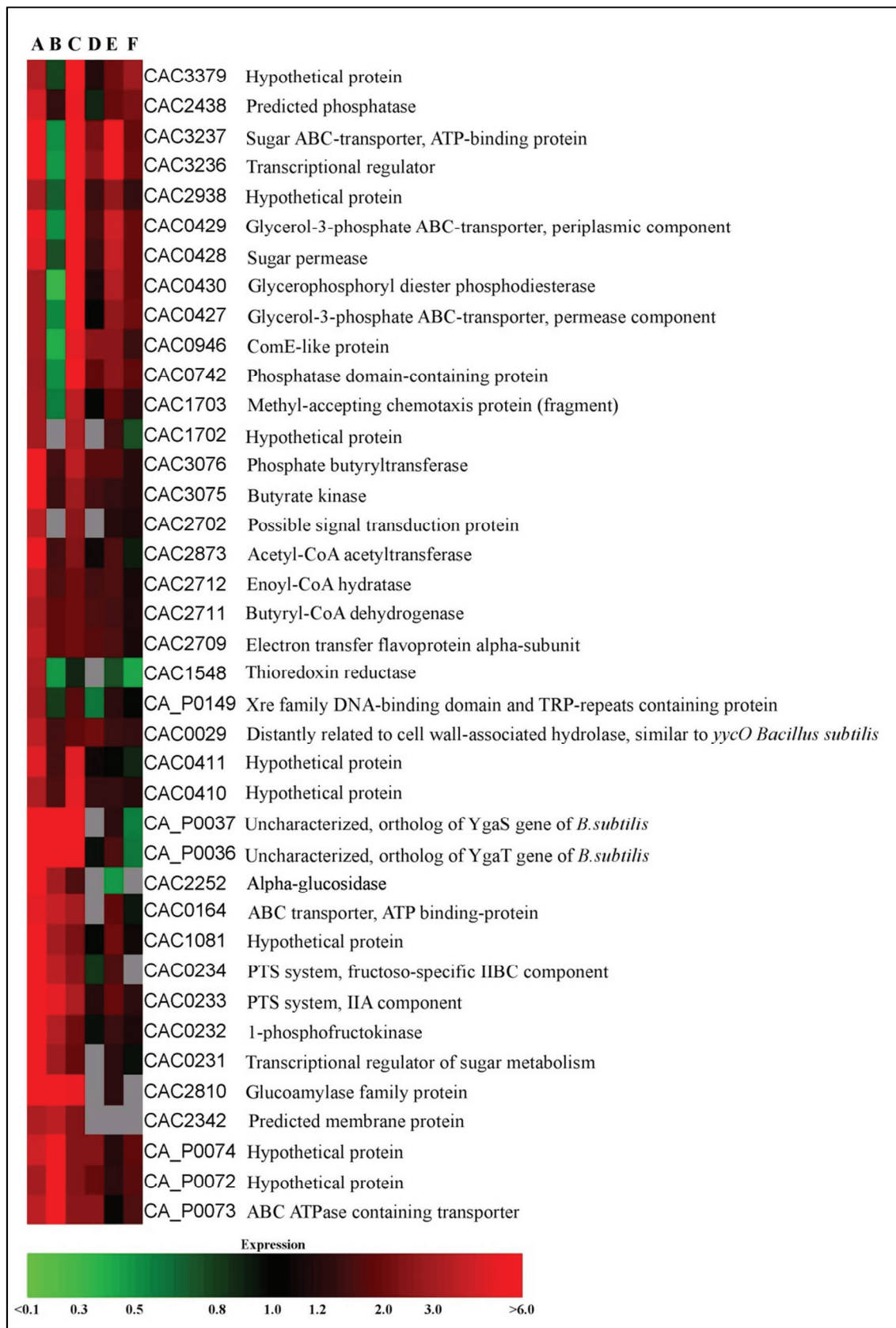


Abb. 3.11: Darstellung der Expressionsprofile induzierter Gene aus der Säurephase (pH 5,7) (Siehe Tab. 3.6) bei unterschiedlichen pH-Stufen. Die RNA aller pH-Stufen (A: 5,7; B: 5,5; C: 5,3; D: 5,1; E: 4,9; F: 4,7) wurde mit der Referenz-RNA des pH-Wertes 4,5 hybridisiert. Die Expressionswerte $\geq 3,0$ gelten als signifikant induziert (rot) und $\leq 0,33$ als signifikant reprimiert (grün) in den untersuchten pH-Werten (A-F) zur verglichenen pH-Stufe 4,5. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund gewählter Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden.

die eine erhöhte Transkriptmenge bis einschließlich pH-Stufe 5,3 aufwiesen, waren das putative Operon eines ABC-Transporter (*cac0231-0233*) oder die Gene von „Hypothetical proteins“ (*cac0410*, *cac0411* und *cac1081*). Ab pH 5,1 zeigten auch diese Gene ein ähnliches Transkriptmuster wie bei Zellen in der Lösungsmittelphase. Allerdings konnten auch Gene dokumentiert werden, die auch noch bei der pH-Stufe 5,1 eine erhöhte Transkriptmenge gegenüber der pH-Stufe 4,5 aufwiesen. Hierbei handelte es sich zum einen um das putative Operon *cap0073-0074*, welches für einen potentiellen ABC-Transporter kodiert, und zum anderen um die Gene *cap0072* („Hypothetical protein“) und *cac0029* („Distantly related to cell wall-associated hydrolase“). Interessanterweise konnten für einige Gene, wie *etfA* (*cac2709*), *bcd* (*cac2711*), *crt* (*cac2712*), *thlA* (*cac2873*) und *cac1548* („Thioredoxin“) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Lösungsmittelphase und den definierten Säure-pH-Stufen 5,5 und 5,3 ausgemacht werden (~1.5-2.0-fach). Auffällig ist ebenso, dass eine Anzahl von Genen bei Kultivierung von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7 und pH 5,3 eine signifikante Induktion aufwiesen, aber in der dazwischen liegenden Stufe pH 5,5 nicht. Dies waren unter anderem die Gene der Butyratsynthese, *buk* (*cac3075*) und *ptb* (*cac3076*), Gene die für „Hypothetical proteins“ kodieren (*cac3379*, *cac2938*), eine „Predicted phosphatase“ (*cac2438*) oder putative ABC Transporter (*cac3237-3236* und *cac0427-0430*).

3.3.5.2 Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase bei pH 4.5

Bei der umgekehrten Betrachtungsweise, d.h. bei pH 4,5, konnten von den 95 Genen mit einem erhöhten Transkriptlevel in der Lösungsmittelphase 84 Gene ausführlich anhand ihres Transkriptmusters für die pH-Stufen 5,5 bis 4,7 dokumentiert werden (Abb. 3.12). Für den größten Teil der Gene (34) ließ sich dokumentieren, dass diese bei den pH-Punkten 5,5 und 5,3 signifikant geringere Transkriptmengen aufwiesen. Auch hier ließ sich zeigen, dass diese Gene bei pH 5,1 bis 4,7 ähnliche Transkriptmengen zeigten wie bei pH 4,5. Darunter sind zum einen das *sol* Operon (*cap0162-0164*), ein Operon für Xylanasen (*cap0054-0053*), mehrere Endoglukanasen (*cac0910*, *cac0912*, *cac0913*, *cac0918*, *cac0826*), eine „Cysteine protease“ (*cap0004*), „Xre family DNA-binding domain and TPR repeats containing proteins“ (*cac0186*, *cap0040*) oder eine „Extracellular neutral metalloprotease“ (*cac2517*). Einige dieser Ergebnisse bestätigen die bereits gewonnenen Proteomdaten (3.2.5.; Tab. 3.5). So konnten die Proteine des *sol* Operons (AdhE1, CtfA und CtfB) und die „Extracellular neutral metalloprotease“ (CAC2517) nur in den pH-Stufen 5,1 bis 4,5 in 2D Gelen detektiert werden.

Allerdings sind auch 17 Gene vorhanden, die bei pH 5,1 ähnliche Transkriptmengen zeigen wie in der Säurephase bei pH 5,7 bis 5,3. Auffällig ist dabei, dass 12 dieser Gene auf dem Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997) kodiert sind. Darunter sind u. a. Xylanasen (*cap0116*) oder Gene, die für Xylan abbauende Proteine kodieren (*cap0120-0118*). Weiterhin konnten unter diesen Genen, eine „Permease, MDR related“ (*cap0128*), ein „Membrane protein“ (*cap0102*), eine „Glycosyltransferase“ (*cap0045*)



Abb. 3.12: Fortsetzung der Abbildung Siehe Folgeseite

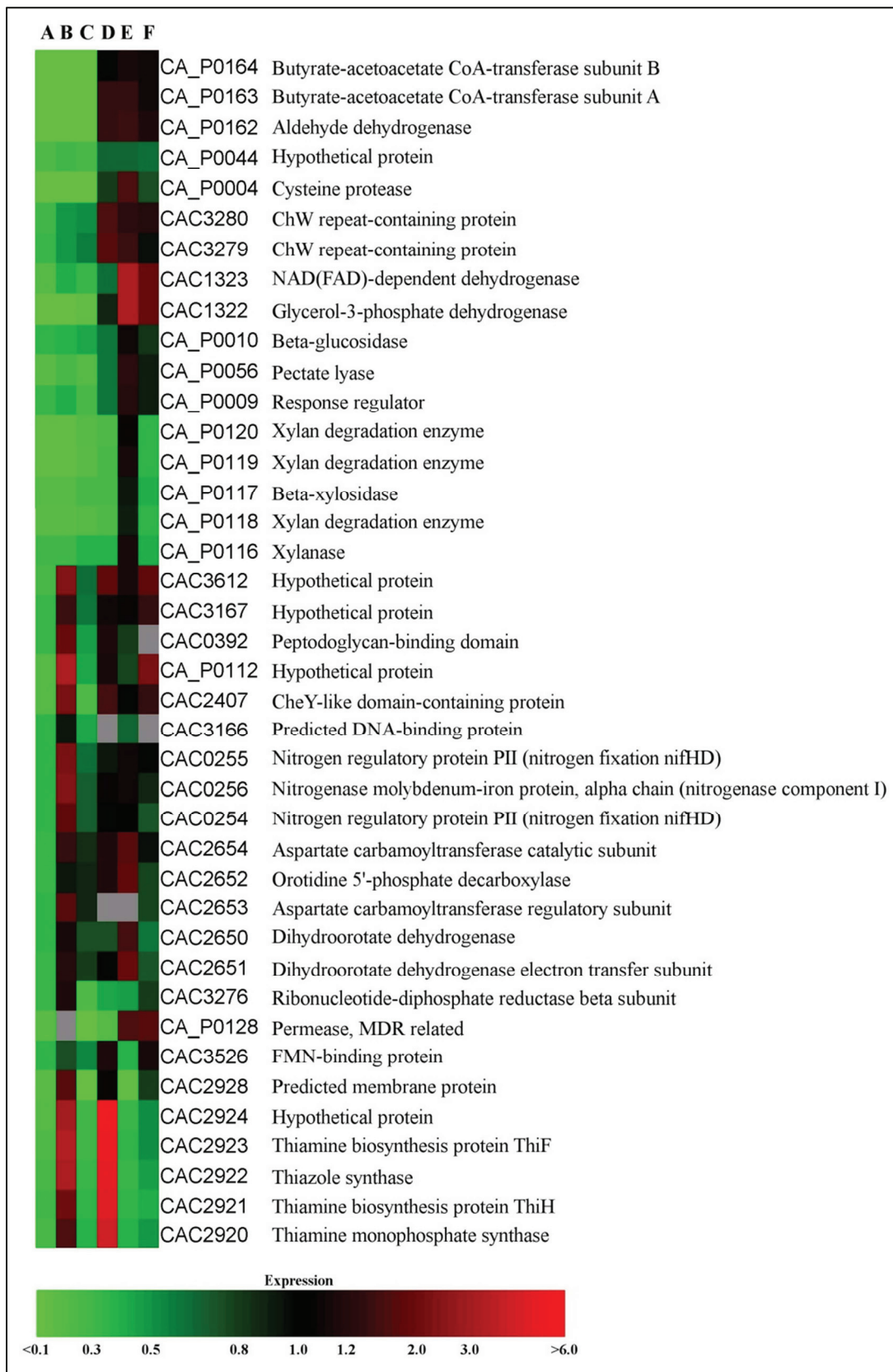


Abb. 3.12: Darstellung der Expressionsprofile induzierter Gene aus der Lösungsmittelphase (pH 4,5) (Siehe Tab. 3.7) bei unterschiedlichen pH-Stufen. Die RNA aller pH-Stufen (A: 5,7; B: 5,5; C: 5,3; D: 5,1; E: 4,9; F: 4,7) wurde mit der Referenz-RNA des pH-Wertes 4,5 hybridisiert. Die Expressionswerte $\geq 3,0$ gelten als signifikant induziert (rot) und $\leq 0,33$ als signifikant reprimiert (grün) in den untersuchten pH-Werten (A-F) zur verglichenen pH-Stufe 4,5. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund gewählter Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden.

und eine „Alpha-amylase“ (*cap0168*, *amyA*) gefunden werden. Darüber hinaus konnten Gene identifiziert werden, welche in den Säurephasen bei pH 5,7 und pH 5,3 geringere Transkriptmengen aufwiesen. Diese Verringerung der Transkripte konnte aber überraschenderweise nicht in der pH-Stufe 5,5 nachgewiesen werden. Unter diesen Genen sind u. a. „Glycosyltransferases“ (*cac2404*, *cac2405*, *cac2408*), „Hypothetical proteins“ (*cap0112*, *cac3612*, *cac3167*), ein putatives Operon mit Genen des Thiaminstoffwechsels (*cac2924-2920*) und Gene des Stickstoffmetabolismus (*cac0254-cac0256*) zu finden.

3.3.5.3 Wachstumsphase pH 5,1: Transitionsphase auf Transkriptebene?

Die bei pH 5,1 gewachsenen Zellen konnten anhand der Analyse der Fermentationsprodukte (3.1.2; Tab. 3.1) nicht eindeutig zur Säure- oder Lösungsmittelphase zugeordnet werden. Das Spektrum an Fermentationsprodukten deutet darauf hin, dass sich die Bakterien unter diesen Bedingungen in einer Transitionsphase zwischen Säure- und Lösungsmittelproduktion befinden. Allerdings konnten bereits in der Proteomanalyse (3.2.5; Tab. 3.5) Indikatorproteine der Säurephase (z. B. CAP0037, CAP0036) bei pH 5,1 nicht mehr detektiert werden. Ebenso konnten bei diesem pH-Wert bereits Indikatorproteine der Lösungsmittelphase (AdhE, CtfA, CtfB und CAC2517) eindeutig nachgewiesen werden. Es war somit zu klären, welche Wachstumsphase pH 5,1 auf transkriptioneller Ebene reflektiert. Zellen von Kulturen der Säurephase (pH 5,5 und 5,3) wiesen insgesamt 189 Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge auf, von denen nur noch 23 Gene auch bei pH 5,1 gegenüber der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 erhöht vorkamen. Auch von den insgesamt 103 Genen mit signifikant verminderter Transkriptmenge der Kulturen der Säurephase, sind nur noch 11 Gene in der Transitionsphase wieder zu finden. Diese Zahlen deuten darauf hin, dass der pH-Wert 5,1 auf transkriptioneller Ebene eher eine Lösungsmittelphase einnimmt und zur Säurephase eine Abgrenzung darstellt. In den Abbildung A9 (siehe Anhang) sind ausgewählte Gene aufgelistet, welche sich klar bei pH 5,1 von der Säurephase unterscheiden und eine Transkriptmenge ähnlich zur Lösungsmittelphase aufweisen. Dagegen sind in Abbildung A10 (Siehe Anhang) Gene aufgelistet, die wiederum bei pH 5,1 in ihrem Transkriptlevel Ähnlichkeiten zur Kultur einer Säurephase aufzeigen. Insgesamt kann aber aufgrund dieser Transkriptomdaten die Wachstumsphase pH 5,1 eher der Lösungsmittelphase (pH 4,9 bis 4,5) zugeordnet werden, wie es bereits anhand der Proteomdaten durch die erwähnten Indikatorproteine gezeigt werden konnte.

3.4 Butanolstress in der Säurephase von *C. acetobutylicum*

Es ist bekannt, dass eine kontinuierliche Kultur von *C. acetobutylicum* durch das Absenken des externen pH-Wertes in einer Chemostatkultur seinen Metabolismus von Säure- zugunsten der Lösungsmittelproduktion umstellt (Bahl *et al.*, 1982a/b). Im Zuge dieser Änderung des Metabolismus kommt es in den Zellen zu globalen Änderungen auf Transkript- (3.3.1; Tab. 3.6/3.7) und Proteinebene (3.2.1; Tab. 3.3/3.4). Ein Teil der vorliegenden Arbeit galt der detaillierten Analyse von

Protein- und Transkriptmustern in Abhängigkeit unterschiedlicher externer pH-Werte. Allerdings konnte anhand dieser Experimente nicht unterschieden werden, ob Veränderungen auf Gen- oder Proteinebene ausschließlich auf den pH-Wert oder ob diese auch der geänderten Lösungsmittelkonzentrationen in der Kultur zuzuschreiben sind. Um zu unterscheiden, ob und welche Expressionsänderungen butanolbedingt sind, wurde eine kontinuierliche Kultur beim pH-Wert 5,7 (Säurephase) etabliert. Nach Erreichen des *steady-state* wurden dieser Kultur 100 mM Butanol zugesetzt (~0,9 % [v/v]) (Abb. 3.13) und der Butanoleinfluss bis zu seiner theoretischen Wiederauswaschung aus dem Chemostaten beobachtet. Es zeigte sich mit Blick auf das Produktspektrum keine signifikante Beeinträchtigung, abgesehen von einer leichten „Irritationsphase“ innerhalb der ersten 4 h nach Zugabe des Butanols. Die Butanolmenge sank exakt gemäß seiner

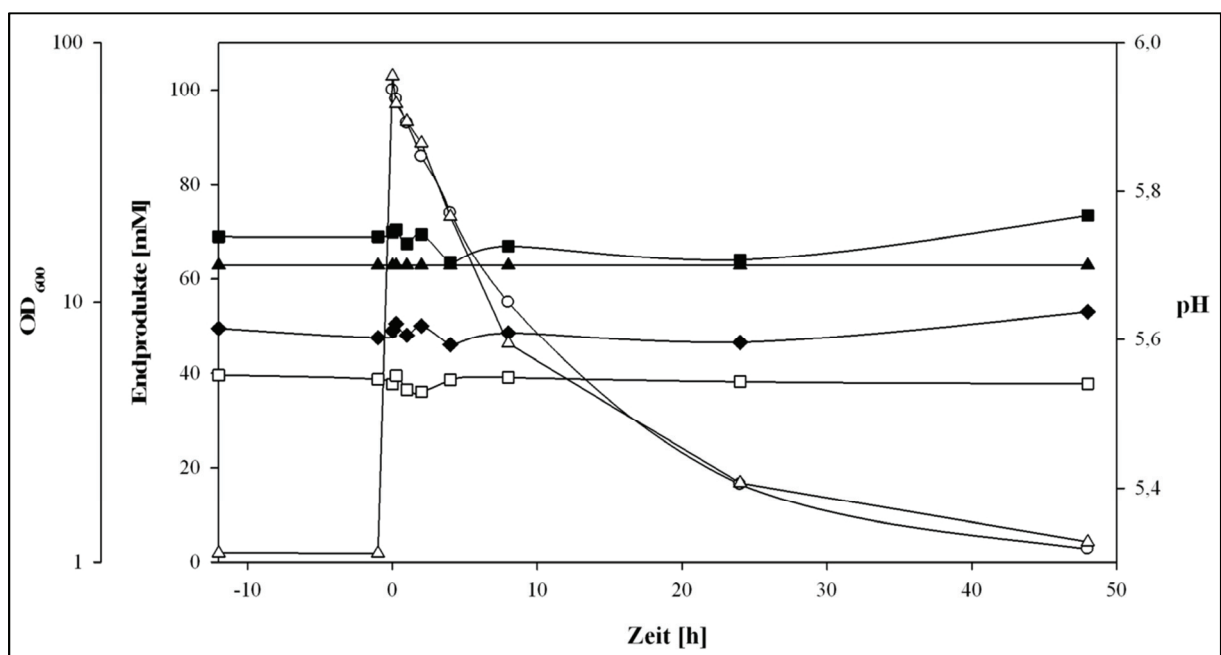


Abb. 3.13: Butanolzugabe (100 mM bei t_0) zu einer kontinuierlichen Kultur von *C. acetobutylicum* in der Säurephase bei pH 5,7. Die theoretische Kurve für die Auswaschung von Butanol (\circ) wurde nach folgender Gleichung berechnet: $f(x) = c \cdot e^{\left(\frac{-x}{v}\right)}$, wobei c die Ausgangskonzentration, x die Zuflussmenge und v das Kulturvolumen bedeuten ($D = 0,075 \text{ h}^{-1}$) (Bahl *et al.* 1982b). Dargestellt wurden ebenso Optische Dichte (\square), pH-Wert (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge) und Butanol-Konzentrationen (Δ). Proben für RNA-Isolierungen wurden 0,25 h (~97 mM Butanol), 1 h (~93 mM), 2 h (~88 mM), 4 h (~73 mM), 24 h (~16 mM) und 48 h (~4 mM) nach der Butanolzugabe (t_0) genommen.

Auswaschungskurve, ein Aufnahme- oder Verbrauchseffekt, der auf die Zellen zurückzuführen sein könnte, war nicht auffällig. Nach 4 h waren noch ~73 mM Butanol in der Kultur messbar, nach 24 h ~16 mM und nach 48 h waren nur noch sehr geringe Mengen an Butanol im Überstand der Kultur messbar (4 mM). 0,25 h, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h nach Butanolzugabe wurden der Kultur Proben zur RNA-Isolierung entnommen. Es wurden DNA Micro Arrays angefertigt und diese mit RNA der unbehandelten Kultur (pH 5,7) verglichen. So sollte aufgedeckt werden, welche Gene unter den gegebenen Bedingungen eine Beeinflussung ihrer Transkription durch das Butanol aufweisen und ob

dies kurzfristig (0,25 bis 2 h) oder langfristig (4 bis 24 h) der Fall ist. Im Fokus standen die Gene, die bekanntermaßen beim Wachstum in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) eine veränderte Expression aufwiesen (Tab. 3.7). Dadurch sollte herausgefiltert werden, welche dieser Änderungen spezifische pH- und welche Butanol-Effekte sind. Die gesamten Array Daten des Butanolstress-Experiments sind im Anhang dokumentiert (DNA Micro Array Butanolstress bei pH 5,7). Das Expressionsverhalten nach der Butanolzugabe für Gene der Stressantwort, der Glykolyse und des primären Hauptstoffwechsels (Bildung von Säuren und Lösungsmitteln) wurden graphisch in der Abb. A11 (siehe Anhang) dargestellt.

3.4.1 Untersuchung der Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5

Als erstes wurden alle 95 Gene untersucht, welche in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 eine erhöhte Transkriptmenge gegenüber der Säurephase aufwiesen (Tab. 3.7). Wenn Gene einer Kultur in der Wachstumsphase bei pH 4,5 durch das vorhandene Butanol induziert worden sind, so könnte sich diese Reaktion auch in der Phase pH 5,7 nach dem dazugegebenen Butanol widerspiegeln. Für insgesamt 84 Gene konnten unter den genutzten Filterkriterien (Hillmann *et al.*, 2009) auswertbare Ergebnisse erzielt werden. Die Gene wurden unter Anwendung der Software „Gene Spring GX“ ausgewertet (Engelmann, Vektorologie und Experimentelle Gentherapie, Universität Rostock) und in Abb. 3.14 dargestellt.

Davon zeigten 19 Gene eine signifikante Induktion und somit eine Reaktion auf das Butanol. Unter anderem gehört dazu das *sol* Operon (*cap0162-0164*) mit den Genen *adhE*, *ctfA* und *ctfB*. Allerdings konnte nur eine kurz anhaltende Erhöhung des Transkripts über die erste Stunde verzeichnet werden. Auch waren die Induktionsraten mit ~2,0-6,7-fach eher moderat, im Vergleich mit der Lösungsmittelphase (Tab. 3.7) in der das *sol* Operon eine extrem starke Erhöhung des Transkriptes von ~120-125-fach aufzeigte. Solch eine kurzfristige Reaktion auf das Butanol konnte auch für weitere Gene festgestellt werden. Wie z. B. für Gene des Stickstoffwechsels *cac0254-0256*, das „Desulfoferredoxin“ (*cac2450*), eine „Large subunit of NADH-dependent glutamate synthase“ (*cac1673*) und ein „Hypothetical protein“ (*cac3696*). Auffällig waren aber auch vereinzelte Gene, die über einen längeren Zeitraum (bis zu 24 h) eine stärkere Induktion zeigten (bis zu ~11,5-fach). Dazu gehört u. a. ein „Membrane protein“ (*cap0102*), wobei das Gen bis 24 h nach der Butanolzugabe eine Induktion von ~2,9-11,5-fach zeigte. Auch die Gene einer „Glycerol-3-phosphate dehydrogenase“ (*cac1322*) und einer „NAD(FAD)-dependent dehydrogenase“ (*cac1323*) zeigten bis 24 h nach Butanolzugabe erhöhte Transkriptmengen von ~2,0-10,8-fach. Das Gen der „Permease, MDR related“ (*cap0128*) zeigte eine starke Induktion bis 4 h (Butanolmenge bei ~73 mM) (~4,7-10,9-fach), wobei nach 24 h (Butanolmenge bei ~16 mM) diese Induktion nicht mehr nachweisbar war. Insgesamt ist aber zu vermerken, dass der überwiegende Teil der aufgelisteten Gene nach der Applikation von 100 mM Butanol keine signifikanten Veränderungen im Transkriptmuster zeigten.

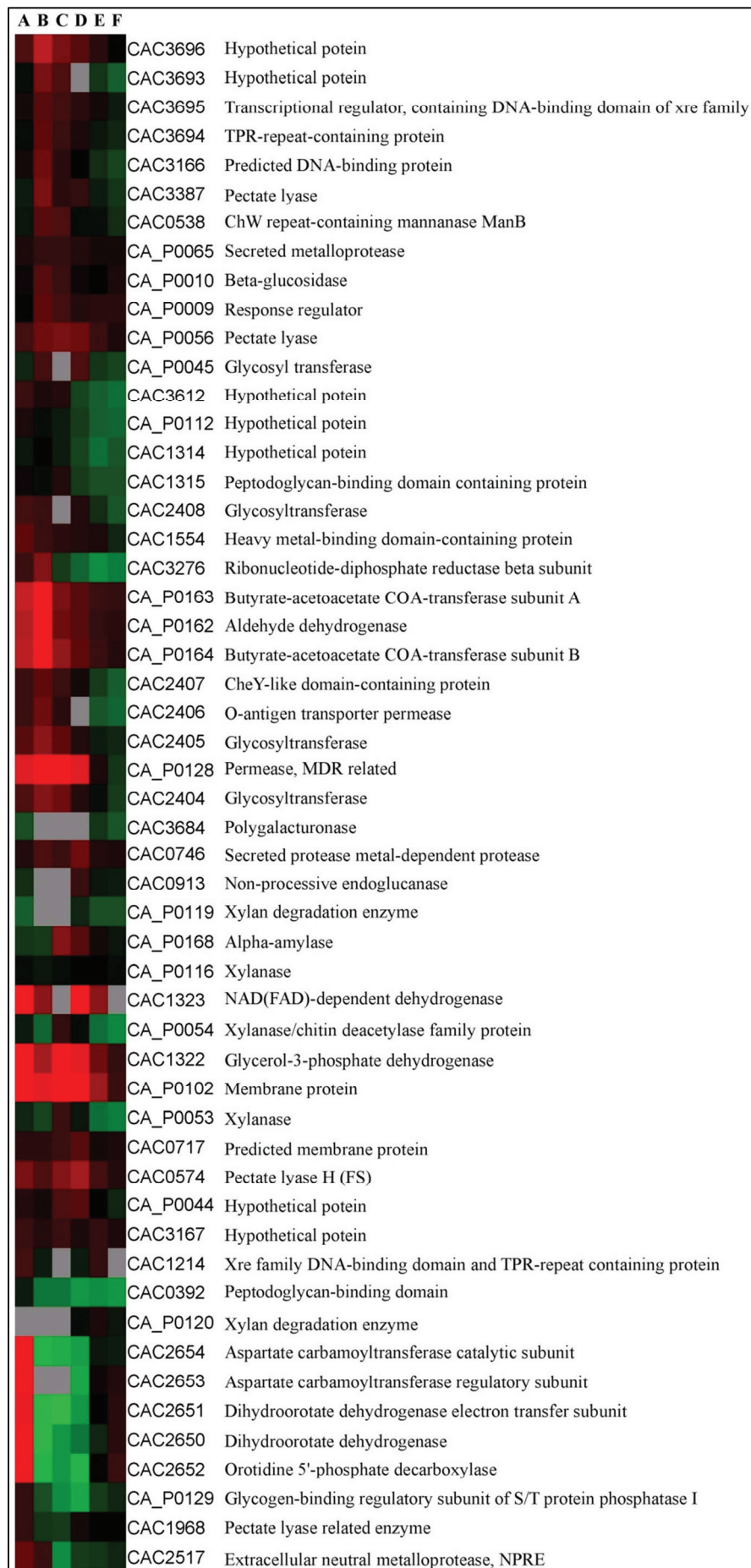


Abb. 3.14: Fortsetzung der Abbildung Siehe Folgeseite

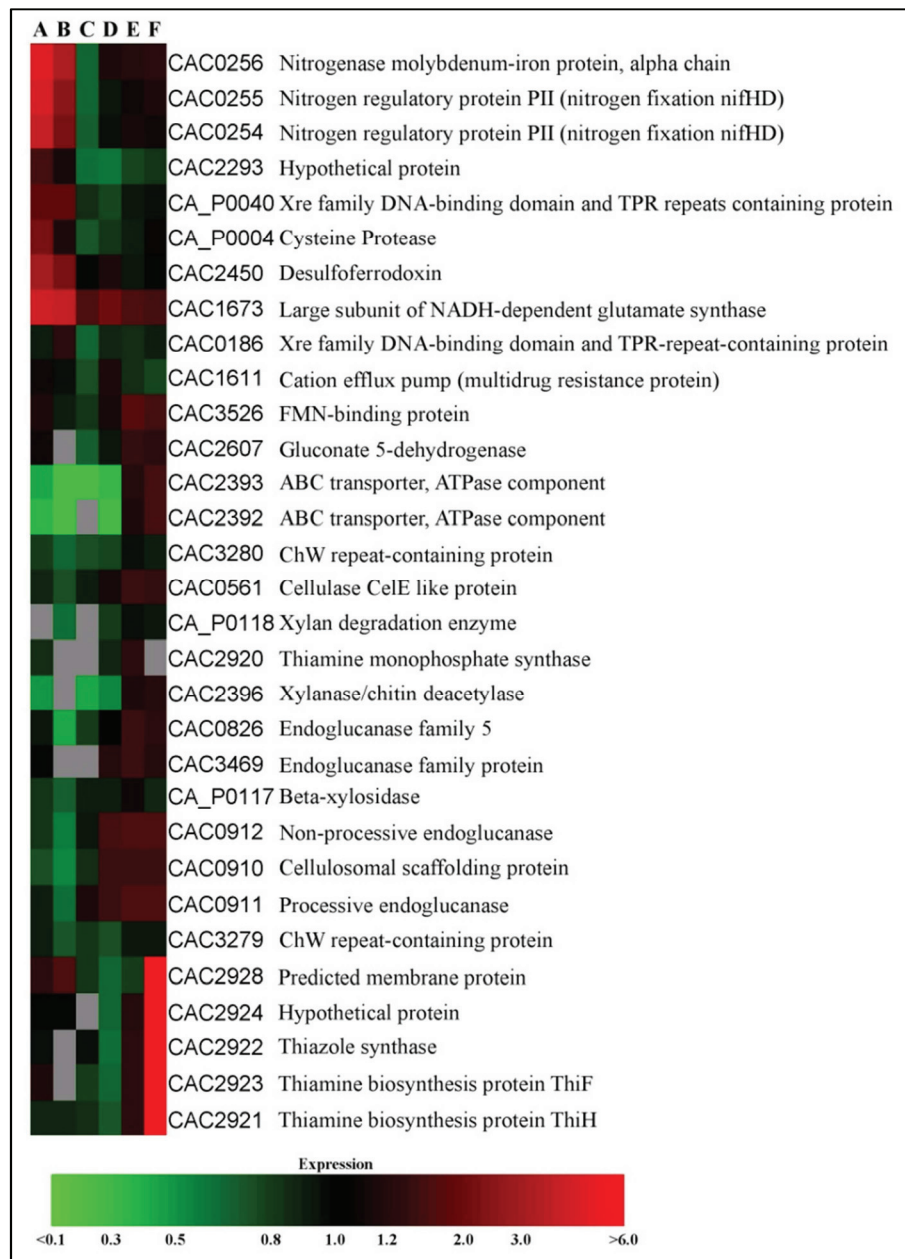


Abb. 3.14: Expressionsprofile von Genen mit erhöhter Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) (Siehe Tab. 3.7) nach Butanolapplikation beim *steady state*-Wachstum bei pH 5,7. Die RNA aller Zeitpunkte nach Butanolzugabe (A: 0,25 h; B: 1 h; C: 2 h; D: 4 h; E: 24 h; F: 48 h) wurde mit der Referenz-RNA des unbehandelten pH-Wertes 5,7 hybridisiert. Die Expressionswerte $\geq 3,0$ gelten als signifikant induziert (rot) und $\leq 0,33$ als signifikant reprimiert (grün) zu den untersuchten Zeitpunkten (A-F) nach Butanolzugabe zur verglichenen pH-Stufe 5,7. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund der gewählten Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden.

3.4.2 Untersuchung der Gene mit signifikant erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase bei pH 5,7

Analog zu den untersuchten Genen mit erhöhter Transkriptmenge bei pH 4,5, wurden demzufolge ebenso die Gene mit erhöhter Transkriptmenge bei pH 5,7 (Tab. 3.6) nach einer Butanolzugabe genauer charakterisiert (Abb. 3.15). Gene die in der Säurephase eine erhöhte Transkriptmenge aufwiesen, waren im Umkehrschluss in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 reprimiert. Somit kann

man anhand der 52 Gene herausarbeiten, welche durch Butanol- oder pH-Effekte gehemmt werden. Die Gene wurden unter Anwendung der Software „Gene Spring GX“ ausgewertet (Engelmann, Vektorologie und Experimentelle Gentherapie, Universität Rostock) und in Abb. 3.15 dargestellt.

Insgesamt zeigten 25 dieser Gene eine signifikante Verringerung der Transkription nach Zugabe des Butanols. Besonders fällt auf, dass diese Gene nach 24 h wieder ähnliche Transkriptmengen wie in der unbehandelten Säurephase pH 5,7 zeigen. Nach 24 h sind nur noch ~16 mM Butanol in der Kultur vorhanden. Somit ist zu erkennen, dass die Transkription dieser Gene eindeutig durch erhöhte Mengen an Butanol gehemmt wird. Dazu gehören unter anderem Gene eines putativen Operons, welches für ein „Glycerol-3-phosphate ABC-transporter“ (*cac0427-0430*) kodiert. Dieses Operon weist eine bis zu ~250-fache Verminderung des Transkriptes nach 2 h (~88 mM Butanol) der Butanolapplikation auf. Eine ~12,5-fache Repression konnte auch für ein putatives Operon mit unbekannter Funktion gemessen werden (*cac1702-1704*). Die Gene kodieren für „Hypothetical proteins“ (*cac1702*, *cac1704*) und ein „Methyl-accepting chemotaxis protein“ (*cac1703*) und sind eingebettet zwischen dem *phoPR*- und *pstS*-Operon von *C. acetobutylicum* (Fiedler *et al.*, 2008). Interessanterweise sind diese Transkriptionseinheiten ebenfalls durch die Butanolzugabe signifikant verringert, bis zu ~180-fach nach 2 h Butanolapplikation (siehe Anhang DNA Micro Array Butanolstress bei pH 5,7). Ebenso konnten in Abb. 3.15 zwei weitere Gene hypothetischer Proteine (*cac3379*, *cac2938*) mindestens 4 h signifikant reprimiert gemessen werden. Auch eine „Predicted P-loop ATPase“ (*cac1583*), ein „Phosphatase domain-containing protein“ (*cac0742*), ein „ComE-like protein“ (*cac0946*) und ein Operon eines putativen Zucker ABC-Transporters (*cac3237-3236*) zeigten eine länger anhaltende (4 h) signifikante Verringerung ihrer Transkripte durch das dazugegebene Butanol. Weitere Gene wurden nur für eine kurze Zeit reprimiert (1 h), trotz weiterhin erhöhter Mengen an Butanol im Medium (nach 4 h noch ~73 mM). Zu einem Gene, die für „Hypothetical proteins“ (*cac0411*, *cap0072*, *cap0074*) und Untereinheiten von ABC-Transportern kodieren (*cap0073*, *cac0164*). Eine weitere Gruppe von Genen wies hingegen erst nach einer gewissen Wirkdauer oder einer spezifischen Konzentration des Butanols (2-48 h) eine signifikante Repression der Transkription auf. Das Gen *cac0029* („Distantly related to cell wall-associated hydrolase“) und das Operon *cac1547-1548* („Thioredoxin“, *trxA*; „Thioredoxin reductase“, *trxB*) wurden erst nach 4 h zum ersten und einzigen Mal signifikant reprimiert.

Die Untersuchung der Gene des primären Stoffwechsels, die „Butyrate kinase“ (*buk*, *cac3075*), die „Phosphate butyryltransferase“ (*ptb*, *cac3076*), die „Electron transfer flavoprotein alpha-subunit“ (*etfA*, *cac2709*), die „Butyryl-CoA dehydrogenase“ (*cac2711*, *bcd*) und die „Enoyl-CoA hydratase“ (*cac2712*, *crt*) zeigte keine Veränderung in ihrer Transkription durch das Butanol. Auch das in der Säurephase stark exprimierte Operon *cap0037-0036* zeigte keine Transkriptionsveränderung durch Butanolzugabe.

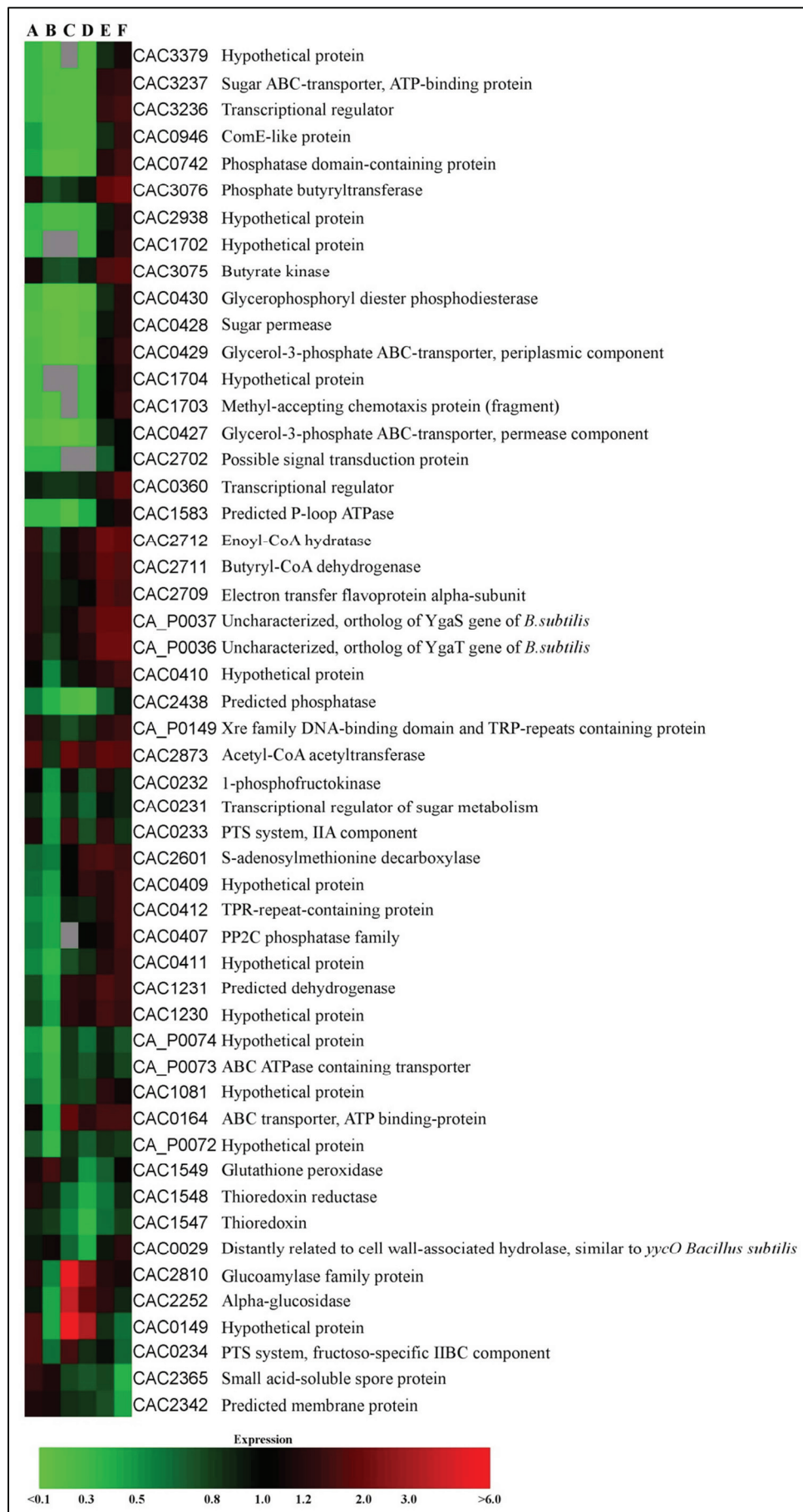


Abb. 3.15: Expressionsprofile von Genen mit erhöhter Transkriptmenge in der Säurephase (pH 5,7) (Siehe Tab. 3.6) nach Butanolapplikation beim *steady state*-Wachstum bei pH 5,7. Erklärung der Legende Siehe Abb. 3.14.

3.4.3 Gene mit Transkriptionserhöhung durch Butanol

Gemäß den Filterkriterien für die Auswertung der DNA Micro Arrays (Hillmann *et al.*, 2009) wiesen 235 Gene von untersuchten 2780 Genen innerhalb der ersten 2 h eine signifikante Reaktion in Form einer Transkriptionserhöhung auf (siehe Anhang DNA Micro Array Butanolstress bei pH 5,7). Eine Übersicht über das Transkriptionsverhältnis der Gene in Abhängigkeit zum Zeitverlauf nach der Butanolapplikation ist in Abb. 3.16 anhand eines Venn-Diagramms erläutert. Neben den bereits erwähnten Genen (3.4.1; Abb. 3.14), konnten weitere Gene die eine Induktion der Transkription durch Butanol aufzeigten, aufgelistet werden (Siehe Anhang, Abb. A12). Für 20 Gene war eine sofortige

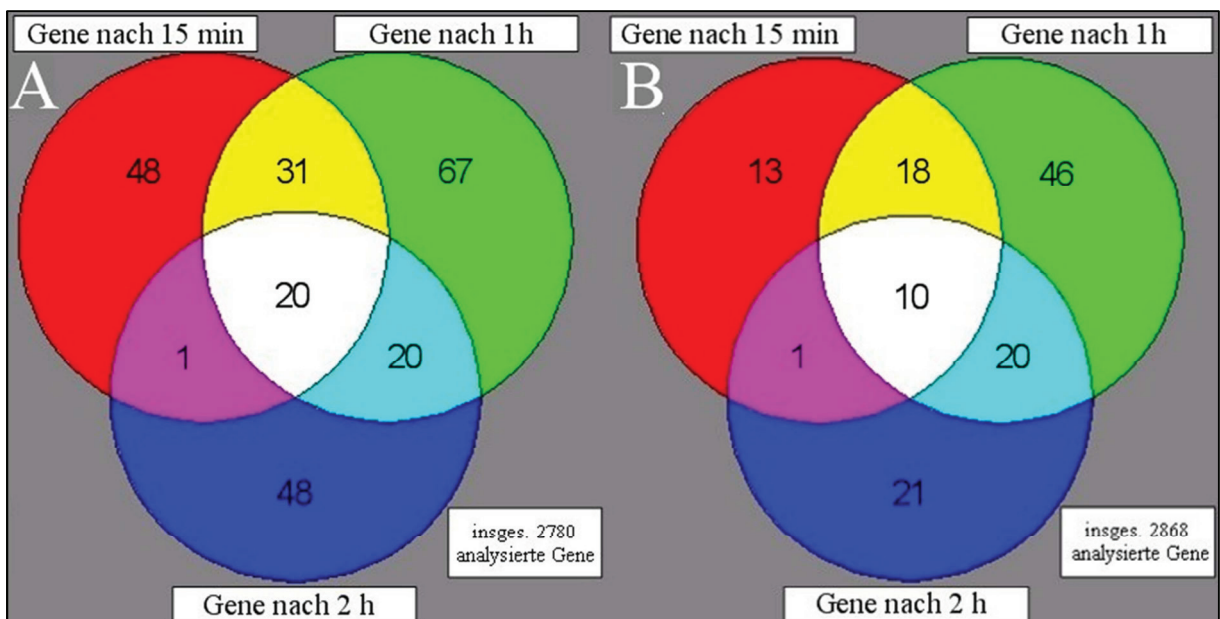


Abb. 3.16: Venn-Diagramme zur Auswertung der Genexpression für die ersten 2 Stunden nach der Butanolzugabe. A) Anzahl der Gene dessen Transkriptmenge nach der Butanolzugabe erhöht worden ist. B) Anzahl der Gene dessen Transkriptmenge nach der Butanolzugabe verringert worden ist.

„positive“ Reaktion auf das Butanol innerhalb von 15 min messbar und die auch über einen längeren Zeitraum anhielt (2-4 h) (Abb. 3.16 A, „weißer Bereich“). Erst als Butanol nur noch in geringeren Mengen gemessen werden konnte (24 h, ~16 mM Butanol) waren keine Transkriptionserhöhung mehr nachweisbar. Für diese Gene konnte also eine direkte Korrelation zwischen Butanolkonzentration und Induktion der Transkription festgestellt werden. Solche Gene und dessen Produkte sind vor allem in die Stressantwort der Zelle involviert, wie z. B. *hsp18* (*cac3714*) (Sauer und Dürre, 1993) oder das Stress-Operon *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* (*cac1280-1283*) (Narberhaus *et al.*, 1992). Eine länger anhaltende Reaktion auf das Butanol zeigten aber auch „Glycosyltransferasen“ (*cac2536*, *cac3015*), eine „Beta-glucosidase“ (*cac1405*), das *adhE2*-Gen (*cap0035*), eine „Predicted phosphatase“ (*cac2537*) und eine „Ribosomal protein L11 methyltransferase“ (*prmA*, *cac1284*). Ebenfalls sei zu erwähnen, dass 48 Gene nur eine kurzfristige Induktion in ihrer Transkription aufwiesen (nach 15 min) (Abb. 3.16 A, „roter Bereich“). Unter diesen Genen sind „Transcriptional regulators“ (*cac3192*, *cap0108*, *cac1032*) und Gene die in der O₂-Antwort der Zelle eine Rolle spielen, wie z. B.

eine „NAD(FAD)-dependent dehydrogenase“ und ein „Predicted Flavoprotein“ (*cac2448-2449*), ein „Rubredoxin“ (*cac2778*) und eine „NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase“ (*cac3657*) (Hillman *et al.*, 2009). Aber auch für das Stress-Gen *htpG* (*cac3315*) konnte nur eine kurzfristige Reaktion auf das Butanol festgestellt werden. Über 130 Gene waren zu verzeichnen dessen Transkription verzögert (nach 1-2 h) zu der Butanolzugabe signifikant anstieg (Abb. 3.16 A ,grüner, hellblauer und blauer Bereich‘). Darunter sind Gene dessen Proteine unterschiedlichste Funktionen aufweisen oder dessen Funktion unbekannt ist. Unter anderem „Hypothetical proteins“ (*cac1034*, *cac3599*), ein „Uncharacterized protein“ (*cac0787*), eine „Exinuclease“ (*cac0503*), ebenfalls ein „Transcriptional regulator“ (*cac0162*) und eine „Predicted acetyltransferase“ (*cac2487*). Besonders auffällig unter den insgesamt 235 Genen war die hohe Anzahl, die für Membranproteine, Permeasen oder Proteine von ABC-Transportern kodieren. Mehr als 40 Gene dieser Kategorie konnten dokumentiert werden, die innerhalb der ersten 4 h nach der Butanolapplikation signifikant induziert worden sind. Darunter ist ein Operon für ein „Oligopeptide ABC-Transporter“ (*oppB-oppC-oppD-oppF*, *cac3631-3628*), für ein „Proline/glycine betain ABC-Transporter“ (*cac2850-2849*), für zwei „ABC-type multidrug transport systems“ (*cac0861-0863*, *cac0866-0868*), ein „Na⁺ ABC transporter“ (*natA-natB*, *cac3551-3550*) oder auch ein „Glutamine ABC transporter“ (*cac0111-0112*). Ebenso wurden viele Gene induziert dessen Produkte Membranproteine sind, wie z. B. die putativen Operons *cac0563-0562* und *cac1586-1587*, oder die Gene *cac3696*, das bereits zuvor erwähnte Gen *cap0102*, *cac3658* und *cac0092*. Auch klassische Permeasen waren signifikant durch Butanol induziert worden, u. a. *fhuB* (*cac0789*), *cap0128*, *cac3584-3583* und *cac2753*.

3.4.4 Gene mit Transkriptionsverringerng durch Butanol

Basierend auf den bereits zuvor erwähnten Filterkriterien wiesen 129 Gene von insgesamt 2868 analysierten Genen, innerhalb der ersten 2 h nach der Butanolapplikation, eine signifikante Transkriptionsverringerng auf (siehe Anhang DNA Micro Array Butanolstress bei pH 5,7). Damit sind etwa halb so viele Gene durch das Butanol in ihrer Transkriptmenge gemindert, wie Transkripte von Genen erhöht worden sind (3.4.3, Abb. 3.16). Neben den bereits dokumentierten Genen (3.4.2, Abb. 3.15), wurden weitere reprimierte Gene aufgelistet (siehe Anhang, Abb. A13).

Insgesamt konnten nur 10 Gene dokumentiert werden, dessen Transkription kurzfristig (nach 15 min) und gleichzeitig langanhaltend (nach mind. 2 h) signifikant gemindert wurde (Abb. 3.16 B ,weißer Bereich‘). Darunter ist ein Operon für einen „Glycerol-3-phosphate ABC transporter“ (*cac0427-0430*), eine „Predicted P-loop ATPase“ (*cac1583*), eine „Predicted permease“ (*cac2743*), ein Operon für einen „Multiple sugar-binding ABC transporter“ (*cac3237-3236*) und ein „Uncharacterized protein“ (*cac3379*). Dagegen wiesen 13 Gene nur eine kurzfristige Repression für 15 min auf (Abb. 3.16 B ,roter Bereich‘), wie z. B. ein „Predicted flavodoxin“ (*cac3664*) oder eine „Alpha/beta superfamily hydrolase“ (*cac3665*). Insgesamt 66 Gene wurden erst nach einer Stunde bis zu mindestens 2 h reprimiert (Abb. 3.16 B ,grüner und hellblauer Bereich‘). Zu diesen Genen, gehören u. a. Gene der Glykolyse *eno* (*cac0713*) und *pgm* (*cac0712*), eine „Predicted acetyltransferase“ (*cac2840*), eine

„Predicted phosphohydrolase“ (*cac0205*), ein „Membrane protein“ (*cac0352*), das „Carbon starvation protein“ (*cstA*, *cac1669*), das *phoPR*- und *pstS*-Operon (Fiedler *et al.*, 2008) und das in die Sporulation involvierte Operon *dnaG-sigA* (*cac1299-1300*). Interessanterweise wiesen 21 Gene sogar erst nach 2 h eine signifikante Repression ihrer Transkriptmenge auf (Abb. 3.16 **B** ‚blauer Bereich‘). Diese Gene wurden somit durch die längere Wirkung des Butanols reprimiert, wie z. B. ein putatives Operon des Cobalaminstoffwechsels (*cac1368-1386*) oder die Gene *hema* (*cac0095*) und *hemW* (*cac0096*) (siehe Anhang DNA Micro Array Butanolstress bei pH 5,7).

3.5 Analyse der *cap0036_Int* Mutation von *C. acetobutylicum*

Ein bedeutendes Ergebnis dieser Arbeit ist die Entdeckung des pH-abhängigen Auftretens der *cap0037-0036* Genprodukte als absolut hervorstechende Proteinspots säurebildender Zellen in einem Chemostaten bei pH 5,7 (3.2.2, Tab. 3.3). Deren Proteinmengen werden anscheinend maßgeblich durch die hohen Transkriptionsraten in der Säurephase getragen (3.3.2, Tab. 3.6). Im Vergleich dazu konnte das Transkript des Operons über den Verlauf des Wachstums in einer statischen Kultur immunologisch mittels Northern Blot Analyse (2.9.7.2) nicht nachgewiesen werden. Lediglich ein RNA-Abbauprodukt vom ca. 1400 Bp großem Operon konnte in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden (Siehe Anhang Abb. A14).

Da es über die biochemischen Funktionen beider Proteine bisher keinerlei Erkenntnisse gab, war es naheliegend zu untersuchen, welche Auswirkungen eine gezielte Defektmutation der Proteine auf das Wachstum im Chemostaten haben würde. Als im Rahmen von COSMIC-Projektbesprechungen (Wageningen, Sept. 2009) das Vorhaben der Generierung von Defektmutationen vorgestellt wurde, stellte sich heraus, dass derartige Versuche bereits im Rahmen einer anderen Fragestellung von einem Projektpartner durchgeführt waren („unpublished data“, S. Linder, Prof. P. Dürre, Universität Ulm). Trotz wiederholter Versuche war es dem Projektpartner lediglich möglich eine Insertionsmutante des Gens *cap0036* zu generieren. Diesen Stamm *cap0036_Int*, mit einer etwa 1800 Bp großen Erythromycin-Resistenzkassette im Gen, wurde freundlicherweise im Rahmen von COSMIC-Projekt durch Frau Linder zur Verfügung gestellt. Es galt eine „Master“-Fermentation durchzuführen mit einer ebenso detaillierten Untersuchung wie beim Wildtypstamm des Proteom und Transkriptom, zur Gewinnung direkt vergleichbarer Daten und einer möglichen Beschreibung eines Phänotyps.

3.5.1 „Master“-Fermentation und Wachstum im Batch-Verfahren

Das Wachstum der Mutante *cap0036_Int* wurde in einem Chemostaten (2.7) unter standardisierten Bedingungen nach Janssen *et al.* (2010) untersucht. Allerdings erfolgte die Inokulation der ersten Vorkultur (2.7.1) unter Zugabe von Erythromycin (2.3.2). Während der Fermentation der Mutante *cap0036_Int* über 10 Tage hinweg, wurde auf die Zugabe von Erythromycin verzichtet. Dadurch wurde eine potentielle Beeinflussung des Wachstums der Mutante durch das Antibiotikum, im Vergleich zum Wildtyp, ausgeschlossen. Um einen möglichen phänotypischen Effekt der Mutation auf

den Metabolismus des Organismus detektieren zu können, wurden die *steady state* pH-Werte 5,7 für die Säurephase und 4,5 für die Lösungsmittelphase untersucht. Das Wachstumsverhalten von *cap0036_Int* war im Vergleich zum Wildtyp (Siehe Abb. 3.1) identisch. Es konnten weder in der Säurephase noch in der Lösungsmittelphase auffällige Veränderungen im Produktspektrum oder im Verhalten der Optischen Dichte nachgewiesen werden. Die Mutante produzierte bei pH 5,7 (2 Fermentationen) die Säuren Butyrat (~59 mM) und Acetat (~46 mM) und nach dem Wechsel des pH-Wertes auf 4,5 hauptsächlich die Lösungsmittel Butanol (~37 mM) und Aceton (~24 mM) (Tab. 3.8). Das kontinuierliche Wachstum der Mutante *cap0036_Int* ist exemplarisch im Anhang (Abb. A15) dargestellt.

Tabelle 3.8: Überblick über Fermentationsprodukte des Wildtyps von *C. acetobutylicum* und der Mutante *cap0036_Int* in einer kontinuierlichen Kultur. Gezeigt sind die Konzentrationen der Fermentationsprodukte in mM im *steady state*-Wachstum in der Säure- und Lösungsmittelphase.

Produkte [mM]	Säurephase bei pH 5,7		Lösungsmittelphase bei pH 4,5	
	Wildtyp	<i>cap0036_Int</i>	Wildtyp	<i>cap0036_Int</i>
Ethanol	3,9	3,7	5,9	5,3
Acetat	42	46	13	15
Butyrat	68	59	6,2	8,5
Aceton	3,4	0,6	31	24
Butanol	0,4	1,5	40	37

Zusätzlich zur Durchführung einer kontinuierlichen Kultur wurde das Wachstum der Mutante *cap0036_Int* ebenfalls in einer Batch-Kultur (2.5) untersucht und zum Wildtyp verglichen. In Abb. 3.17 wurden das reproduzierbare Wachstum (3 Versuche) und die entstandenen Fermentationsprodukte beider Kulturen aufgetragen. Dabei ist zu erwähnen, dass das Wachstum der Mutante *cap0036_Int* ohne Zugabe von Erythromycin erfolgte. Wie bereits in der Vorbereitung für eine kontinuierliche Kultur, erfolgte nur bei der Inokulation der ersten Vorkultur (2.7.1) eine Zugabe von Erythromycin (2.3.2). Beide Hauptkulturen wiesen nur eine kurze *lag*-Phase von 8 h auf und waren bereits nach 16 h in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase. Zu diesem Zeitpunkt waren in beiden Kulturen noch die Säuren Acetat und Butyrat die hauptsächlichen Fermentationsprodukte. Beide Kulturen erreichten nach ca. 25 h die Transitionsphase und begannen mit der Umstellung der Fermentationsprodukte von Säuren zu Lösungsmitteln. Nach 35 h waren beide Kulturen in der frühen stationären Wachstumsphase. Ab diesem Zeitpunkt war ersichtlich, dass die Mutante *cap0036_Int* erheblich früher signifikante Mengen an Butanol und Aceton produzierte. Während im Wildtyp ~22 mM Aceton und ~25 mM Butanol messbar waren, konnten zum gleichen Zeitpunkt in der Mutante ~34 mM Aceton und ~40 mM Butanol nachgewiesen werden. Noch deutlichere Unterschiede waren nach 66 h Wachstum zu erkennen. Der Wildtyp (OD₆₀₀: 3,9) enthielt ~51 mM Aceton und

~69 mM Butanol. Die Mutante mit einer ähnlichen optischen Dichte (OD_{600} : 4,1) zum gleichen Zeitpunkt, wies sogar ~87 mM Aceton und ~143 mM Butanol auf. Erst zum Ende des Wachstums (nach 132 h) wiesen beide Kulturen wieder identische Mengen an Aceton (~100 mM) und Butanol (~175 mM) auf. Wobei der Wildtyp am Ende des Wachstums eine signifikant höhere optische Dichte (OD_{600} : 4,7) gegenüber der Mutante (OD_{600} : 2,4) aufwies.

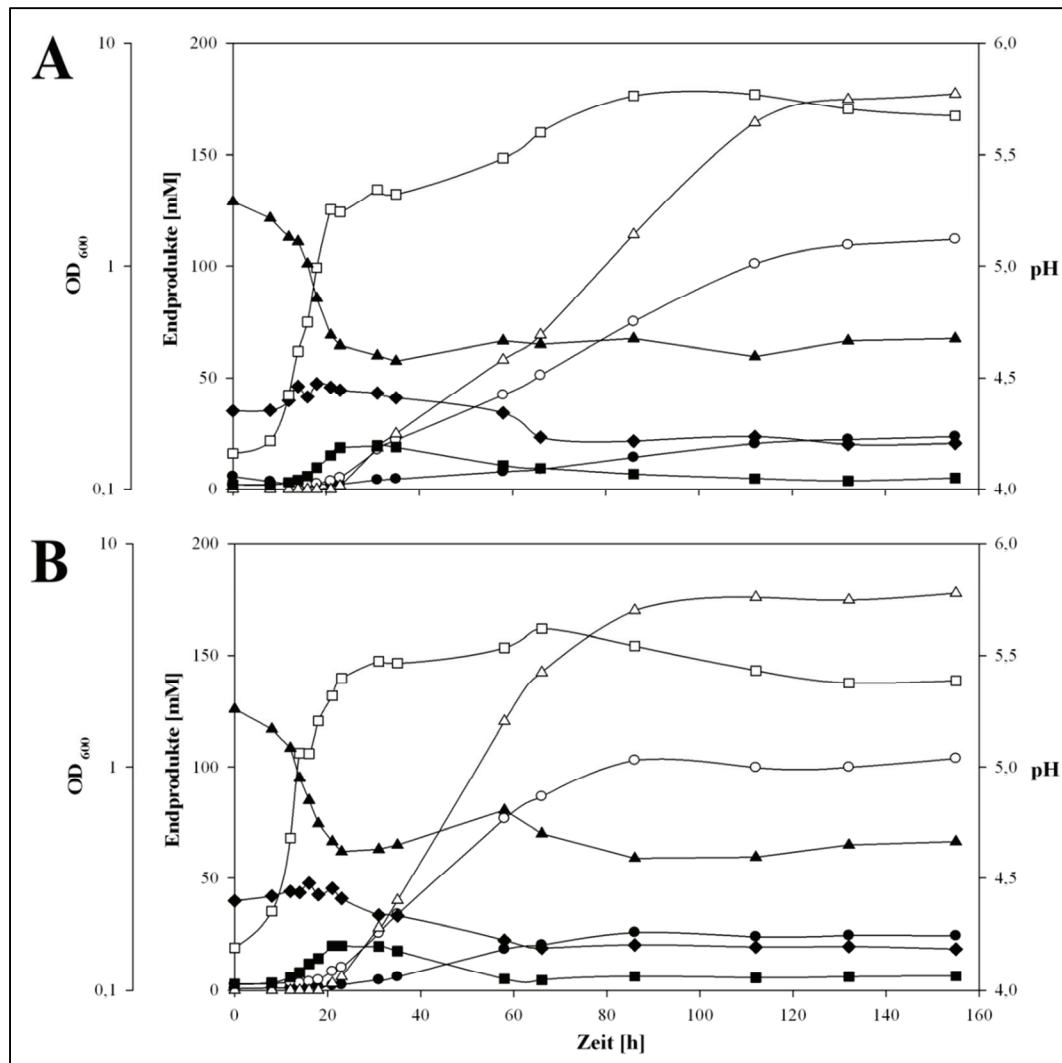


Abbildung 3.17: Vergleich des Wachstums und der Fermentationsprodukte zwischen (A) Wildtyp und (B) Mutante *cap0036_Int* in einer 200 ml-MS-MES-Kultur über 160 h. Optische Dichte (\square), pH (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge), Butanol (\triangle), Aceton (\circ), und Ethanol (\bullet).

3.5.2 Stabilität der Mutation (*cap0036_Int*)

Aufgrund der Tatsache, dass während des kontinuierlichen Wachstums (siehe Anhang Abb. A15) kein Erythromycin als Selektionsmarker verwendet wurde, sollte während der Fermentation über 10 Tage die Resistenzkassette im Gen *cap0036* nachgewiesen werden. Dazu wurde in regelmäßigen Abständen während der Fermentation Zellmaterial gewonnen und DNA isoliert (2.9.1). Um die Stabilität der Mutation nachzuweisen, wurde eine High Fidelity-PCR mit (2.9.3.3) (100 ng Template-DNA) gegen das Gen *cap0036* durchgeführt mit dafür spezifischen Primern (Tab. 2.2), die außerhalb des Gens

liegen. Das Gen *cap0036* ist 729 Bp groß und wird durch die Resistenzkassette um 1780 Bp vergrößert (Abb. 3.18).

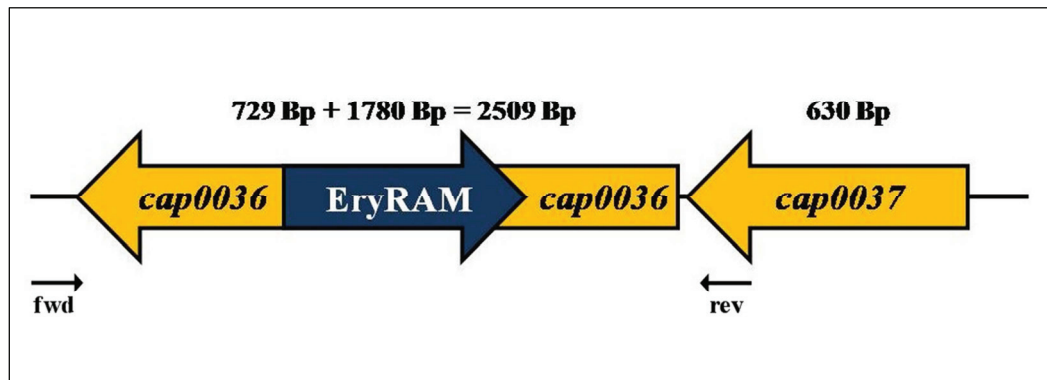


Abbildung 3.18: Relative Lage des *cap0037-0036* Operons und dazugehörige Basenpaargröße (Bp) der einzelnen Gene. Die relative Lage der verwendeten Primer (fwd - forward; rev - reverse) ist angedeutet. EryRAM - Erythromycin-Resistenzkassette (1780 Bp).

Durch die Verwendung von Primern die außerhalb des Gens *cap0036* binden, wurde für die Mutante ein Fragment von 2661 Bp erwartet (Abb. 3.18), das Wildtypamplifikat hingegen sollte 881 Bp umfassen. Die PCR-Ergebnisse über den Fermentationsverlauf sind in Abb. 3.19 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Resistenzkassette über 10 Tage hinweg stabil in der Mutante *cap0036_Int* vorhanden war und keinerlei Wildtypbande nachzuweisen war. Dadurch wurde zum ersten Mal die Stabilität des ClosTron[®]-Mutationsverfahrens über den gewählten Zeitraum von 10 Tagen aufgezeigt.

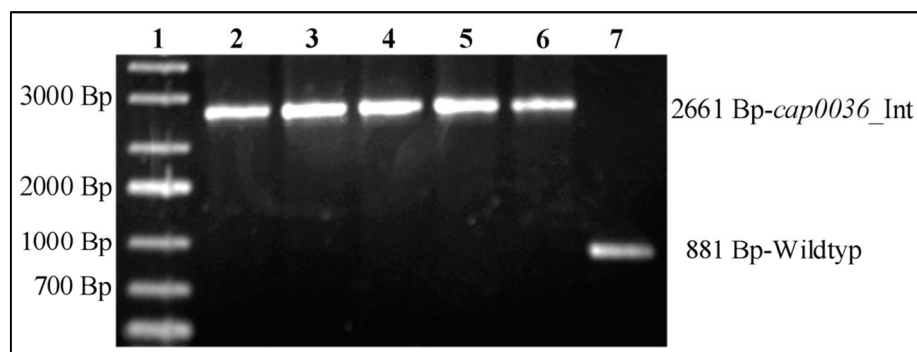


Abbildung 3.19: Nachweis der Stabilität der Mutation im Gen *cap0036* über den Wachstumsverlauf in einer kontinuierlichen Kultur von 10 Tagen mittels High-Fidelity PCR. Das zu amplifizierende Fragment der Mutante *cap0036_Int* sollte 2661 Bp aufweisen, und das Wildtyp-Fragment 881 Bp. 1: 1 kDa DNA Marker; 2: Tag 1; 3: Tag 2; 4: Tag 4; 5: Tag 6; 6: Tag 10; 7: Wildtyp-Kontrolle

3.5.3 Mutante *cap0036_Int*: Proteomanalysen

In Analogie zur „Master“-Fermentation erfolgten standardisierte Proteomanalysen der cytosolischen Proteine von Zellen der Säure- (pH 5,7) und Lösungsmittelphase (pH 4,5). Die Proteomdaten der Mutante *cap0036_Int* (Siehe Anhang, Abb. A16 und A17) wurden dann jeweils mit den bereits vorliegenden Proteomdaten des Wildtyps verglichen. Prinzipiell galt die Funktionalität der Integration

zu Überprüfen, d. h. inwieweit ist CAP0036 noch vorhanden bzw. wirkt sich die Integration auf das stromabwärts gelegene Gen des Operon und somit auch auf das Protein CAP0037 aus. Darüber hinaus wurde das Proteom auch nach weiteren ausbleibenden oder neu auftretenden Proteinspots untersucht. Neu auftretende Proteine wurden manuell gepickt und nachträglich massenspektrometrisch, wie unter 2.10.6 beschrieben, analysiert.

3.5.3.1 Proteom Wildtyp vs. *cap0036_Int*: Säurephase (pH 5,7)

Um die Proteinmengen der Säurephasen bei pH 5,7 der einzelnen Stämme untereinander quantifizieren zu können, wurden je 2 Gele von 2 unabhängigen Experimenten für die Analyse herangezogen. Nur Veränderungen in der Spotintensität um den Faktor 2 wurden als signifikant erachtet und dokumentiert (Tab. 3.9). Insgesamt konnten 4 verschiedene Proteine identifiziert werden, die im Wildtypproteom eine erhöhte Proteinmenge im Vergleich zum *cap0036_Int*-Proteom aufwiesen. Wie zu erwarten war, wurde das CAP0036-Protein ausschließlich im Wildtyp detektiert, wohingegen es in der Mutante aufgrund der eingeführten Integration in das *cap0036*-Gen nicht mehr nachgewiesen wurde. Darüber hinaus konnte interessanterweise auch keinerlei Protein CAP0037 in der Säurephase der Mutante detektiert werden. Dieses Ergebnis war überraschend, da das kodierende Gen von CAP0037 das erste im *cap0037-0036* Operon ist (Abb. 3.18). Damit konnte zum ersten Mal ein funktioneller Doppel-Knock-Out in einer Clostron[®]-Mutante auf Proteinebene nachgewiesen werden. Als Ursache dafür bestätigten DNA Micro Array Analysen, dass vollständige Fehlen des mRNA-Transkripts des Operon *cap0037-0036* (3.5.4.1, Abb. 3.20, siehe Anhang: DNA Micro Array *cap0036_Int* vs. Wildtyp).

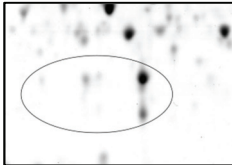
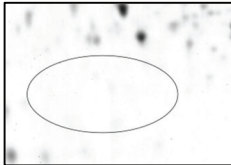
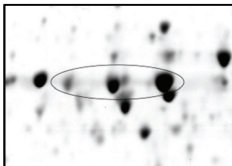
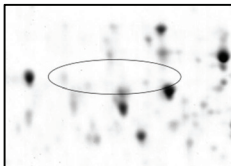
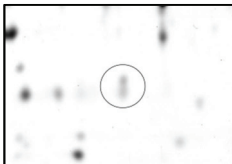
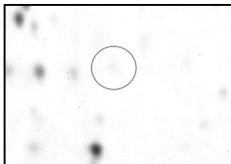
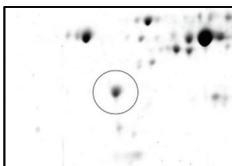
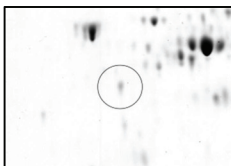
Von der Mutation beeinträchtigt zeigte sich darüber hinaus das Protein Flagellin (CAC2203; FlaC oder Hag), welches ein deutlich stärkeres Auftreten im Wildtyp erkennen ließ. Ebenso konnte eine zusätzliche Variante des Rubrerythrins (CAC3597) nur im Wildtyp identifiziert werden, wohingegen andere Proteinspots des gleichen Rubrerythrins in beiden Stämmen auftraten. Diese Variante zeigte durch einen höheren *pI* eine horizontale Spotverschiebung auf, wobei das Molekulargewicht im Vergleich zu den anderen Varianten gleich war. Aufgrund seiner Funktion als Stressprotein unter aeroben Wachstumsbedingungen (May *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2004), welche in diesem experimentellem Ansatz keine Anwendung fanden, war dieses Ergebnis nicht erwartet worden.

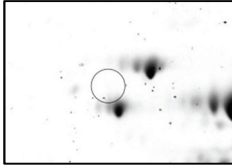
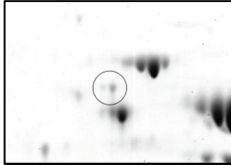
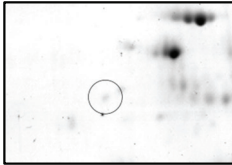
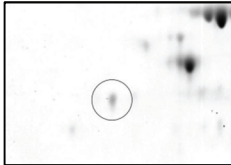
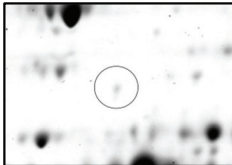
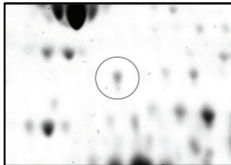
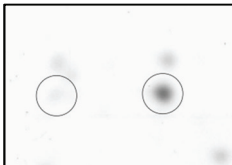
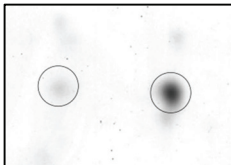
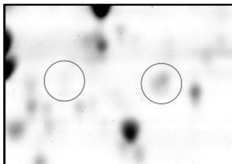
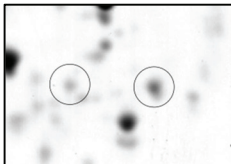
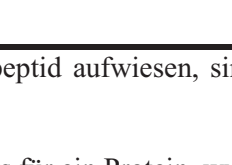
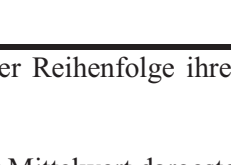
Demgegenüber ließen sich in der Säurephase der Mutante *cap0036_Int* bei pH 5,7 5 Proteinspots mit erhöhter Intensität im Vergleich zum Wildtyp nachweisen (Tab. 3.9). Auffällig ist das Protein CAC2903, welches als „LysM domain containing membrane protein“ annotiert ist und ausschließlich in der Mutante auftrat. Proteine mit einer LysM (Lysin-Motif)-Domäne sind dafür bekannt, dass sie Peptidoglykan binden und am Abbau der bakteriellen Zellwand beteiligt sind (Joris *et al.*, 1992; Bateman and Bycroft, 2000).

Ein weiterer Proteinspot mit einer signifikant erhöhten Intensität (~5,7-fach), wies zwei Polypeptide auf (i) „Protein containing cell adhesion domain“ (CAC3086) und (ii) „TPR-repeat-containing protein“ (CAC3085). Interessanterweise trat dieser Proteinspot bereits beim Wildtyp in der

Lösungsmittelphase (pH 4,5), im Vergleich zur Säurephase (pH 5,7), stärker in Erscheinung (Tab. 3.4). Die Lösungsmittelphase (pH 4,5) des Wildtyps und die Säurephase (pH 5,7) der Mutante *cap0036_Int* haben gemein, dass die Proteine CAP0037 und CAP0036 nicht detektiert werden konnten. Möglicherweise lässt dies auf eine direkte oder indirekte Funktion der Proteine CAP0037 und CAP0036 auf die Regulation der Expression der Gene *cac3086* und/oder *cac3085* oder auf die Translationseffizienz schließen. Auch die Proteine CAC2584 („Protein containing ChW-repeats“) (~2,6-fach) und HSP18 („18 kDa heat shock protein“) (~2.2-fach) (Sauer und Dürre, 1993) wurden mit einer höheren Menge in der Mutante *cap0036_Int* detektiert. Am Interessantesten war wohl die Detektion des Proteins Adc („Acetoacetate decarboxylase“; CAP0165), welches mit einem zusätzlichen Spot (Schaffer *et al.*, 2002) signifikant erhöht (~2,0-fach) in der Mutante *cap0036_Int* in der Säurephase auftrat. Obwohl Adc direkt an der Produktion von Aceton beteiligt ist (Andersch *et al.* 1983; Petersen *et al.*, 1990) konnten keine signifikant erhöhten Acetonmengen in der Säurephase der Mutante *cap0036_Int* festgestellt werden (3.5.1). Bestätigend wurde auch die Transkriptmenge vom Gen *adc* ~2,3-fach erhöht in der Mutante detektiert (siehe Anhang, DNA Micro Array *cap0036_Int* vs. Wildtyp).

Tabelle 3.9: Signifikant erhöhte Proteinmengen ($\geq 2,0$) in der Säurephase (pH 5,7) des Wildtyps und der Mutante *cap0036_Int*.

ORF#	Proteinfunktion ^{a,b}	pH 5,7 Wildtyp	pH 5,7 <i>cap0036_Int</i>	Ratio ^{c,d}
		<i>Erhöht im Wildtyp</i>		
CA_P0037	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B. subtilis</i>			∞
CA_P0036	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B. subtilis</i>			∞
CAC3597	Rubrerythrin			∞
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin			~3,4

Fortsetzung		<i>Erhöht in cap0036 Int</i>		
CAC2903	LysM domain containing membrane protein			∞
CAC3086	(i) Protein cont. cell adhesion domain			~5,7
CAC3085	(ii) TPR-repeat-containing protein			
CAC2584	Protein containing ChW-repeats			~2,6
CAC3714 (<i>hsp18</i>)	18 kDa heat shock protein			~2,2
CA_P0165 (<i>adc</i>)	Acetoacetate decarboxylase			~2,0

^a: Proteinspots, die mehr als ein Polypeptid aufwiesen, sind in der Reihenfolge ihrer Identifikation aufgeführt.

^b: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^c: Bei Identifikation von mehreren Spots für ein Protein, wurde der Mittelwert dargestellt.

^d: Das Unendlichkeitszeichen (∞) bedeutet, dass ein Protein im Vergleichsstamm bei pH 5,7 nicht detektiert werden konnte.

3.5.3.2 Proteom Wildtyp vs. *cap0036_Int*: Lösungsmittelphase (pH 4,5)

Insgesamt ließen sich 5 verschiedene Proteine und deren Spots in signifikant erhöhter Menge in der Lösungsmittelphase des Wildtyps im Vergleich zur Mutante *cap0036_Int* detektieren (Tab. 3.10).

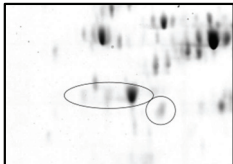
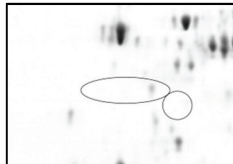
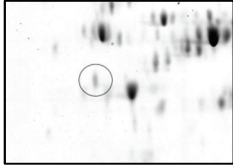
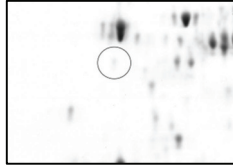
Zum einen handelte es sich wieder um Flagellin (CAC2203; FlaC) (~7,8-fach), welches bereits in der Säurephase des Wildtyps im Vergleich zur Mutante *cap0036_Int* signifikanter hervortrat (Tab. 3.9). Genauso verhielt es sich mit dem Protein „Extracellular neutral metalloprotease“ (CAC2517) (~6,1-fach). Auch die Proteinspots des „Rubrerythrin“ (CAC3597) zeigten ein stärkeres Auftreten im Wildtyp (~2,8-fach). Aufgrund der unter 3.5.3.1. bereits angesprochenen Funktion des „Rubrerythrins“ als aerobes Stressprotein konnte diese erhöhte Induktion auch unter diesen Bedingungen nicht erwartet werden. Zusätzlich konnte das „Ribosome-associated protein Y (PSrp-1)“ (CAC2847) erhöht in der Lösungsmittelphase des Wildtyps aufgedeckt werden (~3,6-fach). Auch dieses Protein scheint in der Stressantwort eine Rolle zu spielen. In *E. coli* stabilisiert es die

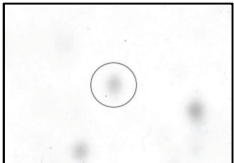

Ribosomen und verhindert somit deren Dissoziation unter Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren (Ye *et al.*, 2002) oder hat eine Funktion in der Kälteschock-Antwort. Die gleiche dissoziationsschützende Funktion für Ribosomen hat PSrp-1 („Plastid-specific ribosomal protein“) auch im Chloroplasten, wobei es zusätzlich an der lichtabhängigen Regulation der Translation ein Rolle zu spielen scheint (Sharma *et al.*, 2010).


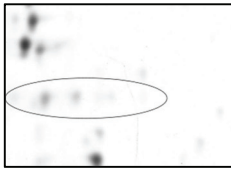
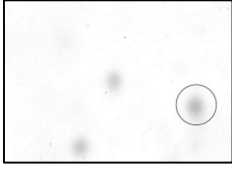

Abschließend wurde eine „Isopropylmalate isomerase“ (CAC3172; LeuD) ~2,3-fach stärker im Wildtyp detektiert. Dieses Protein ist in die Aminosäure-Synthese involviert, genauer in der Leucin-Biosynthese des Organismus (Nölling *et al.*, 2001).

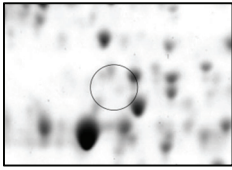
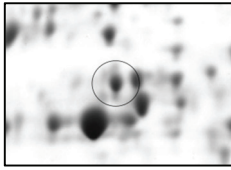
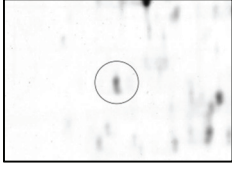
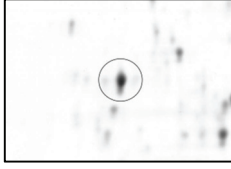
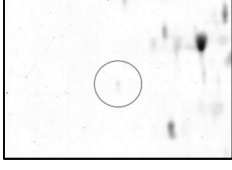
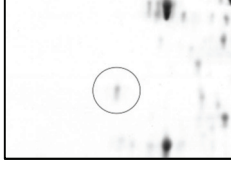
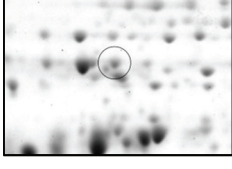
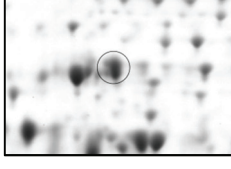
Umgekehrt wurden in der Mutante *cap0036_Int* 4 verschiedene Proteinspots mit einer erhöhten Abundanz gegenüber dem Wildtyp in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 identifiziert (Tab. 3.10): darunter eine „Alpha/beta superfamily hydrolase (Possible peptidase)“ (CAC3515), die ausschließlich in der Mutante *cap0036_Int* auftrat. Dieses Protein enthält Domänen, welche auf eine potentielle Esterase- oder Lipasefunktion schließen lässt bzw. auf eine Beteiligung im Aminosäuretransport bzw. -metabolismus hindeutet (Nölling *et al.*, 2001), seine genaue Funktion erscheint allerdings noch ungeklärt (Hotelier *et al.*, 2004). Die weiteren 3 Spots wiesen eine signifikant erhöhte Induktion von ~2,3-2,0-fach auf. Dabei handelte es sich um das „Putative uncharacterized protein“ (CAC0057) und ein „Autolytic lysozyme“ („1,4-beta-N-acetylmuramidase“) (CAC0554; Lyc), welches als Peptidoglykan-Hydrolase bzw. Autolysin am Abbau der bakteriellen Zellwand und der Autolyse der Zellen beteiligt ist (Croux und Garcia, 1991; Croux *et al.*, 1992a/b). Der dritte Spot enthielt zwei Proteine, die (i) „Phosphoglyceromutase“ (CAC0712, Pgm-i), welche in die Glykolyse involviert ist (Schreiber und Dürre, 1999) und eine (ii) „GMP synthase (glutamine-hydrolyzing)“ (CAC2700, GuaA).

Tabelle 3.10: Signifikant erhöhte Proteinmengen ($\geq 2,0$) in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) des Wildtyps und der Mutante *cap0036_Int*.

ORF#	Proteinfunktion ^{a,b}	pH 4,5 Wildtyp	pH 4,5 <i>cap0036_Int</i>	Ratio ^{c,d}
		<i>Erhöht im Wildtyp</i>		
CAC2203 (<i>flaC</i>)	Flagellin			~7,8
CAC2517 (<i>nrpE</i>)	Extracellular neutral metalloprotease			~6,1

CAC2847	Ribosome-associated protein Y (PSrp-1)			~3,6
---------	--	---	---	------

Fortsetzung		<i>Erhöht im Wildtyp</i>		
CAC3597	Rubrerithrin			~2,8
CAC3172 (<i>leuD</i>)	Isopropylmalate isomerase			~2,3

		<i>Erhöht in cap0036 Int</i>		
CAC3515	Alpha/beta superfamily hydrolase (Possible peptidase)			∞
CAC0057	Putative uncharacterized protein			~2,3
CAC0554 (<i>lyc</i>)	Autolytic lysozyme (1,4-beta-N- acetylmuramidase)			~2,1
CAC0712 (<i>pgm-i</i>) CAC2700 (<i>guaA</i>)	(i) Phosphoglyceromutase (ii) GMP synthase [glutamine- hydrolyzing]			~2,0

^a: Proteinspots, die mehr als ein Polypeptid aufwiesen, sind in der Reihenfolge ihrer Identifikation aufgeführt.

^b: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^c: Bei Identifikation von mehreren Spots für ein Protein, wurde der Mittelwert dargestellt.

^d: Das Unendlichkeitszeichen (∞) bedeutet, dass ein Protein im Vergleichsstamm bei pH 4,5 nicht detektiert werden konnte.

3.5.4 Mutante *cap0036_Int*: Transkriptomanalysen

Ergänzend wurden DNA Micro Array Analysen durchgeführt, basierend auf den standardisierten Methodenanforderungen des Dye-Flip- bzw. Dye-Swap-Verfahrens (2.9.8). Beim Vergleich einer Wachstumsphase (z. B. Säurephase pH 5,7) von Mutante *cap0036_Int* (M36) und Wildtyp (WT) wurde im ersten Hybridisierungsverfahren für den ersten DNA Micro Array cDNA der Mutante *cap0036_Int* mit dem Farbstoff Cy3 und die cDNA vom Wildtyp mit dem Farbstoff Cy5 markiert. Um

ebenfalls in diesem Experiment farbstoffspezifische Expressionsunterschiede auszuschließen, wurde ein experimentelles Replikat angefertigt, der sogenannte Dye-Flip bzw. Dye-Swap. Dabei wurden in diesem Hybridisierungsverfahren des wiederholten DNA Micro Arrays, die Farbstoffe für die cDNA von der Mutante *cap0036_Int* und vom Wildtyp getauscht (M36: Cy5 / WT: Cy3). Das gleiche Verfahren wurde angewandt beim Vergleich der Expressionsdaten der Lösungsmittelphase pH 4,5, zwischen Mutante *cap0036_Int* und Wildtyp. Die gesamten Daten der DNA Micro Array Analysen sind im Anhang dokumentiert.

3.5.4.1 Transkriptom Wildtyp und *cap0036_Int*: Säurephase (pH 5,7)

Der Vergleich der Expression der Säurephase bei pH 5,7 zwischen Mutante *cap0036_Int* und Wildtyp ist in Abbildung 3.20 dargestellt und die auffälligsten Unterschiede markiert. Im Wildtyp konnten insgesamt nur 24 Gene als signifikant induziert (Expressionsunterschied: $\geq 3,0$) dokumentiert werden. Am Auffälligsten war das Operon *cap0037-0036* (~224-fach), welches die stärkste Induktion aufwies. Die Integration einer Erythromycin-Resistenzkassette in das Gen *cap0036* stört offensichtlich die Transkription des kompletten das Operons oder führt zur schnellen Degradation der gebildeten mRNA. Bereits in den Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass in der Mutante *cap0036_Int* die Proteine CAP0037 und CAP0036 nicht mehr vorhanden waren (3.5.3.1, Tab. 3.9) und bestätigen somit die durchgeführte DNA Micro Array Analyse. Weiterhin konnten signifikant induzierte Stress-Gene

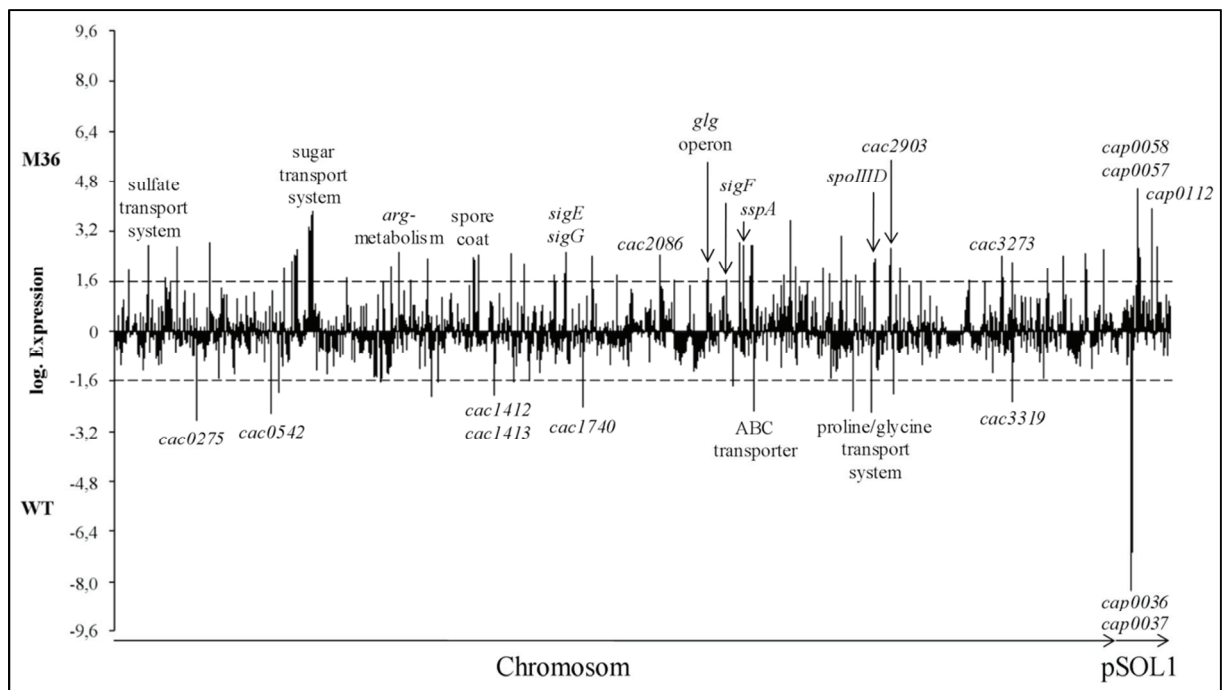


Abbildung 3.20: Überblick über die Transkriptlevel der einzelnen Gene in der Säurephase bei pH 5,7 beim Vergleich der Mutante *cap0036_Int* (M36) und des Wildtyps (WT). Gezeigt ist die log. Expression der Ratio (zur Basis 2) zwischen M36 und WT in der Säurephase. Alle Gene mit einer positiven log. Expression $\geq 1,6$ (gleich $\geq 3,0$ -fach) sind signifikant induziert in M36 und Gene mit einer negativen log. Expression $\leq -1,6$ (gleich $\leq 0,33$ -fach) sind signifikant induziert im WT. Somit zeigten alle Gene zwischen den gestrichelten Linien keinen signifikanten Einfluss in einem bestimmten Stamm.

detektiert werden, *cac1412* (*cdrC*) (~4,2-fach) und *cac1413* (~3,3-fach), Gene die für Proteine der Chemotaxis kodieren, *cac0542* (~6,2-fach) und *cac0909* (~3,1-fach), oder Gene die für verschiedene ABC-Transporter verantwortlich sind, z. B. die putativen Operons *cac2393-2392* (~5,2-fach) und *cac2850-2849* (~5,2-fach). Auch die „Signal transduction histidine kinase“ (*cac3319*) des putativen Operon *cac3319-3320* ist signifikant induziert (~4,9-fach).

In der Mutante *cap0036*_Int konnten viermal so viele Gene (insgesamt 97) detektiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Expression in der Säurephase aufwiesen. Unter anderem konnten Gene detektiert werden, die für den Sulfattransport und -metabolismus eine Rolle spielen, z. B. *cac0107*, *cac0108-0110* (~5,3-6,9-fach) oder in den Zuckertransport, -speicherung und -abbau involviert sind, z. B. *cac0662*, *cac0664*, *cac0665-0668* (~5,8-14,7-fach), *cac2237-2239* (*glgC-glgD-glgA*) (~3,2-4,2-fach) und *cac1664* (*glgP*) (~3,1-fach). Ebenso konnten Gene der Argininbiosynthese, wie *cac0973-0974* (*argG*, *argH*) (~4,7-6,0-fach), *cac2389-2388* (*argB*, *argD*) und *cac2390-2391* (*argC*, *argJ*) (~4,8-6,8-fach), mit einem signifikant erhöhten Transkript gemessen werden. Auch das Gen *cac2903* („LysM domain containing membrane protein“) wies eine signifikant erhöhte Transkription auf (~4,5-fach). Bereits das Protein konnte in der Säurephase der Mutante mit einer erhöhten Abundanz verzeichnet werden (Tab. 3.9).

Am Auffälligsten war aber die hohe Anzahl von Genen mit Bezug zur Sporulation, die in der Säurephase der Mutante *cap0036*_Int unerwartet eine signifikant erhöhte Transkriptmenge aufwiesen. Dazu gehören u. a., *cac0581* (*spoVR*) (~4,1-fach) oder ein putatives Operon *cac0614-0613* (~5,5-fach) dessen Gene für das „spore coat protein F“ kodieren. Auch die Transkriptmenge des Operons *cac1337-1338* (~4,9-fach), dessen Gene für das „Spore coat protein COTJB“ und das „Spore coat protein COTJC“ kodieren, war signifikant erhöht. Darüber hinaus konnten ebenso die Transkriptmengen der Gene des Sigmafaktors E, *cac1694-1695* (*spoIIGA*, *sigE*) (~4,2-fach), des Sigmafaktors G, *cac1696* (*sigG*) (~5,9-fach), und des Sigmafaktors F, *cac2306* (*sigF*) (~3,2-fach), als signifikant induziert gemessen werden. Auch die Transkripte der Gene *cac2365* (*sspA*, „Small acid-soluble spore protein“) (~6,8-fach), *cac2859* (*spoIIID*, „Stage III sporulation protein D“) (~4,7-fach) und *cac2086* („Stage III sporulation protein AH“) (~5,6-fach) konnten signifikant erhöht dokumentiert werden. Diese hohe Anzahl an induzierten Sporulationsgenen war überraschend, da Zellen in einer kontinuierlichen Kultur keine Sporen oder Vorsporen ausbilden. Aber dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Proteine CAP0037 und CAP0036 eine Funktion in der Regulation der Sporulation aufweist.

Weiterhin ist anzumerken, dass insgesamt 8 der 97 induzierten Gene auf dem Megaplasmid pSOL1 (Cornillot *et al.*, 1997) liegen. Davon zeigten die Gene des putativen Operon *cap0058-0057* (~18,6-fach), die für ein „Rare lipoprotein A RLPA related protein“ und ein „Putative glycoprotein or S-layer protein“ kodieren, die stärkste Induktion, zusammen mit dem Gen des „Hypothetical protein“ *cap0112* (~15,2-fach).

3.5.4.2 Transkriptom Wildtyp und *cap0036_Int*: Lösungsmittelphase (pH 4,5)

Der Vergleich der Expression der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 zwischen Mutante *cap0036_Int* und Wildtyp ist in Abbildung 3.21 dargestellt, wobei wiederum die auffälligsten Unterschiede markiert wurden. Auch in der Lösungsmittelphase des Wildtyps bei pH 4,5 konnten nur wenige Gene (29) als signifikant induziert (Expressionsunterschied: $\geq 3,0$) gemessen werden. Ein großer Teil dieser Gene ist in den Argininmetabolismus involviert, wie z. B. *cac0316* (*argF/I*) (~13,7-fach), *cac2645-2644* (*carB-carA*, ~3,2-fach), *cac0973-0974* (*argG*, *argH*) (~7,9-8,3-fach), *cac2389-2388* (*argB*, *argD*) und *cac2390-2391* (*argC*, *argJ*) (~3,8-10,3-fach). Bereits in der Säurephase bei pH 5,7 konnte dokumentiert werden, dass eine hohe Anzahl an Genen des Argininstoffwechsels unterschiedlich stark

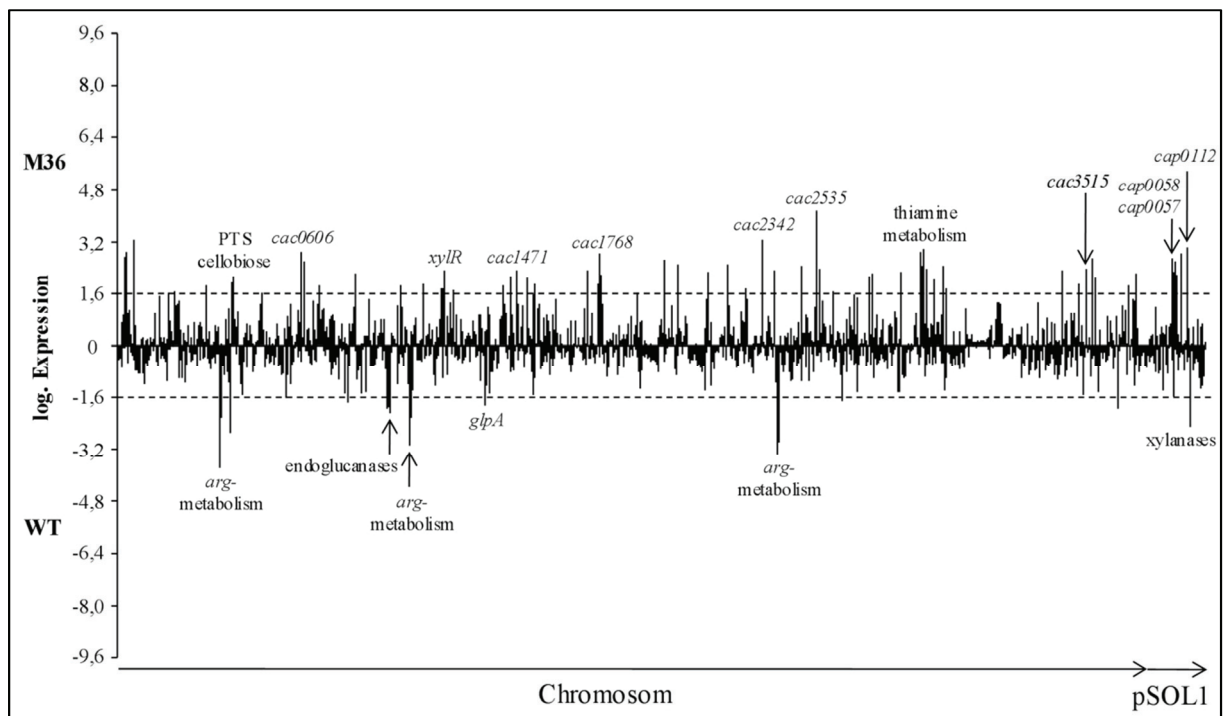


Abbildung 3.21: Überblick über die Transkriptlevel der einzelnen Gene in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 beim Vergleich der Mutante *cap0036_Int* (M36) und des Wildtyps (WT). Gezeigt ist die log. Expression der Ratio (zur Basis 2) zwischen M36 und WT in der Säurephase. Alle Gene mit einer positiven log. Expression $\geq 1,6$ (gleich $\geq 3,0$ -fach) sind signifikant induziert in M36 und Gene mit einer negativen log. Expression $\leq -1,6$ (gleich $\leq 0,33$ -fach) sind signifikant induziert im WT. Somit zeigten alle Gene zwischen den gestrichelten Linien keinen signifikanten Einfluss in einer bestimmten Wachstumskultur.

exprimiert wurden. Allerdings waren die Gene während der Säurephase stärker in der Mutante *cap0036_Int* induziert. In der Lösungsmittelphase wurde hingegen ein Großteil dieser Gene im Wildtyp signifikant stärker exprimiert. Darüber hinaus waren auffällig viele Gene induziert, welche für „Endoglucanases“ kodieren, wie z. B. das putative Operon *cac0910-0919* (~3,8-fach), oder auf dem pSOL1 kodierte „Xylanases“ *cap0116* (~3,4-fach), *cap0117* (~5,7-fach) und *cap0118* (~4,6-fach). In der Mutante *cap0036_Int* konnten, wie bereits in der Säurephase auch, wesentlich mehr Gene als signifikant induziert dokumentiert werden als im Wildtyp. Insgesamt wurden 75 Gene mit signifikant erhöhten Transkriptmengen detektiert. Darunter befindet sich, u. a. das Operon für die

Thiaminsynthese, *cac2924-2920* (*thiS*, *thiF*, *thiG*, *thiH* und *tenI*) (~5,5-fach) sowie das Gen *cac3014* (*thiC*) (~5,5-fach). Hierbei ist anzumerken, dass Thiamin Bestandteil des phosphatlimitierenden Minimalmediums ist (2.3.1.). Weiterhin konnten Gene identifiziert werden die für Phosphotransferasesysteme (PTS) kodieren, wie z. B. *cac3083-3085* (~3,7-fach) und *cac3086* (*licC*) (~4,1-fach), oder ABC-Transporter, wie *cap0073-0074* (~5,4-fach) und *cac1399* (~3,6-fach). Ebenso konnten Gene aus verschiedensten Stoffwechselwegen mit signifikant erhöhten Transkriptmengen gemessen werden, u. a. aus der Glykolyse die „Phosphoenolpyruvate synthase“ (*cac0797*) (~4,6-fach), aus dem Pentose-Phosphat-Weg die „Ribose 5-phosphate isomerase“ (*cac1431*, *rpiA*) (~4,4-fach) und die in die Serinbiosynthese involvierte „D-3-phosphoglycerate dehydrogenase“ (*cac0015*, *serA*) (~5,4-fach). Ebenfalls eine erhöhte Transkriptmenge des Gens *cac3515* (~5,2-fach) konnte verzeichnet werden, dessen Protein die „Alpha/beta hydrolase“, bereits mit einer erhöhten Abundanz in der Mutante dokumentiert werden konnte (Tab. 3.9).

Auch 15 Gene die für Proteine mit hypothetischer Funktion kodieren, wurden detektiert, z. B. *cac0275*, *cac0387*, *cac1073*, *cac3529* oder *cap0112* (~3,6-8,1-fach). Das Gen *cap0112* (~8,1-fach) konnte zusammen mit den Genen *cap0058-0057* (~6,0-fach) bereits in der Säurephase der Mutante *cap0036_Int* als stark induziert gemessen werden (~15,2-18,6-fach). Möglicherweise haben die Proteine CAP0037 und CAP0036 einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Transkription der vom Megaplasmid kodierten Gene *cap0058-0057* und *cap0112*, da in der Mutante *cap0036_Int* die Transkription dieser Gene unabhängig von der Wachstumsphase stark beeinflusst ist.

4 Diskussion

4.1 Wachstum von *C. acetobutylicum*: pH 5,7 bis 4,5

Das lösungsmittelbildende Bakterium *C. acetobutylicum* steht bereits seit mehreren Jahrzehnten im Fokus intensiver Forschung im Hinblick auf seinen biphasischen Fermentationsmetabolismus mit der Bildung organischer Säuren (Acetat und Butyrat) und Lösungsmitteln (Aceton und Butanol). Besonders die biologische Produktion von Butanol mit der Anwendung als Bio-Kraftstoff macht *C. acetobutylicum* aus ökologischer und ökonomischer Sicht zunehmend wertvoller und ist daher zu einer der am besten untersuchten apathogenen Clostridien-Spezies geworden (Dürre, 2007; 2008a).

C. acetobutylicum ist leicht kultivierbar unter der Anwendung von Chemostat-Kulturen (Bahl *et al.*, 1982a/b; Fischer *et al.*, 2006). Chemostat-Kulturen bieten die Möglichkeit für die Untersuchung einer spezifischen Veränderung eines einzelnen Parameters, wie z. B. Temperatur, Wachstumsrate, Nährstofflimitierung oder pH-Wert und deren Auswirkung auf den Metabolismus. Bereits Bahl und Kollegen (1982a/b) konnten in phosphatlimitierenden Chemostat-Kulturen zeigen, dass der Metabolismus von *C. acetobutylicum* bedingt durch den externen pH-Wert zwischen Säure- (pH > 5,0) und Lösungsmittelbildung (pH < 5,0) wechselt.

Die Möglichkeit der Änderung eines einzelnen Umwelteinflusses, insbesondere ohne Beeinflussung anderer Parameter, macht die Anwendung kontinuierlicher Kulturen zu einem adäquaten System für Experimente zur Untersuchung von Transkriptom und Proteom. Durch die hohe stabile Reproduzierbarkeit zu untersuchender Zellproben aus kontinuierlichen Kulturen, macht diese optimal für systematisch verlaufende Experimente in systembiologischen Ansätzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum von *C. acetobutylicum*, unter der Anwendung von Chemostat-Kulturen, bei unterschiedlichen pH-Werten analysiert. Zu Beginn jeder kontinuierlichen Kulturführung sollte das Wachstum in der Säurephase bei einem hohen pH-Wert etabliert und nach dem Wechsel auf einen niedrigeren pH-Wert analysiert werden. Diese experimentelle Herangehensweise hatte den Vorteil, dass das Wachstum ähnlich zum natürlichen biphasischen Zellzyklus (Jones *et al.*, 1986) von hohen zu niedrigen pH-Werten untersucht werden konnte. Das heißt, die Kultivierung beschreibt erst die Säurebildungsphase, während im weiteren Verlauf des Experiments auf die Lösungsmittelphase umgeschaltet wurde.

Zu Beginn dieser Arbeit und im Rahmen des Gesamtkonsortiums COSMIC1, sollte ein passender Ausgangs-pH-Punkt für die Säurephase definiert werden. In vorherigen Arbeiten wurde für die Säurephase der pH-Punkt 5,3 gewählt (Fiedler, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass darin in der Regel noch ~5 mM Butanol nachgewiesen werden konnten, führte zum Entschluss einen höheren pH-Wert für die Säurephase zu wählen. Diesbezüglich wurde bei der Entwicklung einer „Standard operating procedure“ (SOP) für kontinuierliche Kulturen von *C. acetobutylicum* für das COSMIC1-Projekt, für jede Fermentation einer Kultur ein anfänglicher Etablierungs-pH-Wert von 5,7 festgelegt. Nach dem Wechsel des Ausgangs-pH-Wertes von 5,7 auf die Werte 5,5 und 5,3, konnten keine signifikanten

Änderungen im Produktspektrum und der optischen Dichte aufgezeigt werden. Das diese pH-Werte die Säurephase repräsentieren, konnte bereits unter der Anwendung höherer Durchflussraten und entgegengesetzter „Shift“-Richtung (pH 4,3 auf pH 5,3 oder pH 5,5) dokumentiert werden (Bahl *et al.*, 1982b).

Mit den zusätzlichen Wechseln von pH 5,7 auf 5,1, 4,9, 4,7 und 4,5 waren auch signifikante Änderungen der Endprodukte messbar. Während die Kulturen der pH-Werte 4,9, 4,7 und 4,5 einen vollständigen Lösungsmittel-„Shift“ vollzogen, wies der pH-Wert 5,1 eine „Transitionsphase“ zwischen Säure- und Lösungsmittelphase auf.

Einhergehend mit der Initiation der Lösungsmittelphase bei den genannten pH-Werten, ließ sich in der Regel stets ein kurzzeitiger signifikanter Einbruch der optischen Dichte feststellen. Die Kulturen im *steady state*-Wachstum der einzelnen pH-Werte wiesen allerdings nahezu identische optische Dichten auf (5 ± 0.5). Die Ursache für den Einbruch der optischen Dichte steht im Zusammenhang mit den Konzentrationen an gebildeten Säuren Acetat und Butyrat beim pH 5,7. Aufgrund ihrer pKs-Werte, mit 4,76 für Acetat und 4,81 für Butyrat, liegen die Säuren bei darüber liegenden pH-Werten in dissoziierter Form vor (Van Ginkel und Logan, 2005). Sie sind dadurch als deprotonierte Salze Acetat (CH_3COO^-) und Butyrat ($\text{C}_3\text{H}_7\text{COO}^-$) im Kulturüberstand gelöst. Wenn es zu einem Absenken des pH-Werts unter die pKs-Werte der Säuren kommt (z. B. pH 5,7 auf 4,5), wird infolge das Dissoziationsgleichgewicht zugunsten der undissoziierten Säuren verschoben. Diese undissoziierten Säuren können als ungeladene Substanzen frei über die Zellmembran in die Zelle diffundieren (Abb. 4.1).

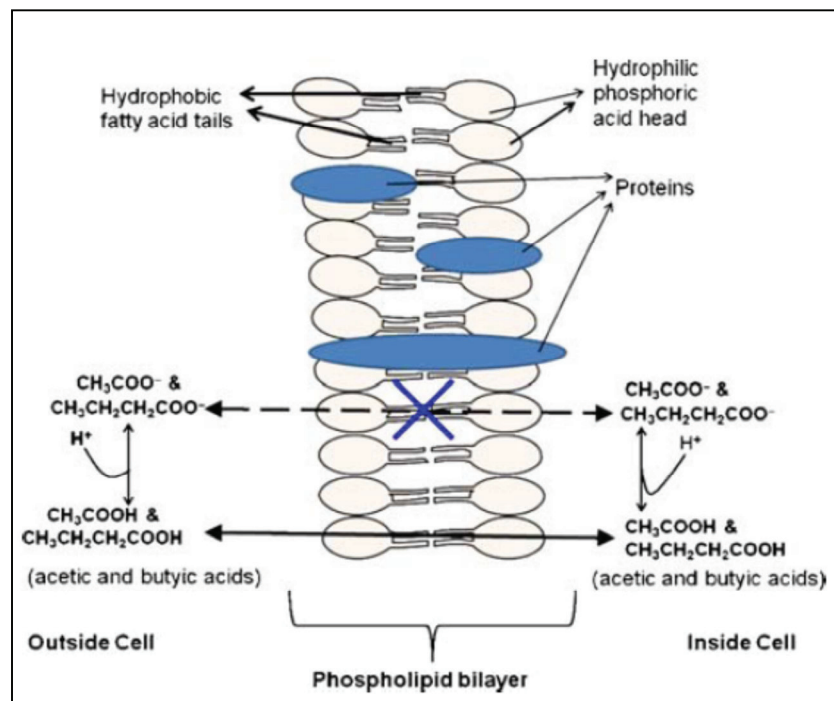


Abbildung 4.1: Darstellung der Bewegung der dissoziierten und undissoziierten Säuren Acetat und Butyrat entlang der Zell-Membran (aus Ezeji *et al.*, 2010).

Innerhalb der Zelle liegt der pH-Wert allerdings eine ganze pH-Stufe höher als außerhalb der Zelle vor (Gottwald und Gottschalk, 1985; Terracciano und Kashket, 1986). Die einströmenden undissoziierten Säuren (insgesamt ~110 mM) werden daher innerhalb der Zelle sofort wieder in ihre dissoziierte Form überführt und dies führt zu einer Gleichgewichtsverschiebung der Protonenkonzentration zwischen Zelle und ihrer Umgebung. In der Folge kommt es zu einer starken Veränderung des Membranpotentials, was u. a. zu einem inhibitorischen Effekt auf das Wachstum und die Nährstoffaufnahme führt (Ezeji *et al.*, 2010). Es kommt zum Absterben einiger Zellen, was sich wiederum im Einbruch der optischen Dichte widerspiegelt. Gleichzeitig ist eine gewisse Konzentration an undissoziierten Säuren aber auch ein maßgeblicher Auslöser der Lösungsmittelproduktion (Dürre, 1998) und die Zellen beginnen mit der Umwandlung der einströmenden Säuren in die neutralen Lösungsmittel Aceton und Butanol.

Interessanterweise, konnte bei geringeren Mengen an vorliegenden Säuren (~75 mM) in einem 1-l-Kulturvolumen kein Einbruch der optischen Dichte verzeichnet werden (Grimmler *et al.*, 2010).

4.2 *Steady state*-pH 5,7 und 4,5: Proteom und Transkriptom

4.2.1 Proteomanalyse mittels 2D-PAGE

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine detaillierte Analyse der cytosolischen Proteine von *steady state*-Zellen der Säure- (pH 5,7) und der Lösungsmittelphase (pH 4,5) anzufertigen. Zur simultanen Analyse aller exprimierten Proteine, die zum Zeitpunkt der Säure- und Lösungsmittelphase in *C. acetobutylicum* vorkamen, wurde die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) angewendet (O'Farrell, 1975). Das Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung cytosolischer Proteine für *C. acetobutylicum* wurde in einer Vorgängerarbeit von Schwarz *et al.* (2007) entwickelt, so dass auf eine gute SOP zurückgegriffen werden konnte. Mit Hilfe der 2D-PAGE Analyse ließen sich laut den Algorithmen von Hiller *et al.* (2006) insgesamt 21 % aller cytosolischen Proteine mit einem *pI* von 4-7 und einer molekularen Masse von 10-200 kDa identifizieren. Bezogen auf die Gesamtzahl von 3847 annotierten proteinkodierenden Genen von *C. acetobutylicum*, konnte allerdings nur eine relativ geringe Anzahl von 251 verschiedenen Proteinen (6,5 %) identifiziert werden. Nichtsdestotrotz steht dieses Ergebnis in guter Übereinstimmung mit anderen Arbeiten in denen cytosolische Proteome erfasst wurden. So konnten im Falle von *Corynebacterium glutamicum* 4,6 % (Li *et al.* 2007), bei *Deinococcus geothermalis* 9,8 % (Liedert *et al.*, 2009), bei *Corynebacterium jeikeium* K411 16,9 % (Hansmeier *et al.*, 2006) oder bei *Bifidobacterium longum* 21,4 % (Yuan *et al.*, 2006) aller Proteine aufgefunden werden.

Das Insgesamt nur eine relativ geringe Anzahl an Proteinen detektiert wurde liegt daran, dass nur lösliche Proteine mit einem *pI* 4-7 dokumentiert worden sind und extrazelluläre sowie unlösliche Membranproteine nicht detektiert werden konnten. Methodisch bedingt konnten darüber hinaus Proteine mit einer generell geringen Abundanz nicht detektiert werden, da mittels Färbung mit kolloidalem Coomassie nur Proteinspots ab einer Mindestmenge von 8-10 ng visualisiert werden können (Brush, 1998). Interessanterweise, können auch unter der Anwendung anderer

Proteomtechniken, wie z. B. 2D-DIGE („fluorescence difference gel electrophoresis“) (Sonck *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2006) oder gelfreier Analysen mittels mL-MS/MS („micro-capillary liquid chromatographic fractionation of protein tryptic digests with automated tandem mass spectrometry“) (Baggerman *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2008; Wolff *et al.*, 2006) zum heutigen Zeitpunkt maximal 20-40 % aller Proteine eines Organismus erfasst werden (Zhang *et al.*, 2010). Zur Erfassung einer höheren Proteinanzahl für eine spezifische Bedingung könnte die Weiterentwicklung von quantitativen Proteomanalysen, wie z. B. ICAT („isotope-coded affinity tags“) (Gygi *et al.*, 1999a; Han *et al.*, 2001), iTRAQ („isobaric tag for relative and absolute quantification“) (Yan *et al.*, 2008) oder label-freien quantitativ vergleichenden Proteomanalysen (Haqqani *et al.*, 2008) von großer Wichtigkeit sein.

4.2.2 Transkriptomanalyse mittels DNA Micro Array

Im Zuge der letzten Jahre wurde ebenso deutlich, dass eine einzelne „Omics“-Technologie nicht ausreichend ist, um ein komplexes biologisches System zu charakterisieren (Gygi *et al.*, 1999b; Park *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Somit sollte zusätzlich zum Proteom, das Transkriptom als eine globale Analyse der Genexpression für *C. acetobutylicum* erfolgen. Expressionsleveluntersuchungen können u. a. mittels hochsensitiver „chip-based nanolitre-volume reverse-transcript“ (RT)-PCR (Stedtfeld *et al.*, 2008), durch direkte Sequenzierung der cDNA (Frias-Lopez *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2008) oder mittels einer DRS („direct RNA sequencing“)-Technologie (Ozsolak *et al.*, 2009) erfolgen.

Der systembiologisch ausgerichtete Forschungsansatz des Projektes COSMIC1 ermöglichte der Partnergruppe um Ehrenreich, die Entwicklung eines COSMIC-DNA Micro Array Chips für *C. acetobutylicum* und dadurch auch die erstmalige Anwendung dieser Technologie für *C. acetobutylicum* innerhalb Europas. Dadurch konnten im Rahmen dieser Arbeit die Gesamtheit aller gebildeten mRNA-Moleküle gemessen werden. Es sollten dadurch einzelne Gene aufgedeckt werden, die an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind und eine mögliche signifikante Rolle in den jeweils untersuchten Zuständen (Säure- oder Lösungsmittelphase) einnehmen. Insgesamt wurden 53 Gene (1,4 %) in der Säurephase bei pH 5,7 als signifikant induziert dokumentiert. Für die Lösungsmittelphase wurden mit 95 fast doppelt so viele Gene (2,5 %) signifikant induziert. Diese Ergebnisse sind in qualitativ hoher Übereinstimmung mit den Daten des Kooperationspartners der Universität Göttingen (Grimmler *et al.*, 2010). Hier konnten unter der Anwendung gleicher SOPs und der gleichen DNA Micro Array-Technologie 50 signifikant induzierte Gene in der Säurephase bei pH 5,8 und 118 Gene in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 dokumentiert werden.

4.2.3 Integrative Proteom- und Transkriptomanalyse

Exponentiell wachsende Zellen in einer Chemostat-Kultur wurden von mindestens zwei „Omics“-Analysen („Proteomic“; „Transcriptomic“) bisher noch nicht näher charakterisiert. Die integrative Transkriptom- und Proteomanalyse ist einer der meist verwendeten Multi-„Omics“-Ansätze. Basierend auf der Datenanalyse, wird die vergleichende Analyse von Transkriptom und Proteom nach

Zhang *et al.* (2010) in drei Kategorien eingeteilt: (1) Transkriptom und Proteom werden angewendet, um sich gegenseitig zu komplementieren. Während die hier angefertigte Proteomanalyse auf Proteine mit einem *pI* von 4-7 beschränkt ist, können fehlende Proteindaten durch die Transkriptomdaten ergänzt werden. (2) Beide Analysen werden zum Zwecke der Vergleichsprüfung angewandt. Bei hohen Transkriptraten eines Gens und einem gleichzeitigen hohen Proteinlevel, führt dies zu einer sehr hohen Absicherung der Ergebnisse. (3) Zusätzlich sollen Transkriptom- und Proteomdaten dazu genutzt werden, um Ergebnisse zu generieren, die durch eine einzelne „Omics“-Analyse nicht erbracht werden können. Zum Beispiel die Aufdeckung unterschiedlicher Translationseffizienzen oder mögliche post-transkriptionelle Regulationseffekte, wenn ein Organismus unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt ist.

Bei der hier angefertigten Analyse des Wachstums in der Säure- und der Lösungsmittelphase, waren die auffälligsten Proteine CAP0037 und CAP0036, welche nur in der Säurephase bei pH 5,7 nachgewiesen wurden. Ihre hohen Proteinmengen lassen sich durch eine gleichzeitig starke Expression der Gene *cap0037* und *cap0036* erklären, welche indirekt die Proteomdaten dadurch absicherten. Nicht erklärbar ist bisher die hohe Rate der Transkripte bei pH 5,7 im Vergleich zu pH 4,5. Eine solche Erhöhung die auf der Änderung nur eines externen Parameters basiert, deutet eine hervorgehobene Bedeutung unter diesen Wachstumsbedingungen an. Ursachen für die unterschiedlich hohen Transkriptraten können nur auf molekularer Ebene ermittelt werden, wie z. B. Promotorstudien oder Ermittlung von DNA-Bindestellen. Diese Tätigkeiten waren nicht Gegenstand dieser Arbeit, sondern werden aktuell von einem Projektpartner (Linder, Dürre; Universität Ulm) durchgeführt.

Ebenso muss erwähnt werden, dass kein anderes Gen ähnlich hohe Transkriptraten (~200-fach) wie *cap0037* und *cap0036* aufwies. Die angefertigten Northern-Blot Analysen bestätigten, dass vorliegen eines bicistronischen Operon, wie es bereits in Arbeiten von Schiel (2006) mittels RT-PCR angedeutet worden war. Auffällig ist, dass in weiteren Artikeln in Fachzeitschriften bisher *cap0037-0036* keine besondere Aufmerksamkeit erregte. Ursache mag sein, dass allen gemein war statische Kulturen zu untersuchen (Alsaker und Papoutsakis, 2005; Jones *et al.*, 2008). Vielleicht spielt es aber eine Rolle, dass das Operon *cap0037-0036* während des dynamischen „Shifts“ in einem Chemostaten mit dem „Beginn der Lösungsmittelphase“ zunächst weiterhin stark exprimiert bleibt und erst Zellen von ausgewiesenen *steady state*-Lösungsmittelphasen kein Transkript des Operons mehr aufwiesen (Grimmler *et al.*, 2010).

Signifikant induzierte Kandidaten der Lösungsmittelphase, sind die Genprodukte des *sol* Operon, die „Aldehyde-alcohol dehydrogenase“ (AdhE1) und die „Subunits of the butyrate-acetoacetate CoA-transferase“ (CtfA, CtfB). Diese Erkenntnisse korrelieren sehr gut mit bisher veröffentlichten Daten zum *sol* Operon, welches eine starke Expression am „Beginn der Lösungsmittelphase“ unter den Bedingungen einer Batch-Kultur aufzeigt (Alsaker und Papoutsakis, 2005; Harris *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2008) und auch in Chemostat-Kulturen (Fischer *et al.*, 1993; Fontaine *et al.*, 2002; Sauer und Dürre, 1995). Eine Gruppe von Genen mit einer signifikanten Induktion in der Transitionsphase einer Batch-Kultur (Alsaker und Papoutsakis, 2005; Grimmler *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2008) wiesen auch

eine stark erhöhte Expression im *steady-state* der Lösungsmittelphase der kontinuierlichen Kultur. Dazu zählen Gene die für Glykosyltransferasen, Xylanasen oder auch Endoglukanasen kodieren. Glykosyltransferasen sind in der Lage Proteine durch Glykosylierung zu modifizieren. Für Clostridien sind bisher nur wenige glykosylierte Proteine beschrieben, wie z. B. ein S-layer Protein aus *C. symbiosum* (Messner *et al.*, 1990), das Flagellin aus *C. tyrobutyricum* (Bédouet *et al.*, 1998) und *C. acetobutylicum* (Lyristis *et al.*, 2000) oder das Autolysin aus *C. acetobutylicum* P262 (Webster *et al.*, 1981) (jetzt *C. saccharobutylicum* [Shaheen *et al.*, 2000]).

Ebenso überraschend ist die hohe Induktion der Xylanasen und Endoglukanasen, denn das Medium der kontinuierlichen Kultur enthält als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle ausreichend Glukose (2,5 %). Es ist allerdings bekannt, dass *C. acetobutylicum* durch einen sinkenden pH-Wert und der gleichzeitig einhergehenden Lösungsmittelbildung geringere Mengen an Glukose verbraucht (Bowles und Ellefson, 1985; Ounine *et al.*, 1985). Auch Teile des Glukose-Phosphotransferase Systems (PTS) (Tangey und Mitchell, 2007) weisen in der Lösungsmittelphase eine reprimierte Expression auf (*glcG*; ~0,6-fach). Durch den verminderten Glukoseverbrauch ist es denkbar, dass die Zellen versuchen alternative Energiequellen zu erschließen und somit die Transkription der Gene für Endoglukanasen und Xylanasen erhöhen. Die allgemeine Xylose-freisetzende Aktivität von *C. acetobutylicum* (Lee *et al.*, 1985b) konnte bereits anhand der xylanabbauenden Xylanasen CAP0053 (Xyn10A) und CAP0116 (Xyn10B) demonstriert werden (Mursheda *et al.*, 2004; Mursheda *et al.*, 2005). Allerdings ist bekannt, dass vorhandene Glukose wiederum den Verbrauch von freier Xylose hemmt, was unter der allgemeinen „carbon catabolite repression“ (CCR) bekannt ist (Mitchell, 1998). Diese CCR wird in *C. acetobutylicum* durch den Regulator CcpA („Catabolite control protein A“; *cac3037*) gesteuert und dessen Inaktivierung führt zur Aufhebung der Glukoserepression des Xyloseverbrauchs (Ren *et al.*, 2010). Interessanterweise wird das *ccpA*-Gen von *C. acetobutylicum* in Zellen bei pH 5,7 verstärkt transkribiert (~2,9-fach). Es ist somit nicht auszuschließen, dass das CcpA-Protein auch einen Einfluss auf die Repression von den Xylanase-Genen in der Säurephase von *C. acetobutylicum* hat. Dagegen spricht, dass Xylanasen in *B. subtilis* keiner CCR unterliegen (Lindner *et al.*, 1994).

Weiterhin konnte in Batch-Kulturen gezeigt werden, dass mit „Beginn der Lösungsmittelphase“ und trotz weiterhin vorhandener Glukose viele Gene des komplexen Kohlenhydratabbaus stark induziert werden (Jones *et al.*, 2008). In Betracht der hohen Induktion der Endoglukanasen (*cac0910-0915* und *cac0918-0919*) sei allerdings zu erwähnen, dass *C. acetobutylicum* bisher nicht in der Lage ist Cellulose abzubauen (Lee *et al.*, 1985a), obwohl das Genom viele Gene des Cellulosoms und für dessen Aufbau umfasst (López-Contreras *et al.*, 2003; López-Contreras *et al.*, 2004; Sabathé *et al.*, 2002).

Das generelle Verständnis, dass eine erhöhte Transkriptmenge auch zu einer signifikant stärkeren Abundanz des Proteins führt, konnte für einige Kandidaten bestätigt werden, wie z. B. für das Operon CAP0037-0036, das *sol* Operon, eine Endoglukanase (CAC0911) und eine Metalloprotease (CAC2517). Insgesamt zeigt der globale Vergleich von Proteom und Transkriptom aber auch eine Vielzahl von Ausnahmen, bei denen Transkript- und Proteinmenge nicht übereinstimmen. Zum

Beispiel das Flagellin (FlaC bzw. Hag) wies signifikant erhöhte Mengen an Protein, aber keine erhöhten Transkriptmengen bei pH 4,5 auf. Für das Flagellin (FlaC; Hag) konnte bereits in *B. subtilis* eine posttranskriptionale Regulation durch das Protein CsrA („Carbon storage regulator A“) dokumentiert werden. Dabei wird die Initiation der Translation reguliert, indem CsrA die Bindung der mRNA an die Ribosomen blockiert (Yakhnin *et al.*, 2007). Die Transkription selber wird dagegen von der σ^D -abhängigen RNA-Polymerase kontrolliert und gleichzeitig negativ als auch positiv durch den „Transition state regulator“ ScoC beeinflusst (Kodgire und Rao, 2008).

Ebenso wurden auch einige Gene (*thlA*, *bcd*, *crt*, *ptb*, *buk*) mit signifikant erhöhtem Transkript verzeichnet, dessen Proteine aber keine oder nur eine geringfügige Änderung in ihrer Abundanz zeigten. Diese Diskrepanzen zwischen Transkript und Protein kann u. a. an einer unterschiedlichen Translationseffizienz liegen. Auch ein regulatorischer Einfluss durch post-translationale Modifikation kann nicht ausgeschlossen werden. Ebenso muss eine post-transkriptionale Regulation bzw. unterschiedliche Halbwertszeiten der mRNA (mRNA-„half life“) oder der Proteine als Ursache in Betracht gezogen werden (Beyer *et al.*, 2004; Greenbaum *et al.*, 2002; Gygi *et al.*, 1999b). Solch eine Diskrepanz zwischen Transkript- und Proteinmenge konnte bereits in *C. acetobutylicum* für eine „Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase“ (GapC) gezeigt werden (Schaffer *et al.*, 2002).

4.3 *Steady state*-pH 5,5 bis 4,7

4.3.1 Proteom- und Transkriptomanalyse

Anhand der Fermentationsendprodukte konnte gezeigt werden, dass Zellen bei den pH-Werten 5,5 und 5,3 eine eindeutige Säurephase reflektieren. Dieses Erkenntnis konnte auf Proteom- und Transkriptomebene bestätigt werden. Die Marker Kandidaten CAP0037 und CAP0036 der Säurephase pH 5,7, waren weiterhin bei pH 5,5 und 5,3 eindeutig detektierbar. Auch für EtfB (CAC2710) konnte auf Proteinebene dieses Verhalten dokumentiert werden. Erst ab dem *steady state*-pH-Wert 5,1 (bis pH 4,7) konnten CAP0037, CAP0036 und EtfB nur noch in geringeren Mengen detektiert werden.

Dieser stringente Wechsel von Protein- und Transkriptmengen bei pH-Punkt 5,1 konnte auch für die Indikatoren der Lösungsmittelphase (AdhE, CtfA, CtfB, CAC0911, CAC2517) dokumentiert werden. Während in Zellen der pH-Stufe 5,5 und 5,3 keine Transkripte oder Proteine nachweisbar waren, wurden erstmalig erhöhte Transkript- und Proteinmengen in Zellen der pH-Stufe 5,1 verzeichnet. Weitere Gene dessen Expressionsmuster in einer Kultur bei pH 5,1, der Kultur der Lösungsmittelphase gleich kamen, waren u. a. die „Xre family DNA-binding domain and TPR repeats containing proteins“ (*cap0040*, *cac0186*, *cac3695*). Diese Familie zeichnet sich durch Xre („Xenobiotic responsive element“)- und TPR („Tetratricopeptide repeats“)-Motife aus. Xre-Elemente sind in Eu- und Prokaryoten weit verbreitet und haben als DNA-bindende Faktoren eine transkriptionsregulatorische Funktion (Hapgood *et al.*, 1989; Luscombe *et al.*, 2000). TPR-Motife hingegen weisen auf Protein-Protein-Interaktion hin (Lamb *et al.*, 1995). Interessanterweise sind nur zwei Gene dieser Familie (*cap0040* und *cap0149*) auf dem extrachromosomalen pSOL1 (Cornillot *et*

al., 1997) kodiert und weisen dazu eine antagonistische Regulation auf (Janssen *et al.*, 2010). Inwiefern diese Proteine einen regulatorischen Einfluss auf das Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten haben ist allerdings nicht bekannt.

Die signifikante Änderung der Transkription in Zellen bei pH 5,1, findet sich nicht für alle Gene die eine Beeinflussung zwischen Säure- und Lösungsmittelphase aufwiesen. Beispielhaft seien die Gene des primären Stoffwechselwegs (*thlA*, *etfA*, *bcd*, *crt*, *buk*, *ptb*) zu nennen. Alle Gene zeigen signifikant erhöhte Transkriptmengen in Zellen der Säurephase bei pH 5,7. Zellen der pH-Werte 5,5 und 5,3 weisen allerdings für diese Gene etwa die gleichen Transkriptmengen wie Zellen einer Lösungsmittelphase auf. Dieses Phänomen trifft auch auf Zellen der pH-Werte eines dynamischen „Shifts“ zu (Grimmler *et al.*, 2010) und scheint daher nicht *steady state* spezifisch zu sein. Eine Übersicht für die Transkriptmuster der wichtigsten Gene des primären Stoffwechsels in den *steady state*-pH-Kulturen von *C. acetobutylicum* ist in Abbildung 4.2 übersichtlich dargestellt.

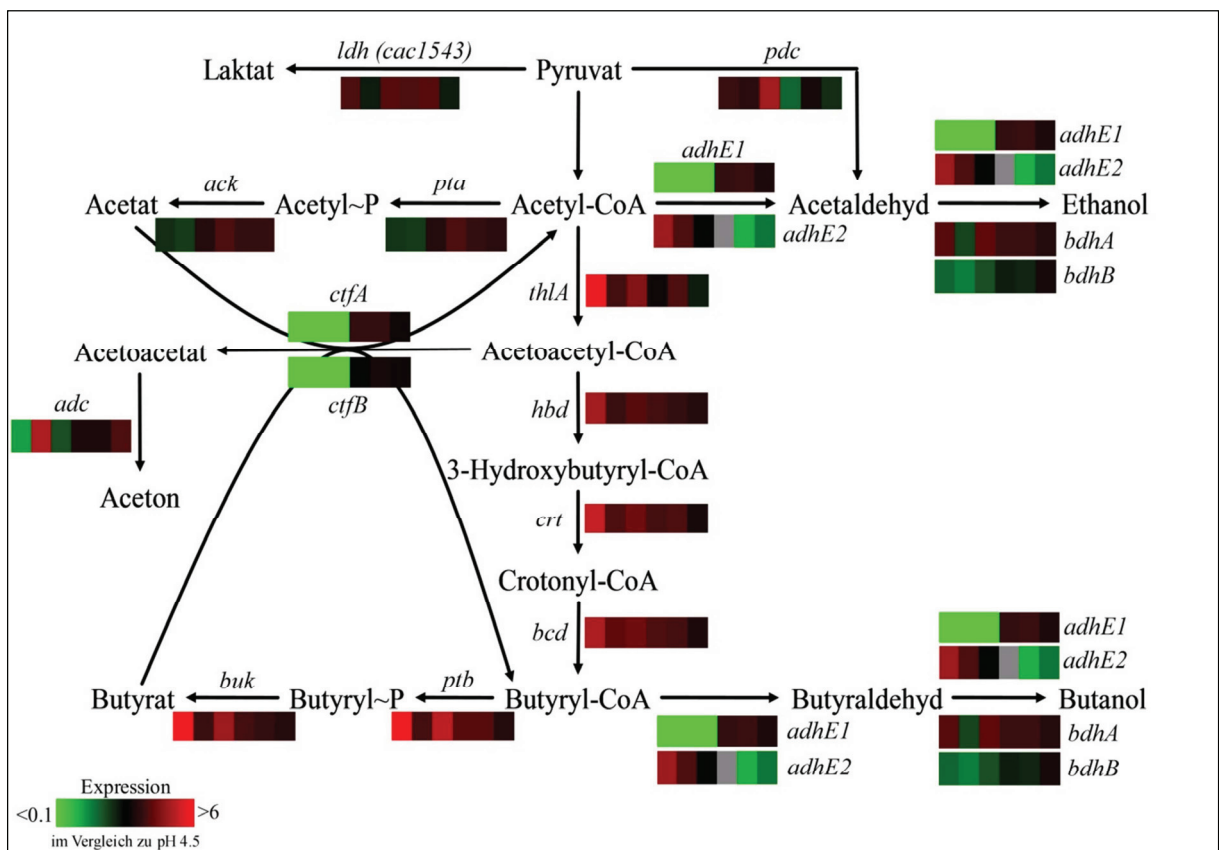


Abb. 4.2: Primärer Stoffwechselweg von *C. acetobutylicum* - Genexpression bei unterschiedlichen *steady state*-pH-Werten. Die RNA aller pH-Stufen wurde mit der Referenz-RNA des pH-Wertes 4,5 hybridisiert. Das erste Farb-Kästchen (von links beginnend) stellt den Vergleich der pH-Stufen 5,7 und 4,5 dar. Die darauffolgenden Farb-Kästchen, stellen die vergleichende Expression bei den pH-Werten 5,5, 5,3, 5,1, 4,9 und 4,7 dar. Die rot dargestellten Expressionswerte gelten als induziert und Grüne als reprimiert in den untersuchten pH-Werten zur verglichenen pH-Stufe 4,5. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund gewählter Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden. *ldh* – Laktatdehydrogenase; *pdc* – Pyruvatdecarboxylase; *ack* – Acetatkinase; *pta* – Phosphotransacetylase; *thl* – Thiolase; *hbd* – 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; *crt* – Crotonase; *bcd* – Butyryl-CoA-Dehydrogenase; *ptb* – Phosphotransbutyrylase; *buk* – Butyratkinase; *ctf* – CoA-Transferase; *adc* – Acetoacetatdecarboxylase; *adhE* – Alkohol-Aldehyd-Dehydrogenase; *bdh* - Butanoldehydrogenase

Zu erwähnen ist auch das Verhalten des generellen Stressproteins „18 kDa heat shock protein“ HSP18 (CAC3714) (Sauer und Dürre, 1993). Obwohl zwischen den Kulturen der End-pH-Werte 5,7 und 4,5 keine signifikante Veränderung auf Protein- (~1,8-fache Erhöhung bei pH 4,5) und Transkriptebene (~2,0-fache Erhöhung bei pH 4,5) festgestellt werden konnte (Janssen *et al.*, 2010), wurde das Protein bei den dazwischenliegenden pH-Werten 5,5 bis 4,7 im *steady state* als signifikant induziert ermittelt (~2,0-2,7-fach). Das auf Proteinebene, unabhängig von den Lösungsmitteln, eine generelle Antwort auf die Änderung des pH-Werts stattfindet, kann an zwei weiteren Beispielen festgehalten werden. Das „Lipase-esterase related protein“ (CAC0816) und eine „Aspartate aminotransferase“ (CAC2832) werden in einer Kultur nach dem Wechsel des pH-Werts von 5,7 auf 5,5 oder 5,3 signifikant reprimiert. Wobei nach dem Wechsel des pH-Werts auf 5,1 bis 4,7 keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Das Protein CAC0816 wird ebenfalls durch einen Phosphatüberschuss reprimiert (Fiedler, 2006), wobei CAC2832 als ein Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängiges Enzym in einem *in silico* Modell für *C. acetobutylicum* als essentiell für das Wachstum auf einem synthetischem Medium herausgestellt wurde (Lee *et al.*, 2008a).

Das die Zellkultur beim *steady state*-pH-Wert 5,1 eine besondere Stellung zwischen Säure- und Lösungsmittelphase einnimmt, kann auch anhand des „Flagellins“ (FlaC, CAC2203) verdeutlicht werden. Das durch starke Glykosylierung post-translational modifizierte Protein (Lyristis *et al.*, 2000), wies in Zellen der pH-Werte 5,5 und 5,3 eine signifikante Repression auf. Kulturen der pH-Werte 4,9 und 4,7 wiesen wiederum erhöhte Mengen des Proteins auf, wie es für die Lösungsmittelphase bei pH 4,5 bereits dokumentiert wurde (Janssen *et al.*, 2010). Interessanterweise konnte für die Kultur beim pH-Wert 5,1 festgestellt werden, dass das FlaC-Protein weder induziert noch reprimiert wurde. Die Kultur des pH-Wert 5,1 nimmt in diesem Fall für das „Flagellin“ eine Zwischenstellung von Säure- (pH 5,7-5,3) und Lösungsmittelphase (pH 4,9-4,5) ein.

4.3.2 *Steady state*-pH 5,1: Transitionsphase?

Auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass in den *steady state*-Zellen bei pH 5,1 die relevanten Enzyme der Lösungsmittelbildung AdhE1, CtfA, CtfB und Adc bereits in den gleichen Mengen vorlagen wie in Zellen der Lösungsmittelphase pH 4,5. Nichtsdestotrotz, bildeten diese Zellen bei pH 5,1 signifikant geringere Mengen an Butanol (pH 5,1: ~25 mM; pH 4,5: ~40 mM) und Aceton (pH 5,1: ~22 mM; pH 4,5: ~40 mM). Diese Erkenntnis deutet auf weitere Regelkreise auf Proteinebene hin, die gegebenenfalls die Proteinaktivitäten der Enzyme modifizieren.

Dabei ist zu erwähnen, dass *C. acetobutylicum* keine pH-Homöostase betreibt, wie es für die Modellorganismen *B. subtilis* oder *E. coli* bekannt ist (Padan *et al.*, 2005; Booth, 1985). Der interne pH-Wert von *C. acetobutylicum* folgt dem externen und ist jeweils eine pH-Stufe höher einzuordnen (Gottwald und Gottschalk, 1985; Terraciano und Kashket, 1986). Bei einem externen pH von 5,1 ist der interne pH daher ~6,1. Für das Enzym „Acetoacetate decarboxylase“ (Adc) wurden pH-Optima von ~5 (Davies, 1943) bzw. ~5,95 (Petersen und Bennett, 1990; Gheshlaghi *et al.*, 2009) dokumentiert. Für die Lösungsmittelphase bei pH 4,5 konnte bereits eine 40-fach höhere Aktivität der

Adc im Vergleich zur Säurephase in einem Chemostaten dokumentiert werden (Andersch *et al.*, 1983). Die Bildung von Aceton ist aber auch abhängig von der Reassimilation der Säuren Acetat und Butyrat (Hartmanis *et al.*, 1984) und dadurch von der Aktivität der Enzyme CtfA und CtfB. Auch für diese Enzyme sind pH-bedingte unterschiedliche Aktivitäten in Butanol-bildenden Clostridien bekannt (Andersch *et al.*, 1983; Chen, 1995; Gheshlaghi *et al.*, 2009). Im Gegensatz zum Enzym Adc, wurde allerdings mit pH 6,4 bis 7,8 ein wesentlich höheres pH-Optimum für die relative *in vitro*-Aktivität von CtfA und CtfB dokumentiert (Wiesenborn *et al.*, 1989). Auch für die Alkohol-Dehydrogenasen von Clostridien, wie die AdhE1 von *C. acetobutylicum*, wurden mit pH-Werten von 6,0 bis 7,8 (Dürre *et al.*, 1987) oder sogar pH 7,5 bis 9,0 (Yan und Chen, 1990) höhere pH-Optima im Vergleich zur Adc festgestellt. Höhere Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenasen für Zellen der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 im Vergleich zur Säurephase konnten ebenso dokumentiert werden (Girbal *et al.*, 1995; Hüsemann und Papoutsakis, 1989). Neben der potentiell eingeschränkten Enzymaktivität ist es ebenso möglich, dass bei pH 5,1 im Vergleich zu pH 4,5 geringere Mengen der dissoziierten Säuren in undissoziierte Säuren umgewandelt werden. Dadurch würde bei pH 5,1 ein geringerer Teil der Säuren in Lösungsmittel umgewandelt werden (Ezeji *et al.*, 2010; Gheshlaghi *et al.*, 2009).

Insgesamt ist zu erkennen, dass sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene die Zellen der Kultur pH 5,1 bereits eine Lösungsmittelphase reflektieren. Nichtsdestotrotz ist durch die geringere Endproduktbildung von Butanol und Aceton ersichtlich, dass der pH-Wert 5,1 für die Zellen unter den hier getesteten Bedingungen eine eminent wichtige Rolle einnimmt. Die Zellen sind trotz genetischer Ausstattung nicht in der Lage eine vollkommene Produktbildung einer klar definierten Lösungsmittelphase zu erzielen.

4.4 Butanolstress für Zellen der Säurephase pH 5,7

Anhand der hier gewählten Kulturführung ließ sich nicht unterscheiden, ob Gene durch den Wechsel des pH-Wertes von 5,7 auf 4,5 oder aufgrund des neu gebildeten Butanols, welches toxisch auf die Zellen in der Lösungsmittelphase wirkt, eine Veränderung in ihrer Transkription aufwiesen. Um dies unterscheiden zu können sind zwei Ansätze denkbar: (1) ein pH-Wert-Wechsel einer Kultur von 5,7 auf 4,5 ohne die Lösungsmittelbildung auszulösen (Bahl und Gottschalk, 1984) und die einhergehende Untersuchung der pH-bedingten Transkription der Gene oder (2) die Applikation einer signifikanten Menge an Butanol (Butanolstress) zu Zellen der Säurephase bei pH 5,7. Wobei die Transkription der Gene nach einem Butanolstress bei pH 5,7, mit dem Transkriptmuster von Zellen der Lösungsmittelphase pH 4,5 zu vergleichen wären. Gene dessen Expression unter pH 4,5 direkt durch Butanol beeinflusst werden, sollten diese Antwort auch bei pH 5,7 nach Butanolzugabe zeigen. Außerdem könnten Gene aufgedeckt werden, dessen Transkription bei pH 4,5 eine Beeinflussung zeigt und nach der Butanolzugabe bei pH 5,7 unverändert ist. Diese Gene können dann einer pH-bedingten Regulation zugeordnet werden.

Für die Bearbeitung dieser Frage ist die Butanolzugabe bei pH 5,7 gewählt worden. Butanolstress ist zuvor bei kontinuierlich wachsenden Zellen noch nicht untersucht worden. Diese Anwendung hatte

ebenso den Vorteil, dass in der Säurephase durch die Zugabe von Butanol nur ein Parameter in Form der Endprodukte (Butanol) geändert wurde und alle anderen Parameter stabil blieben. Dadurch konnte der Butanolstress unabhängig einer sich ändernden Zellmorphologie (z. B. Granulosebildung) und vor allem einsetzender Sporulation, wie es in Batch-Kulturen gegeben ist, untersucht werden. Bereits dokumentierte Butanolstress-Experimente unter Verwendung von Batch-Kulturen konnten zusätzlich als Vergleich herangezogen (Alsaker *et al.*, 2010; Tomas *et al.*, 2004).

4.4.1 Beeinflussung der Gentranskription durch Butanol

Insgesamt zeigten über 350 Gene eine Beeinflussung ihrer Transkription nach der Butanolzugabe in der Säurephase bei pH 5,7. Ein besonderes Augenmerk wurde aber vor allem auf die Gene gelegt, welche in Zellen definierter Lösungsmittelbildung bei pH 4,5 eine Beeinflussung ihrer Transkription im Vergleich zu pH 5,7 zeigten. Von insgesamt 136 untersuchten Genen, die entweder eine signifikante Induktion (84) oder Repression (52) bei *steady state*-pH 4,5 gegenüber *steady state*-pH 5,7 zeigten, wurden 44 Gene durch die Zugabe von Butanol in der Säurephase pH 5,7 signifikant beeinflusst, 19 Gene induziert und 25 Gene reprimiert.

Darunter zeigte interessanterweise das *sol* Operon (*adhE1-ctfA-ctfB*) eine butanolabhängige Induktion. Eine Induktion des *sol* Operon konnte ebenso in Butanol-gestressten Zellen einer Batch-Kultur gezeigt werden (Tomas *et al.*, 2004). Allerdings sei anzumerken, dass die Induktion durch das Butanol wesentlich geringer ausfiel als in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 und auch nur für einen kurzen Zeitraum anhielt. Die Transkription des *sol* Operon ist daher nicht nur vom Butanol allein abhängig, sondern hat ebenfalls einen Bezug zum abgesenkten pH. Dies ist anhand der Transkriptmessungen für das *sol* Operon, während des dynamischen pH-„Shifts“ in kontinuierlichen Kulturen zu erkennen (Grimmler *et al.*, 2010; Sauer und Dürre, 1995). Dabei zeigt sich, dass das *sol* Operon bereits während des Absinkens des pH-Wertes stark induziert wird, obwohl noch kein Butanol im Kulturüberstand messbar ist.

Eine hohe Anzahl an Butanol-gestressten Genen, kodieren für Membranproteine, Permeasen oder ABC Transporter. Diese Beobachtung erscheint wenig verwunderlich, aufgrund der chaotropen Wirkung des Butanols und der damit einhergehenden Beeinflussung der Zellmembran. Dabei zerstört Butanol die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Zellmembran und sorgt damit für eine veränderte Membran-Fluidität (Gheshlagi *et al.*, 2009). Einhergehend mit der beeinflussten Membran-Fluidität kommt es zu einer veränderten Lipidzusammensetzung (Baer *et al.*, 1987; Lepage *et al.*, 1987; Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984) und einer sich ändernden Zusammensetzung von verzweigten und unverzweigten Fettsäuren. Dies lässt sich auch anhand der starken Expression des putativen *ilv-leu* Operon (*cac3169-3174*) nach der Butanolapplikation aufzeigen. Die Genprodukte sind in den Stoffwechsel der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin involviert. In *B. subtilis* wurde gezeigt, dass diese verzweigt-kettigen Aminosäuren in verzweigt-kettige Fettsäuren umgewandelt werden können und somit die Membran stabilisieren (Mansilla *et al.*, 2004). Im Umkehrschluss konnte nach einem Kälteschock eine starke Repression dieser Gene verzeichnet werden (Kaan *et al.*, 2002). Auch

in Batch-Kulturen konnte gezeigt werden, dass die Gene *cac3169-3174* mit „Beginn der Lösungsmittelphase“ stark induziert werden und die Zelle dadurch möglicherweise auf die veränderte Membran-Fluidität reagiert (Alsaker und Papoutsakis, 2005; Jones *et al.*, 2008). Durch diese Neustrukturierung der Membran müssen vor allem die erwähnten Membranproteine, Permeasen oder ABC Transportsysteme neu synthetisiert werden. Hinzu kommt, dass reprimierte Transportsysteme durch äquivalente Aufnahmesysteme ersetzt werden müssen. Bereits bei pH 4,5 in der Lösungsmittelphase wurden Gene dieser Kategorie induziert (z. B. *cap0102*, *cap0128* und *cac1322*) oder reprimiert (z. B. *cac0427-0430*, *cac3237-3236*) und daher gegensätzlich transkribiert. Dadurch ist bei diesen Genen eine klare Beeinflussung der Transkription durch das gebildete Butanol und nicht aufgrund des geänderten pH-Wertes nachzuvollziehen. Neben den genannten Kandidaten hatten noch etwa 50 weitere Gene dieser Kategorie eine signifikante Transkriptbeeinflussung durch das Butanol. Ein Beispiel für einen gegensätzlichen Transkriptionseffekt, sind die Gene des Glycerolstoffwechsels. Das putative Operon des ABC Transporter *cac0427-0430*, welches für die Aufnahme von Glycerol-3-phosphat verantwortlich ist (Nölling *et al.*, 2001), weist eine extrem starke Repression durch das Butanol auf. Diesem Verlust des Aufnahmesystems wird anscheinend durch die starke Expression eines Transportsystems für Glycerol (*glpF*, *cac1319*), einer „Glycerol kinase“ (*glpK*, *cac1321*), welche das Glycerol nach der Aufnahme phosphorylieren kann, und einer „Glycerol dehydrogenase“ (*glpA*, *cac1322*), die Glycerol in Glyceraldehyd-3-phosphat umwandeln kann, entgegengewirkt. Weitere Gene mit gegensätzlicher Transkription sind „Beta-Glucosidasen“. Während die Gene *cac1405* und *cac1075* eine starke Induktion nach der Butanolzugabe aufweisen, zeigte das auf dem pSOL1 kodierte Gen *cap0010* keine Reaktion hinsichtlich Butanolstress. Auch für die Gene der „Lactate dehydrogenase“ (*cac0267*; *cac1543*) oder einer „Predicted acetyltransferase“ (*cac2840*; *cac2487*) wurde eine gegensätzliche Reaktion verzeichnet. Während *cac0267* und *cac2487* stark durch Butanol induziert werden, zeigt *cac1543* keine Beeinflussung oder *cac2840* sogar eine signifikante Repression.

Nicht überraschend war die starke Expression verschiedener Gene, die für Stressproteine kodieren, wie z. B. *hsp18* (*cac3714*), *hspG* (*cac3315*), das *groEL-groES* Operon (Narberhaus und Bahl, 1992) und das Stress-Operon *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* (Narberhaus *et al.*, 1992). Die Genprodukte nehmen als Chaperonine eine allgemein schützende Funktion gegenüber verschiedenen Stressoren ein. Das Gen *hsp18* und dessen Produkt weisen nach Hitzestress oder mit dem „Beginn der Lösungsmittelphase“ eine erhöhte Induktion auf (Pich *et al.*, 1990; Sauer und Dürre, 1993). Auch nach Butanolstress in Batch-Kulturen weisen die Gene der „heat-shock proteins“ eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge auf. In *Lactobacilli* und *C. acetobutylicum* konnte sogar durch die Überexpression solcher Stress-Proteine eine erhöhte Butanoltoleranz und -produktion erreicht werden (Fiocco *et al.*, 2007; Tomas *et al.*, 2003b).

4.4.2 Beeinflussung der Gentranskription durch den pH-Wert

Gene dessen Transkriptmenge in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) gegenüber der Säurephase (pH 5,7) eine signifikante Erhöhung oder Verringerung zeigten, aber durch Butanolstress keine Veränderung aufwiesen, waren in ihrer Transkription vom pH-Wert abhängig. Ein sinkender pH-Wert kann dabei für die Zellen Säurestress bedeuten, welche in der Folge Abwehr- bzw. Gegenmaßnahmen, wie z. B. eine Änderung des Stoffwechsels, einleiten. Die Änderung des Stoffwechsels bei *C. acetobutylicum* durch eine gewisse Menge an vorliegenden Säuren im Medium, lässt sich anhand der Initiation der pH-abhängigen Transkription des für die Lösungsmittelbildung verantwortlichen *sol* Operon erläutern. In einer kontinuierlichen Kultur unter Niedrig-Phosphat (0,16 mM) werden trotz Absenkung des pH-Werts keine Lösungsmittel produziert (Bahl und Gottschalk, 1984). Dies ist auf die zu geringen Mengen an gebildeten Säuren Acetat und Butyrat in der Säurephase zurückzuführen. Beim Wechsel des pH-Werts treten daher weniger undissoziierte Säuren über die Membran in die Zelle, so dass ein gewisser Schwellenwert zur Reassimilation der Säuren nicht erreicht wird. Dieser Schwellenwert steht wahrscheinlich innerhalb der Zelle mit dem vorliegenden Butyryl-Phosphat in Zusammenhang (Zhao *et al.*, 2005). Unter „Normal“-Bedingungen treten hohe Mengen an undissoziierten Säuren in die Zelle ein. In Folge eines Gleichgewichts, zwischen einfließenden und neugebildeten Säuren, produziert die Zelle weniger neue undissoziierte Säuren. Dies wiederum zieht einen Stau des Vorläufers Butyryl-Phosphat in der Zelle nach sich. Diese hohe Menge an Butyryl-Phosphat dient sehr wahrscheinlich als Phosphat-Donor für potentielle Transkriptionsregulatoren deren Aktivität von einer Phosphorylierung abhängt, wie z. B. SPO0A(~P) (Brown *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2005).

Dadurch lässt sich ebenfalls die erwähnte kurzfristige Transkripterhöhung des *sol* Operon nach Butanolzugabe erklären. Durch den bereits angesprochenen chaotropen Effekt des Butanols auf die Zellmembran (Gheshlagi *et al.*, 2009), wird diese eventuell für einen kurzen Zeitraum für dissoziierte Säuren durchlässig. Durch diese Diffusion der Säuren in die Zelle wird die potentielle Kaskade über Butyryl-Phosphat bis zu einem Transkriptionsregulator möglicherweise kurzfristig gestartet und das *sol* Operon induziert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Acetat- oder Butyratstress in Batch-Kulturen die Transkription des *sol* Operon ebenfalls signifikant induziert (Alsaker *et al.*, 2010) und am Ende des Wachstums zu einer signifikant erhöhten Sporulation führt (Rieger, 2006).

Gene deren Transkription eindeutig von einem sinkenden pH-Wert und daher von den einfließenden undissoziierten Säuren bei pH 4,5 und nicht vom Butanol abhängig ist, sind u. a. die Gene des Cellulosoms (*cac0910-0913*, *cac3469*, *cac0826*), des Xylanmetabolismus (*cap0054-0053*, *cap0116*, *cap0117*, *cap0118*, *cap0119* und *cac2396*), das Gen *cac2517* („Extracellular neutral metalloprotease“), und das Operon *cap0037-0036*. Die Gene des Cellulosoms und *cac2517* zeigten eine extrem starke Induktion (bis ~125-fach) bei pH 4,5 und die Gene des Xylanmetabolismus waren bis zu ~20-fach induziert. Das Operon *cap0037-0036* zeigte bei pH 4,5 eine ~200-fache Repression der Transkription gegenüber pH 5,7.

Auch die Gene des primären Stoffwechsels (*buk*, *ptb*, *etfA*, *bcd*, *crt*) unterliegen einer pH-abhängigen Regulation ihrer Transkription. Diese Erkenntnis wird durch das Ergebnis des *steady state*-

Transkriptom bei pH 5,5 und pH 5,3 bestätigt. Denn bei diesen *steady state*-pH-Werten konnte noch kein Butanol nachgewiesen werden, aber die genannten Gene zeigten signifikante Änderungen der Transkription gegenüber einer Kultur bei pH 5,7. Eine große Anzahl an Genen dessen Produkte „Hypothetical proteins“ (*cap0044*, *cap0112*, *cac1314*, *cac2293*, *cac3167*, *cac3612*, *cac3693*) oder „Glycosyltransferases“ (*cap0045*, *cac2404*, *cac2405*, *cac2408*) sind, wurden durch ebenfalls den niedrigeren pH induziert. Auch einige „Transcriptional regulators“ (*cap0040*, *cap0149*, *cac0186*, *cac0360*, *cac1214*, *cac3695*) u. a. der bereits erwähnten „Xre-family“ (siehe oben), konnten mit einer pH-bedingten Transkriptveränderung dokumentiert werden. Auch die bereits erwähnte „Beta-glucosidase“ *cap0010*, zusammen mit seinem putativen „Response regulator“ *cap0009* sind in der Lösungsmittelphase bei pH 4,5 als signifikant induziert, zeigten nach Butanolzugabe aber keinen Einfluss ihrer Transkription.

4.5 Die Indikatorkandidaten: *cap0037-0036*

Durch die angefertigten Transkriptom- und Proteomanalysen konnten das Operon *cap0037-0036* und die dazugehörigen Proteine CAP0037 und CAP0036 als Markerkandidaten der Säurephase pH 5,7 herausgestellt werden. Dies muss als umso bemerkenswerter gelten, da diese Proteine bisher keinerlei auffällige Spuren in der Literatur hinterließen. Im anschließenden Butanolstress-Experiment konnte festgestellt werden, dass ihre Expression offensichtlich strikt vom externen pH-Wert abhängt und unabhängig vom dazugegebenen Butanol ist.

Die erste Auffälligkeit der Proteine CAP0037 und CAP0036 ist, dass beide Polypeptide in den 2D-Gelen mit mehreren Proteinspots detektiert wurden. Diese Erkenntnis könnte auf eine post-translationale Modifikation des Proteins schließen, z. B. durch Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung oder Methylierung. Solche post-translationalen Modifikationen konnten bereits für *C. acetobutylicum*, als auch in anderen prokaryotischen Organismen, aufgezeigt werden (Balodimos *et al.*, 1990; Janssen *et al.*, 2010; Lyristis *et al.*, 2000; Rosen and Ron, 2002; Rosen *et al.*, 2004; Schaffer *et al.*, 2002; Sullivan und Bennett, 2006).

In silico Analysen für das Protein CAP0037 sagten eine Transmembran-Domäne (TMHMM2-Programm; Krogh *et al.* 2001) am C-Terminus hervor, während CAP0036 eine „Domain of unknown function“ (DUF583) aufweist (Nölling *et al.*, 2001). Homologe Gene scheinen dagegen auf Gram-positive Bakterien beschränkt zu sein (Karp *et al.*, 2005). Interessanterweise besitzt auch nur ein weiterer Clostridium-Stamm (*C. difficile*) ein homologes putatives Operon. Der Stamm *C. phytofermentans* weist dagegen nur für das Gen *cap0036* und *C. botulinum* nur für *cap0037* ein jeweils einzelnes Homolog auf. Homologe putative Operonstrukturen sind vor allem in *Bacilli*-Stämmen nachweisbar. Zum Beispiel in *B. subtilis* ist *cap0037-cap0036* homolog mit *yhbD-yhbE* (auch genannt: *ygaS-ygaT*). Aber auch in *B. thuringiensis*, *B. cereus* und *B. licheniformis* sind putative Operonstrukturen in gleicher Genreihenfolge vorhanden. Nur in dem toxischem Stamm *C. difficile* ist die Anordnung der homologen Gene vertauscht. Auffällig ist auch, dass in vielen Bakterien die homologen Gene in putativen Operonstrukturen mit bis zu 6 Genen auffindbar sind. Zum Beispiel sind

in *B. subtilis* die Orthologe in einem tricistronischem Operon eingebettet (*yhbD-yhbE-yhbF*) (Flórez *et al.*, 2009) (Abb. 4.3). Darüber hinaus sind die Gene *yhbD*, *yhbE* und *yhbF* und dessen Homologe nur in den Genera *Bacilli* und *Clostridia* auffindbar. Dadurch kann ihnen eine potentielle Rolle in der Sporulation zugesprochen werden (Lai *et al.*, 2003).

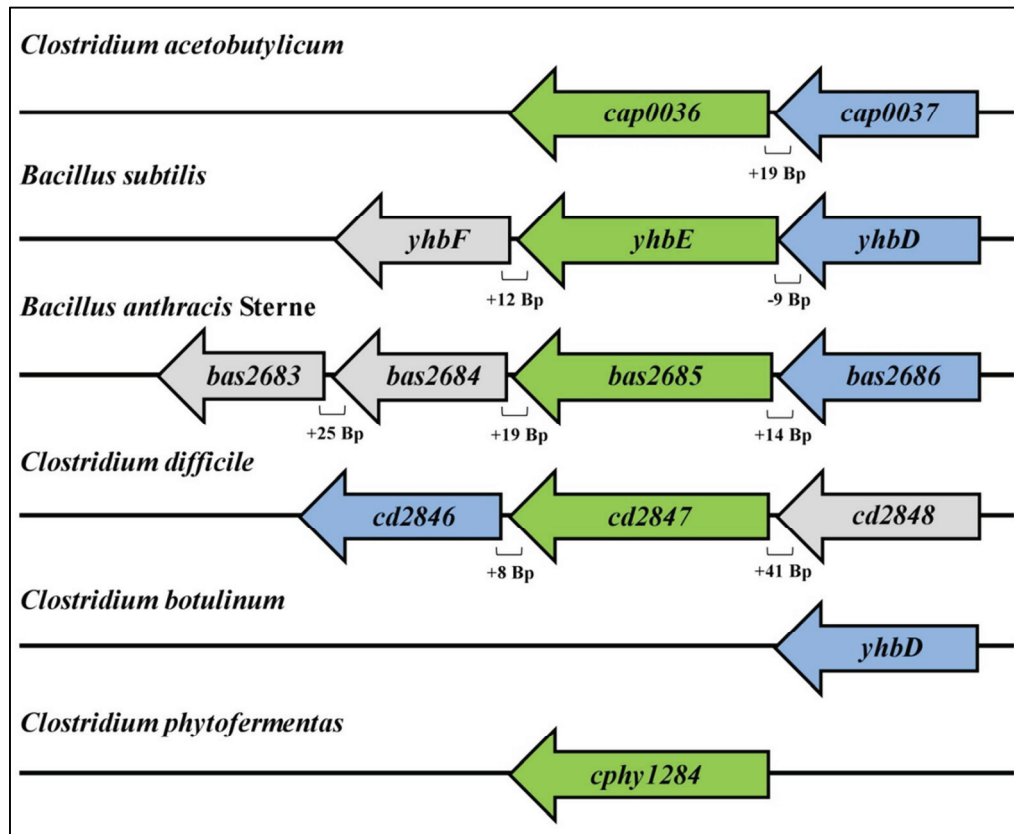


Abb. 4.3: Schematische Organisation der Gene *cap0037* und *cap0036* und dazugehörige Orthologe aus verschiedenen Organismen der Genera *Clostridia* und *Bacilli*. Zueinander gehörende Orthologe sind farblich (blau – Orthologe von *cap0037*; grün – Orthologe von *cap0036*) hinterlegt. Weitere Gene in putativen Operonstrukturen sind grau hinterlegt. (Größenordnungen der einzelnen Gene nicht maßstabsgetreu)

Weiterhin konnte in Klonierungsexperimenten gezeigt werden, dass der einzelne ORF *yhbF* aus *B. subtilis* ein Defizit im Wachstum von *E. coli* (Stamm LBG1605) hervorruft bei Verwendung von Mannitol als einziger Kohlenstoffquelle (Fischer *et al.*, 1995). Die genaue Funktion des Operon *yhbD-yhbE-yhbF* ist auch in *B. subtilis* noch nicht geklärt (Flórez *et al.*, 2009). Allerdings konnten mittels Promotorbindestudien die Proteine *yhbE* und *yhbF* nach osmotischem Stress oder Kälteschock an der Promotorregion des Gens *yocH* aus *B. subtilis* gefunden werden, ohne dass die Relevanz oder die Spezifität dieser Bindung geklärt wurde (Seibert, 2009).

Die eingeschränkte Verbreitung von homologen Proteinen lässt auf eine individuelle Funktion von CAP0037 und CAP0036 in *C. acetobutylicum* schließen. Bisher konnte dokumentiert werden, dass die Proteine CAP0037 und CAP0036 als potentielle Regulatoren der „Acetoacetate decarboxylase“ (Adc) fungieren (Dürre, 2008b; Schiel, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass CAP0037 an der Promotorregion von *adc* bindet und daher wurde auch die Bezeichnung AdcR (Adc Repressor)

abgeleitet. Für CAP0036, bezeichnet als AdcS, konnte ebenso eine schwache Bindung an den Promotorbereich von *adc* nachgewiesen werden. Gleichzeitig wird postuliert, dass AdcS die Bindung von AdcR an die Promotorregion geringfügig unterbindet. AdcS wird daher als antagonistisch fungierendes Protein zu AdcR angesehen und daher als Transkriptionsaktivator für das Gen *adc* beschrieben (Dürre, 2008b).

Allerdings ist in Frage zu stellen, ob die potentielle Repressorfunktion von CAP0037 (AdcR) durch CAP0036 (AdcS) unter den hier gewählten Wachstumsbedingungen unterbunden wird. Die in dieser Arbeit angefertigten 2D Gele wiesen beide Proteine (AdcR und AdcS) in hohen Mengen in der Säurephase auf, in der die „Acetoacetate decarboxylase“ (Adc) nur sehr schwach detektiert wurde. In diesem Fall wird ersichtlich, dass das Protein AdcS eine potentielle Repression des Gens *adc* durch das Protein AdcR nicht unterbindet. Diese Erkenntnisse werden durch die Transkriptomdaten des dynamischen pH-„Shifts“ von Grimmer *et al.* (2010) bestätigt. Das Gen *adc* zeigte ab einem dynamischen pH 4,9 eine signifikant erhöhte Transkriptmenge (~8,0-fach) gegenüber der Kultur bei pH 5,8, obwohl das Operon *cap0037-0036* über den gesamten dynamischen pH-„Shift“ hinweg bis zum Erreichen des *steady-state* von pH 4,5 sehr stark induziert war (>20,0-fach). Eine alleinige Regulation von *adc* durch das Zusammenspiel von CAP0037 und CAP0036 auf Transkriptebene, ist unter den hier gewählten Bedingungen einer kontinuierlichen Kultur damit unwahrscheinlich.

Insgesamt sei noch zu erwähnen, dass die hohe Proteinmenge an CAP0037 und CAP0036 ebenfalls gegen eine Regulatorfunktion unter den hier gewählten Kulturbedingungen spricht. Eine Möglichkeit der hohen Proteinmenge von CAP0037 und CAP0036 könnte sein, dass sie mehrere verschiedene Funktionen erfüllen und daher als „moonlighting“ Proteine klassifiziert werden könnten. Dies sind Proteine, die unterschiedliche, scheinbar in keinem Zusammenhang stehende, Funktionen in unterschiedlichen Zellkompartimenten ausüben können (Jeffery, 1999). Für den mit *C. acetobutylicum* eng verwandten pathogenen Stamm *C. perfringens*, konnte kürzlich solch eine „moon-lighting“ Funktion eines Proteins aufgedeckt werden. Das Protein des primären Stoffwechsels EtfA („Electron transfer flavoprotein alpha-subunit“), dessen Gen im Operon *crt-bcd-etfB-etfA* eingebettet ist, übernimmt allgemein in Clostridien eine Funktion zur Energiekonservierung bei der Umwandlung von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA (Herrmann *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Nun konnte gezeigt werden, dass EtfA in *C. perfringens* auch die Funktion einer „Dipicolinic acid synthase“ einnimmt und für die Synthese der Dipicolin-Säure der Sporen verantwortlich ist (Orsburn *et al.*, 2010).

Das CAP0037 ebenfalls in die Kategorie „moon-lighting“ eingestuft werden kann, dafür spricht die Transmembran-Bindedomäne. Das Protein kann aber in hohen Mengen im cytosolischem Proteom detektiert werden. Auch ist es nicht auszuschließen, dass bedingt durch die gewählte Kulturführung unter Phosphatlimitierung, diese Proteine synthetisiert werden. Insgesamt bleibt daher die Rolle der Proteine CAP0037 und CAP0036 während der Säurephase und dessen eindeutige Repression während der Lösungsmittelphase in einer phosphatlimitierten kontinuierlichen Kultur ungeklärt. Um die spezifische Expression des Operon *cap0037-0036* hinsichtlich der gewählten Kulturbedingungen zu klären, wären kontinuierliche Kulturführungen unter anderen Limitierungen außer Phosphat

wünschenswert, wie z. B. Glukose-, Magnesium-, Sulfat- oder Eisenlimitierung. Um mehr Informationen über die Proteine CAP0037 und CAP0036 und deren potentielle Rolle für *C. acetobutylicum* unter Phosphatlimitierung zu klären, wurde eine Analyse (Wachstum, Proteom und Transkriptom) einer *cap0036*_Integrante (*cap0036*_Int) durchgeführt.

4.5.1 Mutante *cap0036*_Int: Wachstum

Die Mutante *cap0036*_Int zeigt im Verlauf von kontinuierlichen Kulturen keinen signifikanten Phänotyp hinsichtlich ihres Wachstums unter Phosphatlimitierung auf. Die optischen Dichten und untersuchten Fermentationsprodukte stimmten mit denen des Wildtyps in Säure- und Lösungsmittelphase überein. Dagegen zeigte die Mutante *cap0036*_Int in einer klassischen Batch-Kultur gegenüber dem Wildtyp, nach 66 h bei einer identischen optischen Dichte von $\sim 4,0$, eine signifikant frühere Initiation der Lösungsmittelbildung auf. Die Butanolbildungsrate war zu diesem Zeitpunkt in der Mutante *cap0036*_Int mit $2,2 \text{ mM/h}^{-1}$ mehr als 2,0-fach gegenüber dem Wildtyp ($1,05 \text{ mM/h}^{-1}$) erhöht.

Ein signifikant früherer Beginn der Lösungsmittelbildung konnte bisher auch schon in anderen ClosTron[®]-Knock-Out-Mutanten festgestellt werden, so in den Mutanten *ppx*_Int (*cac0621*) und *ppk*_Int (*cac0622*) (Samel, 2007). Die betroffenen Genprodukte der „Exopolyphosphatase“ (*cac0621*) und „Polyphosphatase kinase“ (*cac0622*) wird eine potentielle Funktion an der Polyphosphatspeicherung in *C. acetobutylicum* zugesprochen. Bei einer Fehlfunktion im Auf- und Abbau von Polyphosphaten, könnte in der Zelle ein erhöhter Pool an freien P_i entstehen. Diese freien Phosphate würden potentiellen Phosphorylierungen von Regulatoren der Lösungsmittelbildung, wie z. B. SPO0A($\sim P$), zur Verfügung stehen und dadurch einen früheren Beginn der Lösungsmittelbildung nach sich ziehen. Nichtsdestotrotz ist die genaue Regulation der früheren Lösungsmittelbildung in der Mutante *cap0036*_Int ungeklärt. Bisher ist bekannt, dass AdcR als potentieller Repressor für das Gen *adc* fungiert und eine Überexpression des AdcR-Proteins zu geringeren Mengen von 0,1 mM an Aceton gegenüber dem Wildtyp mit 6,4 mM führt (Dürre, 2008b; Schiel, 2006). Dieser Aspekt würde natürlich erklären, dass bei einem Verlust des Proteins AdcR die Acetonproduktion früher beginnt. Allerdings erklärt dieser Sachverhalt nicht die frühere Induktion der Butanolbildung.

4.5.2 Mutante *cap0036*_Int: Proteom und Transkriptom

4.5.2.1 Funktionelle Doppelmutante *cap0036*_Int

Anhand der 2D Gel Analysen der Mutante *cap0036*_Int ließ eindeutig zeigen, dass es sich bei diesem Stamm um die erste dokumentierte funktionelle ClosTron[®]-Doppel-Knock-Out Mutante von *C. acetobutylicum* handelt (Heap *et al.*, 2007). Die Zellen der Kultur *cap0036*_Int wiesen in der Säurephase weder das Protein CAP0036 noch CAP0037 auf. Dieser funktionelle Doppel-Knock-Out des Operon *cap0037-0036* konnte auf Transkriptebene bestätigt werden. Auch mittels der DNA Micro Array Analyse waren keine Transkripte für *cap0037* und *cap0036* mehr nachweisbar. Die Tatsache,

dass das Gen *cap0037* nicht mehr transkribiert wird, war überraschend. Im bicistronischen Operon *cap0037-0036* erfolgte die Integration der Erythromycin-Resistenzkassette am Operonende in das Gen *cap0036*, mit maßgeblich nachteiligen Effekten auf das erste Gen *cap0037*. Es kann spekuliert werden, ob das verkürzte mRNA-Transkript vom *cap0037-0036* Operon eine veränderte Faltung annimmt und dadurch die Halbwertszeit der mRNA (mRNA-„half life“) rapide abnimmt. Dies hätte den Effekt, dass neben dem Verlust von CAP0036, ebenso keine *cap0037*-mRNA translatiert werden würde. Aber unter der Voraussetzung, dass Transkription und Translation parallel ablaufen, würde es zu keinem mRNA-Abbau eines falsch gefalteten *cap0037*-mRNA-Strangs kommen und das Protein CAP0037 müsste detektierbar sein. Dadurch lassen sich weitere Theorien für den Verlust des Proteins CAP0037 in der Mutante *cap0036_Int* diskutieren, wobei das gleichzeitige Auftreten beider Proteine in der Säurephase des Wildtyps berücksichtigt ist.

(1): Das Protein CAP0036 fungiert autoregulatorisch alleine als Aktivator der Transkription des eigenen Operon. Die Regulation der Transkription eines Operons durch ein eigenes Genprodukt ist durchaus bekannt. Das *dnaK*-Operon von *Streptomyces coelicolor* wird durch das letzte Genprodukt des Operon, das Protein HspR, autoregulatorisch reprimiert (Bucca *et al.*, 1997). In *C. acetobutylicum* und vielen anderen Bakterien ist eine Autoregulation der „Heat shock genes“ durch den Repressor HrcA ebenso bekannt (Babst *et al.*, 1996; Bahl *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1995).

Die andere Möglichkeit ist (2): Das Protein CAP0037 reprimiert durch eine alleinige Bindung an den Promotorbereich die Transkription und CAP0036 hebt diese Bindung durch eine Komplexbildung CAP0037/0036 wieder auf. Eine ähnliche Autoregulation ist in *Streptomyces lividans* für das Operon *tipAL-tipAS* unter der Wirkung des Effektors (Antibiotikum Thiostrepton) dokumentiert (Murakami *et al.*, 1989; Holmes *et al.*, 1993). Dabei bindet das Protein TipAL an den Promotor des eigenen Operon *tipAL-tipAS* und fungiert als hier Aktivator. Das zweite Protein des Operon TipAS bindet hingegen das Protein TipAL und reguliert dadurch dessen Funktion als Aktivator. Bei Zugabe von Thiostrepton bindet nun TipAS das Thiostrepton, wodurch TipAL frei wird und als Aktivator fungiert. In der Folge kommt es zur signifikanten Transkripterhöhung des *tipAL-tipAS* Operon. Dieses Zusammenspiel ist eventuell auch für CAP0037/CAP0036 denkbar. Allerdings kann unter den hier durchgeführten Studien nicht geklärt werden, welcher potentielle Effektor beim Wechsel des pH-Wertes einen Einfluss auf CAP0037/CAP0036 haben könnte. Hinzu kommt, dass zumindest CAP0037 an die Promotorregion des eigenen Operon *cap0037-0036* bindet, was in Promotorbindestudien *in vitro* gezeigt werden konnte (Linder, 2010). Dagegen ist über eine Bindung von CAP0036 nichts bekannt, auch nicht wie die Bindung von CAP0037 durch potentiell vorhandenes Protein CAP0036 beeinflusst wird.

Daher ist (3) ebenso möglich: Eine Induktion des Operon nur durch eine Komplexbildung beider Proteine CAP0037/CAP0036, durch dessen gemeinsame Bindung an den Promotorbereich des eigenen Operon. Um herauszufinden, ob die Proteine CAP0037 und CAP0036 allerdings überhaupt einen Komplex bilden, könnten z. B. 2D Blue Native Analysen der Säurephase vom Wildtyp durchgeführt werden (Camacho-Carvajal *et al.*, 2004).

4.5.2.2 Sporulationsgene und das Protein Adc

Eine weitere Auffälligkeit der Mutante *cap0036_Int* gegenüber dem Wildtyp ist, dass eine hohe Anzahl von Sporulationsgenen bzw. verantwortliche Sigmafaktoren (z. B. *spoVR*, *spoIIGA*, *spoIIID*, *sigE*, *sigF* und *sigG*) und das Protein Adc („Acetoacetate decarboxylase“) in der Säurephase signifikant induziert waren. Diese Induktion ist überraschend, da unter den gewählten kontinuierlichen Bedingungen im Wildtyp die Sporulation und Acetonbildung nicht ausgelöst wird. In einer Batch-Kultur werden all die genannten Sporulationsgene mit Beginn der Sporulationskaskade signifikant induziert und lösen damit die Sporulation aus (Jones *et al.*, 2008). Die Expression der Sporulationsgene wird in *B. subtilis* und *C. acetobutylicum* (hier auch das Gen *adc*) direkt oder indirekt durch das Protein SPO0A(~P) reguliert (Molle *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2005). Das Gen *spo0A* (*cac2071*) zeigte aber unter den hier gewählten Bedingungen keinerlei Beeinflussung auf Transkriptebene. Das Protein SPO0A wiederum wird durch eine Phosphorylierung aktiviert und agiert daraufhin als Regulator an Promotoren, welche durch das Protein kontrolliert werden (Hoch, 1993; Molle *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2005). Für *C. acetobutylicum* wird vermutet, dass Phosphorylierungen auf SPO0A(~P) direkt durch Intermediate wie Butyryl- oder Acetyl-Phosphat (Rieger, 2006; Zhao *et al.*, 2005) übertragen werden oder, wie in *C. botulinum* gezeigt, direkt über eine Histidin-Kinase (Wörner *et al.*, 2006). Denn in Clostridien ist ein „Multi-component phosphorelay“ zur Initiation der Sporulation über mehrere Kinasen, wie z. B. in *B. subtilis* (Piggot and Hilbert, 2004), nicht bekannt (Paredes *et al.*, 2005). Das SPO0A in der Säurephase der Mutante *cap0036_Int* bereits phosphoryliert als SPO0A~P vorliegt und damit die Sporulationsgene (~3,2-5,6-fach) oder *adc* (~2,3-fach) induziert, ist aber eher unwahrscheinlich. Denn es ist bekannt, dass SPO0A~P auch das *sol* Operon (*adhE1-ctfA-ctfB*) auf Transkriptebene signifikant induziert (Alsaker und Papoutsakis, 2005; Jones *et al.*, 2008). In der Mutante *cap0036_Int* wurde aber keine Transkriptveränderung dieses Operons verzeichnet. Hinzu kommt, dass das Gen einer „Sensory transduction histidine kinase“ (*cac3319*), die im Verdacht steht durch direkte Phosphorylierung von SPO0A die Sporulation auszulösen (Young, 2008), signifikant in der Säurephase der Mutante *cap0036_Int* reprimiert ist. Auch diese Erkenntnis unterstützt die Annahme, dass SPO0A in der Säurephase der Mutante nicht phosphoryliert vorliegt. Man kann daher vermuten, dass CAP0037 und/oder CAP0036 alternative Regulatoren darstellen, nicht nur wie bereits für *adc* angedeutet (Dürre, 2008b; Schiel, 2006), sondern auch direkt oder indirekt im Zusammenspiel mit Sigmafaktoren von verschiedenen Sporulationsgenen. Diese Transkriptionsbeeinflussung vieler Sporulationsgene untermauert auch die Annahme, dass durch die eingeschränkte Verbreitung von homologen Proteinen in den Genera *Bacilli* und *Clostridia*, eine individuelle Funktion von CAP0037 und CAP0036 in der Sporulation zu finden ist (Lai *et al.*, 2003).

4.5.2.3 Proteine/Gene der Zell-Umhüllung („Cell envelope biogenesis“)

Zusätzlich zu den Proteinen/Genen die direkt in die Sporulationskaskade involviert sind, wurden durch die Mutation von *cap0036*_Int unabhängig von der Wachstumsphase etwa 30 Proteine/Gene mit einer potentiellen Funktion in der Zell-Umhüllung („Cell envelope biogenesis“) signifikant beeinflusst. Vor allem die Gene/Proteine mit einer Funktion im Aufbau des Sporenmantels („Spore coat“) treten signifikant in Erscheinung. Auf Transkriptebene wird das Operon *cotJB-cotJC* (*cac1337-1338*), *cac2906* („CotS related“), *cac2747* (*yaaH*, „Protein containing LysM repeats“) und *cac2903* (*yrbA*, „LysM domain containing membrane protein“) in der Säurephase der Mutante *cap0036*_Int signifikant induziert. Diese Daten werden durch die 2D Gele bestätigt, in denen das Protein CAC2903 (YrbA) ebenfalls nur in der Mutante bei pH 5,7 nachgewiesen werden konnte. Proteine mit einer LysM (Lysin-Motif)-Domäne können Peptidoglykan binden und sind am Abbau der bakteriellen Zellwand beteiligt (Joris *et al.*, 1992; Bateman and Bycroft, 2000). In *B. subtilis* wird dem Protein YrbA eine Funktion im Aufbau des „Spore coat“ zugesprochen (Takamatsu *et al.*, 2000). Das Protein YaaH zeigt Homologien zu SleL aus *B. cereus* (Makino und Moriyama, 2002) und ist potentiell als „Cortex lytic enzyme“ (CLE) im Verlaufe der Germination tätig (Jones *et al.*, 2008). Darüber hinaus stehen die Gene *yrbA*, *yaaH* und das *cotJ*-Operon unter der Regulation des Sigmafaktors E (σ^E) (Kodama *et al.*, 1999; Takamatsu und Watabe, 2002), dessen Gen ebenfalls signifikant in der Säurephase der Mutante *cap0036*_Int induziert vorliegt (4.5.2.2). Daher kann vermutet werden, dass durch den Verlust von CAP0037/0036 die „Spore coat proteins“ indirekt über eine erhöhte Menge an σ^E -Faktor induziert wurden.

Es ist aber nicht auszuschließen, dass Gene die für Proteine mit LysM-Domänen kodieren (z. B. *yrbA* und *yaaH*) auch direkt über CAP0036 oder CAP0037 in ihrer Regulation beeinflusst werden. Das YocH Protein (mit 2 LysM-Domänen) aus *B. subtilis* mit einer Funktion als Zellwand-Hydrolase (Amidase) (Smith *et al.*, 2000), spielt in der Stressantwort auf Kälte und hohen Osmolaritäten eine wichtige Rolle (Seibert, 2009). Nach Kältestress kommt es zu einer signifikanten Repression der *yocH*-Transkription. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass nach dem Kältestress das Protein YhbE an die Promotoregion des Gens *yocH* bindet (Seibert, 2009). Wie bereits zuvor erwähnt, stellt YhbE aus *B. subtilis* das Ortholog zum Protein CAP0036 aus *C. acetobutylicum* dar (Karp *et al.*, 2005). Über die Relevanz des Proteins YhbE für die Expression des *yocH* Gens ist allerdings nichts bekannt. Neben dem Protein YhbE wurden zusätzlich viele Proteine identifiziert, mit einer Funktion in der DNA-Spiralisierung. Dadurch wird vermutet, dass die Transkription des Gens *yocH* nicht nur durch Regulatoren, sondern ebenfalls stark durch strukturelle Eigenschaften der DNA im eigenen Promotorbereich beeinflusst wird. Eine ähnliche Funktion wäre daher auch für die Proteine CAP0037/0036 in *C. acetobutylicum* denkbar. Eventuell sorgen CAP0037/0036 durch die Bindung an spezifische Promotorbereiche für besondere DNA-Spiralisierungen und beeinflussen dadurch die Transkription des jeweiligen offenen Leserahmens, wie z. B. von σ -Faktoren oder von Genen der „Cell envelope biogenesis“.

Das CAP0037/0036 eine spezifische Funktion in der Ausbildung oder im Aufbau der Spore (bzw. Sporenumhüllung) hat, kann ebenfalls durch die Expressionsdaten der Gene in einer Batch-Kultur des Wildtyps vermutet werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Operon *cap0037-0036* erst zum Ende des Wachstums in der späten stationären Wachstumsphase signifikant induziert wird, einhergehend mit der Sporulation (Jones *et al.*, 2008).

Ob die Mutation von *cap0036_Int* und die dadurch resultierenden Transkript- und Proteinveränderungen insgesamt auch einen phänotypischen Einfluss auf die Zellen, auf die Sporenbildung oder sogar den Sporenaufbau hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollends geklärt werden. Ebenso wenig, ob die Mutante *cap0036_Int* früher oder später mit der Sporulation beginnt oder Probleme bei der Auskeimung der vorhandenen Sporen aufweist. Mit Zellen der Mutante könnten diesbezüglich aus verschiedenen Wachstumsphasen (vegetative Zelle, „clostridial stages“, Vorpsoren und Sporen), Raster- (REM) und Transelektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahmen zum Wildtyp verglichen werden, zur Erlangung von Hinweisen, ob es Veränderungen im Zell- oder Sporenaufbau gibt. Dass Mutationen eine signifikante Veränderung der Zellform nach sich ziehen können, wurde kürzlich in *C. acetobutylicum* für Antisense-RNA-Mutanten der Gene *cap0167* und *cac1766* gezeigt. Hier konnte eine bisher noch nicht bekannte Zellform anhand von REM und TEM-Aufnahmen dokumentiert werden (Jones *et al.*, 2008).

5 Zusammenfassung

1. Es wurden kontinuierliche Kulturen von *C. acetobutylicum* bei verschiedenen *steady state*-pH-Werten (pH 5,7, 5,5, 5,3, 5,1, 4,9, 4,7 und 4,5) etabliert. Dadurch konnte dokumentiert werden, dass kontinuierlich wachsende Zellen beim pH-Wert 5,1 sich in einer Zwischenstellung befinden, an dem der Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* von der Säure- zur Lösungsmittelphase wechselt.
2. Für alle Kulturen der verschiedenen pH-Werte wurden unter Anwendung der 2D-PAGE Proteomanalysen durchgeführt. Es wurden einzelne Proteomkarten für die Säurephase (pH 5,7) und Lösungsmittelphase (pH 4,5) erstellt. Dabei enthalten 357 Spots in der Säurephase 178 verschiedene Proteine und 205 verschiedene Proteine werden von 415 Spots in der Lösungsmittelphase repräsentiert. Insgesamt konnten 21 % aller cytoplasmatischen Proteine mit einem *pI* von 4-7 und einer Masse von 10 bis 200 kDa detektiert werden.
3. Ebenso wurden für alle Kulturen der genannten pH-Werte ausführliche RNA-Analysen unter der Anwendung der DNA Micro Array Technik durchgeführt und alle Kulturen hinsichtlich ihrer Transkriptmuster untereinander verglichen. In der Säurephase (pH 5,7) sind 53 Gene und in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) 95 Gene in ihrer Transkription signifikant erhöht.
4. Zusätzlich wurden DNA Micro Array Analysen von Zellen einer Kultur der Säurephase (pH 5,7) nach einem applizierten Butanolstress durchgeführt. Insgesamt waren 235 Gene innerhalb der ersten 2 h nach der Butanolapplikation signifikant induziert und 129 signifikant reprimiert. Von denen in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) induzierten Genen (95) werden 19 durch das Butanol induziert und von den reprimierten Genen (53) werden 25 Gene durch das Butanol in ihrer Transkription gehemmt.
5. Durch die systematische Analyse der Wachstumsphasen bei unterschiedlichen pH-Werten mittels Proteom und Transkriptom wurden die unbekanntes Gene/Proteine CAP0037 und CAP0036 als Markerkandidaten der Säurephase verzeichnet. Für die Lösungsmittelphase konnten das *sol* Operon (*adhE1-ctfA-ctfB*), Endoglukanasen, Xylanasen und eine Metalloprotease (CAC2517) als Markerkandidaten dokumentiert werden.
6. Abschließend wurde die Mutante *cap0036_Int* hinsichtlich Wachstum, Proteom und Transkriptom untersucht. Die Mutante *cap0036_Int* stellt durch den nachgewiesenen Verlust der beiden Proteine CAP0036 und CAP0037, die erste dokumentierte ClosTron[®]-Doppelmutante dar. Ebenso konnte herausgestellt werden, dass durch die Mutation viele Sporulationsgene und die „Acetoacetate decarboxylase“ (Adc) signifikant betroffen sind.

Literaturverzeichnis

- Alsaker, K. V., and E. T. Papoutsakis.** 2005. Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **187**:7103-7118.
- Alsaker, K. V., Paredes C., and E. T. Papoutsakis.** 2010. Metabolite Stress and Tolerance in the Production of Biofuels and Chemicals: Gene-Expression-Based Systems Analysis of Butanol, Butyrate, and Acetate Stresses in the Anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* **105**:1131-1147.
- Andersch, W., Bahl H., and G. Gottschalk.** 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**:327-332.
- Babst, M., Hennecke H., and H. M. Fischer.** 1996. Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **19**:827-839.
- Baer, S. H., Blaschek H. P., and T. L. Smith.** 1987. Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2854-2861.
- Baggerman, G., Vierstraete E., De Loof A., and L. Schoofs.** 2005. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Comb. Chem. High. Throughput. Screen.* **8**:669-677.
- Bahl, H., Andersch W., Braun K., and G. Gottschalk.** 1982a. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**:17-20.
- Bahl, H., Andersch W., and G. Gottschalk.** 1982b. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**:201-205.
- Bahl, H., and G. Gottschalk.** 1984. Parameters effecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **11**:215-223.
- Bahl, H., Müller H., Behrens S., Joseph H., and F. Narberhaus.** 1995. Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**:341-348.
- Balodimos I. A., Rapaport E., and E. R. Kashket.** 1990. Protein Phosphorylation in Response to Stress in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2170-2173.
- Bateman, A., and M. Bycroft.** 2000. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* **299**:1113-9.
- Bédouet, L., Arnold F., Robrau G., Batina P., Talbot F., and A. Binet.** 1998. Evidence for an heterogeneous glycosylation of the *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 flagellin. *Microbios.* **94**:183-192.
- Bertram, J.** 1989. Entwicklung eines Systems zum DNA-Transfer und zur Transposon-Mutagenese für *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Göttingen
- Beyer, A., Hollunder J., Nasheuer H. P., and T. Wilhelm.** 2004. Posttranscriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Mol. Cell Proteomics.* **3**:1083-1092.
- Booth, I. R.** 1985. Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiol. Reviews.* **49**:359-378.
- Bowles, L. K., and W. L. Ellefson.** 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1165-1170.
- Boynton, Z. L., Bennett G. N., and F. B. Rudolph.** 1996. Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2758-2766.

- Breznak, J. A., and R. N. Costilow.** 1994. Physiochemical factors of growth. In: Gerhardt (ed). Methods of general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA:137-154.
- Brown, D. P., Ganova-Raeva L., Green B. D., Wilkinson S. R., Young M. and P. Youngman.** 1994. Characterization of Spo0A homologs in divers *Bacillus* and *Clostridium* species reveals regions of high conservation within the effector domain. Mol. Microbiol. **14**:411-426.
- Brush, M.** 1998. Dye Hard: Protein Gel Staining Products. The Scientist **12**:16-22.
- Bucca, G., Hindle Z., and C. P. Smith.** 1997. Regulation of the *dnaK* Operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Is Governed by HspR, an Autoregulatory Repressor Protein. J. Bacteriol. **179**:5999-6004.
- Camacho-Carvajal, M. M., B. Wollscheid, R. Aebersold, V. Steimle, and W. W. A. Schamel.** 2004. Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates. Mol. Cell. Proteomics. **3**:176-182.
- Chen, J. S.** 1995. Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. FEMS Microbiol. Rev. **17**:263-73.
- Chester, N., and D. R. Marshak.** 1993. Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analysing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. **33**: 39-45.
- Cornillot, E., Nair R. V., Papoutsakis E. T., and P. Soucaille.** 1997. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. J. Bacteriol. **179**:5442-5447.
- Croux, C., Canard B., Goma G., and P. J. Soucaille.** 1992a. Autolysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. Gen. Microbiol. **138**:861-869
- Croux, C., Canard B., Goma G., and P. J. Soucaille.** 1992b. Purification and characterization of an extracellular muramidase of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 that acts on non-N-acetylated peptidoglycan. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1075-1081
- Croux, C., and J. L. Garcia.** 1991. Sequence of the *lyc* gene encoding the autolytic lysozyme of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824: comparison with other lytic enzymes. Gene. **104**:25-31
- Davies, R.** 1943. Studies on the acetone-butanol fermentation. 4. Acetoacetic acid decarboxylase of *C. acetobutylicum* (BY). Biochem. J. **37**:230-238.
- Grimmler, C., Janssen H., Krauß D., Fischer R. J., Bahl H., Dürre P., Liebl W., and A. Ehrenreich.** 2010. Genome-wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Accepted. J. Mol. Microbiol. Biotechnol.
- Dürre, P.** 1998. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**:639-648.
- Dürre, P.** 2007. Biobutanol: An attractive biofuel. Biotechnol. J. **2**:1525-1534
- Dürre, P.** 2008a. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. Ann NY Acad Sci **1125**:353-362.
- Dürre, P.** 2008b. Novel and known transcription factors involved in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*. Presentation *Clostridium* X-Meeting, Wageningen, Netherlands.
- Dürre, P., Kuhn A., Gottwald M., and G. Gottschalk.** 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **26**:268-272.
- Ezeji, T., C. Milne, N. D. Price, and H. P. Blaschek.** 2010. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. **85**:1697-1712.

- Fiedler, T.** 2006. „Proteomanalyse von *Clostridium acetobutylicum* unter Phosphatlimitierung und Charakterisierung des phosphatspezifischen Zwei-Komponenten-Systems PhoP/R“ Dissertation, Universität Rostock
- Fiedler, T., Mix M., Meyer U., Mikkat S., Glocker M. O., Bahl H., and R. J. Fischer.** 2008. The Two-component System PhoPR of *Clostridium acetobutylicum* Is Involved in Phosphate-Dependent Gene Regulation. *J. Bacteriol.* **190**:6559-6567.
- Fiocco, D., Capozzi V., Goffin P., Hols P., and G. Spano.** 2007. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:909-915.
- Fischer, C., C. Geourjon, C. Bourson, and J. Deutscher.** 1995. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *prkA* gene encoding a novel serine protein kinase. *Gene.* **168**:55-60.
- Fischer, R. J., Helms J., and P. Dürre.** 1993. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J. Bacteriol.* **175**:6959-6969.
- Fischer, R. J., Oehmcke S., Meyer U., Mix M., Schwarz K., Fiedler T., and H. Bahl.** 2006. Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J. Bacteriol.* **188**: 5469-5478.
- Flórez, L. A., Roppel S. F., Schmeisky A. G., Lammers C. R., and J. Stülke.** 2009. A community-curated consensual annotation that is continuously updated: the *Bacillus subtilis* centred wiki SubtiWiki. Database (Oxford) 2009:bap12.
- Fontaine, L., Meynial-Salles I., Girbal L., Yang X., Croux C., and P. Soucaille.** 2002. Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**:821-830.
- Frias-Lopez, J., Shi Y., Tyson G. W., Coleman M. L., Schuster S. C., Chisholm S. W., and E. F. Delong.** 2008. Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**:3805–3810.
- Gabriel.** 1928. Butanol fermentation process. *Ing. Eng. Chem.* **20**: 1063-1067.
- Gerischer, U., and P. Dürre.** 1990. Cloning, Sequencing, and Molecular Analysis of the Acetoacetate Decarboxylase Gene Region from *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **172**:6907-6918.
- Gheshlaghi, R., Scharer J. M., Moo-Young M., and C. P. Chou.** 2009. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol. Adv.* **27**:764-81.
- Gilbert, J. A., Field D., Huang Y., Edwards R., Li W., Gilna P., and I. Joint.** 2008. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One* **3**:e3042.
- Girbal, L., Croux C., Vasconcelos I., and P. Soucaille.** 1995. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Reviews.* **17**:287-297.
- Gottwald, M., and G. Gottschalk.** 1985. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch. Microbiol.* **143**:41-46.
- Greenbaum, D., Jansen R., and M. Gerstein.** 2002. Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics.* **18**:585-596.
- Gygi, S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., and R. Aebersold.** 1999a. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**:994-999.
- Gygi, S. P., Rochon Y., Franza B. R., and R. Aebersold.** 1999b. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**:1720-1730.
- Han, D. K., Eng J., Zhou H., and R. Aebersold.** 2001. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **19**:946-951.

- Hansmeier, N., Chao T. C., Daschkey S., Müsken M., Kalinowski J., Pühler A., and A. Tauch** 2006. A comprehensive proteome map of the lipid-requiring nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411. *Proteomics*. **7**:1076–1096.
- Hapgood, J., Cuthill S., Denis M., Poellinger L., and J. A. Gustafsson**. 1989. Specific protein-DNA interactions at a xenobiotic-responsive element: Copurification of dioxin receptor and DNA-binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:60-64.
- Haqqani, A. S., Kelly J. F., and D. B. Stanimirovic**. 2008. Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Methods. Mol. Biol.* **439**:241–256.
- Harris, L. M., Welker N. E., and E. T. Papoutsakis**. 2002. Northern, Morphological, and Fermentation Analysis of *spo0A* Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**: 3586-3597.
- Hartmanis, M. G. N., Klason T., S. Gatenbeck**. 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:66-71.
- Haus, S., Jabbari S., Millat T., Janssen H., Fischer R. J., Bahl H., King J. R., and O. Wolkenhauer**. 2010. A Systems Biology Study of the Effect of pH-induced Gene Regulation on Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum* in Continuous Culture. SUBMITTED
- Heap, J. T., Pennington O. J., Cartman S. T., Carter G. P., and N. P. Minton**. 2007. The Clostron: a 11 universal gene knockout system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* **70**:452-464.
- Herrmann, G., Jayamani E., Mai G., and W. Buckel**. 2008. Energy Conservation via Electron-Transferring Flavoprotein in Anaerobic Bacteria. *J. Bacteriol.* **190**:784-791.
- Hiller K., Grote A., Maneck M., Münch R., and D. Jahn**. 2006. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics* **22**:2441-2443.
- Hillmann, F.** 2009. Von obligater Anaerobiose zur Aerotoleranz – Die oxidative Stressantwort von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Rostock
- Hillmann, F., Döring C., Riebe O., Ehrenreich A., Fischer R.-J., and H. Bahl**. 2009. The role of PerR in O₂-affected gene expression of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **191**:6082-6093.
- Hippe, H., J. Andreesen, and G. Gottschalk**. 1991. The genus *Clostridium* - Nonmedical, p. 1800-1866. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York.
- Hoch, J. A.** 1993. *spoO* genes, the phosphorelay, and the initiation of sporulation, p. 747-755 In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Holmes, D. J., Caso J. L., and C. J. Thompson**. 1993. Autogenous transcriptional activation of a thioestrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **12**:3183-3191.
- Hotelier, T., Renault L., Cousin X., Negre V., Marchot P., and A. Chatonnet**. 2004. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins *Nucleic Acids Research* **32**:D145-7.
- Hüsemann, M. H. W., and E. T. Papoutsakis**. 1989. Enzymes limiting butanol and acetone formation in continuous and batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:435-444.
- Janssen, H., Döring C., Ehrenreich A., Voigt B., Hecker M., Bahl H., and R. J. Fischer**. 2010. A Proteomic and Transcriptional View of Acidogenic and Solventogenic Steady State Cells of *Clostridium acetobutylicum* in a Chemostat Culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**:2209-2226.
- Jeffery, C. J.** 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**:8-11.
- Jones, D.T.** 2001. Applied acetone-butanol fermentation, In: Bahl H., Dürre P. (ed.) *Clostridia*. Biotechnological and Medical Applications, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 125–168.

- Jones, D. T., van der Westhuizen A., Long S., Allcock E. R., Reid S. J., and D. R. Woods.** 1982. Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1434-1439.
- Jones D. T., and D. R. Woods.** 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev* **50**:484-524.
- Jones, S. W., Paredes C. J., Tracy B., Cheng N., Sillers R., Senger R. S., and E. T. Papoutsakis.** 2008. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biol.* **7**:R114.
- Joris, B., Englebort S., Chu C. P., Kariyama R., Daneo-Moore L., Shockman G. D., and J. M. Ghuysen.** 1992. Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:257-64.
- Kaan, T., Homuth G., Mader U., Bandow J., and T. Schweder.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* **148**:3441-3455.
- Karp, P.D., Ouzounis C.A., Moore-Kochlacs C., Goldovsky L., Kaipa P., Ahrén D., Tsoka S., Darzentas N., Kunin V., and N. López-Bigas.** 2005. Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Research* **33**:6083–6089.
- Kawasaki, S., Ishikura J., Watamura Y., Y. Niimura.** 2004. Identification of O₂-induced peptides in an obligatory anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Letters* **571**:21-25.
- Kodama, T., Takamatsu H., Asai K., Kobayashi K., Ogasawara N., and K. Watabe.** 1999. The *Bacillus subtilis* *yaaH* gene is transcribed by SigE RNA polymerase during sporulation, and its product is involved in germination of spores. *J. Bacteriol.* **181**:4584-4591.
- Kodgire, P., and K. K. Rao.** 2008. *hag* expression in *Bacillus subtilis* is both negatively and positively regulated by ScoC. *Microbiology.* **155**:142-149.
- Krogh, A., Larsson B., von Heijne G., and E. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model. Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567-580.
- Lai, E. M., Phadke N. D., Kachman M. T., Giorno R., Vazquez S., Vazquez J. A., Maddock J. R., and A. Driks.** 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **185**:1443-1454.
- Lamb, J. R., Tugendreich S., and P. Hieter.** 1995. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends. Biochem. Sci.* **20**:257-259.
- Lee, S. F., Forsberg C. W., and L. N. Gibbins.** 1985a. Cellulolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:220-228.
- Lee, S. F., Forsberg C. W., and L. N. Gibbins.** 1985b. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1068-1076.
- Lee, J., Yun H., Feist A. M., Palsson B. O., and S. Y. Lee.** 2008a. Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**:849-862.
- Lee, S. Y., Park J. H., Jang S. H., Nielsen L. K., Kim J., and K. S. Jung.** 2008b. Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnol. Bioeng.* **101**:209-228.
- Lepage, C., Fayolle F., Hermann M., J. P. Vandecasteele.** 1987. Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. *J. Gen. Microbiol.* **133**:103-110.
- Li, F., Hinderberger J., Seedorf H., Zhang J., Buckel W., and R. K. Thauer.** 2008. Coupled Ferredoxin and Crotonyl Coenzyme A (CoA) Reduction with NADH Catalyzed by the Butyryl-CoA Dehydrogenase/Etf Complex from *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* **190**:843-850.
- Li, L., Wada M., and A. Yokota** 2007. Cytoplasmic proteome reference map for a glutamic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067. *Proteomics.* **7**:4317-4322.

- Linder, S.** 2010. Systems biology of *Clostridium acetobutylicum* – gene expression during the metabolic switch. Presentation SysMO-COSMIC Meeting, Rostock, Germany.
- Lindner, C., Stülke B., and M. Hecker.** 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. **140**:753-757.
- Liedert, C., Bernhardt J., Albrecht D., Voigt B., Hecker M., Salkinoja-Salonen M., and P. Neubauer** 2009. Two-dimensional proteome reference map for the radiation-resistant bacterium *Deinococcus geothermalis*. *Proteomics*. **10**:555-563.
- Long, S., Jones D. T., and D. R. Woods.** 1984a. The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Biotechnol. Lett.* **6**:529-534.
- Long, S., Jones D. T., and D. R. Woods.** 1984b. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:256-261.
- López-Contreras, A. M., Martens A. A., Szijarto N., Mooibroek H., Claassen P. A. M., van der Oost J., and W. M. de Vos.** 2003. Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 of CelG, a cellulosomal glycoside hydrolase from family 9. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:869–877.
- López-Contreras, A. M., Gabor K., Martens A. A., Renckens B. A. M., Claassen P. A. M., van der Oost J., and W. M. de Vos.** 2004. Substrate-Induced Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5238–5243.
- Luscombe, N. M., Austin S. E., Berman H. M., and J. M. Thornton.** 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol* **1**:REVIEWS001.
- Lyrstis, M., Boynton Z. L., Petersen D., Kann Z., Bennett G. N., and F. B. Rudolph.** 2000. Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding flagellin, *flaC*, and the posttranslational modification of flagellin, FlaC, from *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Anaerobe*. **6**:69-79.
- Makino, S., and R. Moriyama.** 2002. Hydrolysis of cortex peptidoglycan during bacterial spore germination. *Med. Sci. Monit.* **8**:RA119-127.
- Mansilla, M. C., Cybulski L. E., Albanesi D., and D. de Mendoza.** 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**:6681-6688.
- May, A., Hillmann F., Riebe O., Fischer R. J., and H. Bahl.** 2004. A rubrerythrin-like oxidative stress protein of *Clostridium acetobutylicum* is encoded by a duplicated gene and identical to the heat shock protein Hsp21. *FEMS Microbiol. Letters* **238**:249-254.
- Mermelstein, L. D., and E. T. Papoutsakis.** 1993. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage Φ 3TI methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:107710-107781.
- Messner, P., Bock K., Christian R., Schulz G., and U. B. Sleytr.** 1990. Characterization of the surface layer proteins of *Clostridium symbiosum* HB25. *J. Bacteriol.* **172**:2576-2583.
- Mitchell, W. J.** 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microb. Physiol.* **39**:31-130.
- Mitchell, W. J.** 2001. Spores and sporulation, p. 72-83. *In*: P. Dürre (ed.), *Clostridia*. Biotechnology and Medical Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany
- Molle, V., Fujita M., Jensen S. T., Eichenberger P., Gonzalez-Pastor J. E., Liu J. S., and R. Losick.** 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **50**:1683-1701.
- Monot, F., Martin J. R., Petitdemange H., and R. Gay.** 1982. Acetone und butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:1318-1324.
- Murakami, T., Holt T. G., and C. J. Thompson.** 1989. Thioestrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **171**:1459-1466.
- Mursheda, K. A., Rudolph F. B., and G. N. Bennett.** 2004. Thermostable xylanase10B from *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**:229-234.

- Mursheda, K. A., Rudolph F. B., and G. N. Bennett.** 2005. Characterization of thermostable Xyn10A enzyme from mesophilic *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**:12-18.
- Nair, R. V., Bennett G. N., and E. T. Papoutsakis** 1994. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **176**:871-885.
- Narberhaus, F., Giebeler K., and H. Bahl** 1992. Molecular characterization of the *dnaK* gene region of *Clostridium acetobutylicum*, including *grpE*, *dnaJ*, and a new heat shock gene. *J. Bacteriol.* **174**:3290-3299.
- Narberhaus, F., and H. Bahl** 1992. Cloning, Sequencing, and Molecular Analysis of the *groESL* Operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **174**:3290-3299.
- Ni, Y., and Z. Sun.** 2009. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**:415-423.
- Nie, L., Wu G., and W. Zhang.** 2008. Statistical application and challenges in global gel-free proteomic analysis by mass spectrometry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**:297-307.
- Nölling J. et al.** 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**:4823-4838.
- Oelmüller, U., Krüger N., Steinbüchel A., and C. Friedrich.** 1990. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Meth.* **11**: 73-81.
- O'Farrell, P. H.** 1975. High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Orsburn, B. C., Melville S. B., and D. L. Popham.** 2010. EtfA catalyses the formation of dipicolinic acid in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* **75**:178-186.
- Ounine, K., Petitdamage H., Raval G., and R. Gay** 1985. Regulation and butanol inhibition of D-Xylose and D-Glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:874-878.
- Ozsolak, F., Platt A. R., Jones D. R., Reifenberger J. G., Sass L. E., McInerney P., Thompson J. F., Bowers J., Jarosz M., and P. M. Milos.** 2009. Direct RNA sequencing. *Nature* **461**:814-818.
- Padan, E., Bibi E., Ito M., and T. A. Krulwich.** 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta.* **1717**:67-88.
- Paredes, C. J., Alsaker K. V., and E. T. Papoutsakis.** 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:969-978.
- Park, S. J., Lee S. Y., Cho J., Kim T. Y., Lee J. W., Park J. H., and M. J. Han.** 2005. Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:567-579.
- Petersen, D. J., and G. N. Bennett.** 1990. Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3491-3498.
- Pich, A., Narberhaus F., and H. Bahl.** 1990. Induction of heat shock proteins during initiation of solvent formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**:697-704.
- Piggot, P. J., and D. W. Hilbert.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:579-586.
- Ren, C., Gu Y., Hua S., Wua Y., Wang P., Yang Y., Yang C., Yang S., and W. Jiang.** 2010. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering.* **12**:446-454.
- Rieger, T.** 2006. Sporulation und Glykogensynthese bei *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Diplomarbeit, Universität Rostock.

- Roberts, R. C., Toochinda C., Avedissian M., Baldini R. L., Lopes Gomes S., and L. Shapiro.** 1996. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. *J. Bacteriol.* **178**:1829-1841.
- Rogers P.** 1999. Clostridia, Solvent Formation. p 670-687. *In: Wiley Biotechnology Encyclopedias*, M.C. Flickinger and S.W. Drew (first edition). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Wiley-Intersciences
- Rosen R., and E. Z. Ron.** 2002. Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. *Mass. Spec. Rev.* **21**:244-265.
- Rosen R., Becher D., Büttner K., Biran D., Hecker M., and E. Z. Ron.** 2004. Highly phosphorylated bacterial proteins. *Proteomics.* **4**:3068-3077.
- Sabathé, F., Bélaïch A., and P. Soucaille.** 2002. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett* **217**:15-22.
- Sambrook, J., Russell, D.W.** 2001. "Molecular cloning: a laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- Samel, A.** 2007. Analyse von Genen zur Polyphosphatspeicherung in *Clostridium acetobutylicum*. Diplomarbeit, Universität Rostock.
- Sauer, U., and P. Dürre.** 1993. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **175**:3394-3400.
- Sauer, U., and P. Dürre.** 1995. Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**:115-120.
- Schaffer, S., Isci N., Zickner B., and P. Dürre.** 2002. Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Electrophoresis* **23**:110-121.
- Shaheen, R., Shirley M., and D. T. Jones.** 2000. Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *J. Mol. Microbiol. Biotech.* **2**:115-124.
- Schena, M., Shalon D., Davis R. W., and P. O. Brown.** 1995. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* **270**:467-470.
- Schiel, B.** 2006. Regulation der Lösungsmittelbildung in *Clostridium acetobutylicum* durch DNA-bindende Proteine. Dissertation, Universität Ulm.
- Schreiber, W., and P. Dürre.** 1999. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum*: isolation and purification of the enzyme, and sequencing and localization of the *gap* gene within a cluster of other glycolytic genes. *Microbiology.* **145**:1839-1847.
- Schwarz, K.** 2007. „*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: Phosphatspeicherung und Reaktion auf Phosphatmangel“ Dissertation, Universität Rostock
- Schwarz, K., Fiedler T., Fischer R. J., and H. Bahl.** 2007. A standard operating procedure (SOP) for preparation of intra- and extracellular proteins of *Clostridium acetobutylicum* for proteome analysis. *J. Microbiol. Methods.* **68**:396-402.
- Seibert, T. M.** 2009. Die Zellwand-Hydrolase YocH aus *Bacillus subtilis*: Genetische Kontrolle durch das essentielle Zwei-Komponenten System YycFG, hohe Osmolarität und Kältestress. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Senger, R. S., and E. T. Papoutsakis.** 2008. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part 1. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **101**:1036-1052.
- Senger, R. S., and E. T. Papoutsakis.** 2008. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part 2. Development of Specific Proton Flux States and Numerically-Determined Sub-Systems. *Biotechnol. Bioeng.* **101**:1053-71.

- Sharma, M. R., Dönhöfer A., Barat C., Marquez V., Datta P. P., Fucini P., Wilson D. N., and R. K. Agrawal.** 2010. PSRP1 Is Not a Ribosomal Protein, but a Ribosome-binding Factor That Is Recycled by the Ribosome-recycling Factor (RRF) and Elongation Factor G (EF-G). *J. Biol. Chem.* **285**:4006-4014.
- Shinto, H., Tashiro Y., Yamashita M., Kobayashi G., Sekiguchi T., Hanai T., Kuriya Y., Okamoto M., and K. Sonomoto.** 2007. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production. *J. Biotechnol.* **131**:45-56.
- Shinto, H., Tashiro Y., Kobayashi G., Sekiguchi T., Hanai T., Kuriya Y., Okamoto M., and K. Sonomoto.** 2008. Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation. *Process Biochem.* **43**:1452-1461.
- Smith, T. J., Blackman S. A., and S. J. Foster.** 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology.* **146**:249-262.
- Sonck, K. A., Kint G., Schoofs G., Vander Wauven C., Vanderleyden J. and S. C. De Keersmaecker.** 2009. The proteome of *Salmonella typhimurium* grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics.* **9**:565-579.
- Stedtfeld, R. D., Baushke S. W., Turlousse D. M., Miller S. M., Stedtfeld T. M., Gulari E., Tiedje J. M., and S. A. Hashsham** 2008. Development and experimental validation of a predictive threshold cycle equation for quantification of virulence and marker genes by high-throughput nanoliter-volume PCR on the OpenArray platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3831-3838.
- Sullivan, L., and G. N. Bennett.** 2006. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**:298-308.
- Takamatsu, H., Imamura A., Kodama T., Asai K., Ogasawara N., and K. Watabe.** 2000. The *yabG* gene of *Bacillus subtilis* encodes a sporulation specific protease which is involved in the processing of several spore coat proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**:33-38.
- Takamatsu, H., and K. Watabe.** 2002. Assembly and genetics of spore protective structures. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:434-444.
- Tangney, M., and W. J. Mitchell** 2007. Characterisation of a glucose phosphotransferase system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:398-405.
- Tatusov, R. L., Galperin M. Y., Natale D. A., and E. V. Koonin.** 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**:33-36.
- Terracciano, J. S., and E. R. Kashket.** 1986. Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:86-91.
- Tomas, C. A., Alsaker K. V., Bonarius H. P. J, Hendriksen W. T, Yang H., Beamish J. A., Parades C. J., and E. T Papoutsakis.** 2003a. DNA-array based transcriptional analysis of asporogenous, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5. *J. Bacteriol.* **185**:4539-4547.
- Tomas, C. A., N. E. Welker, and E. T. Papoutsakis.** 2003b. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and large changes in the cell's transcriptional program. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4951–4965.
- Tomas, C. A., Beamish J. A., and E. T Papoutsakis.** 2004. Transcriptional Analysis of Butanol Stress and Tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **186**:2006-2018.
- Tummala, S. B., Welker N. E., and E. T. Papoutsakis.** 2003. Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **185**:1923-1934.
- Tummala, S. B., Welker N. E., and E. T. Papoutsakis.** 1999. Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum*. ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3793-3799.

- Van Ginkel, S., and B. E. Logan** 2005. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ. Sci. Technol.* **39**:9351-9356.
- Voigt, B., Schweder T., Sibbald M. J., Albrecht D., Ehrenreich A., Bernhardt J., Feesche J., Maurer K. H., Gottschalk G., van Dijk J. M., and M. Hecker.** 2006. The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media and under different nutrient starvation conditions. *Proteomics.* **6**:268-281.
- Vollherbst-Schneck, K., Sands J. A., B. S. Montenecourt.** 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:193-194.
- Webster, J. R., Reid S. R., Jones D. T. and D. R. Woods.** 1981. Purification and characterization of an autolysin from *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:371-374.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph B. F., and E. T. Papoutsakis.** 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2717-2722.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph B. F., and E. T. Papoutsakis.** 1989. Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:323-329.
- Wolff, S., Otto A., Albrecht D., Zeng J. S., Büttner K., Glückmann M., Hecker M. and D. Becher.** 2006. Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Mol. Cell. Proteomics.* **5**:1183-1192.
- Wörner, K., Szurmant H., Chiang C., and J. A. Hoch.** 2006. Phosphorylation and functional analysis of the sporulation initiation factor Spo0A from *Clostridium botulinum*. *Mol. Microbiol.* **59**:1000-1012.
- Yakhnin, H., Pandit P., Petty T. J., Baker C. S., Romeo T., and P. Babitzke.** 2007. CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. *Mol. Microbiol.* **64**:1605-1620.
- Yan, W., Hwang D., and R. Aebersold.** 2008. Quantitative proteomic analysis to profile dynamic changes in the spatial distribution of cellular proteins. *Methods. Mol. Biol.* **432**:389-401.
- Yan, R. T., J. S. Chen.** 1990. Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2591-2599.
- Ye, K., Serganov A., Hu W., Garber M., and D. J. Patel.** 2002. Ribosome-associated factor Y adopts a fold resembling a double-stranded RNA binding domain scaffold. *Eur. J. Biochem.* **269**:5182-91
- Ye, R. W., Wang T., Bedzyk L., and K. M. Croker.** 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J. Microbiol. Methods* **47**:257-272.
- Young, M.** 2008. Orphan histidine kinases of *Clostridium acetobutylicum*. Presentation *Clostridium X-Meeting*, Wageningen, Netherlands.
- Yuan, J, et al.** 2006. A Proteome Reference Map and Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Mol. Cell. Proteomics.* **5**:1105-1118.
- Yuan, G., and S.-L. Wong.** 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J. Bacteriol.* **177**:6462-6468.
- Zhang W., Li F., and L. Nie.** (2010). Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology.* **156**:287-301
- Zhao Y. S., Tomas C. A., Rudolph F. B., Papoutsakis E. T., and G. N. Bennett.** 2005. Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:530-537.
- Zilversmit, D. B., and A. K. Davis.** 1950. Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. *J. Lab. Clin. Med.* **35**:155-160

Anhang

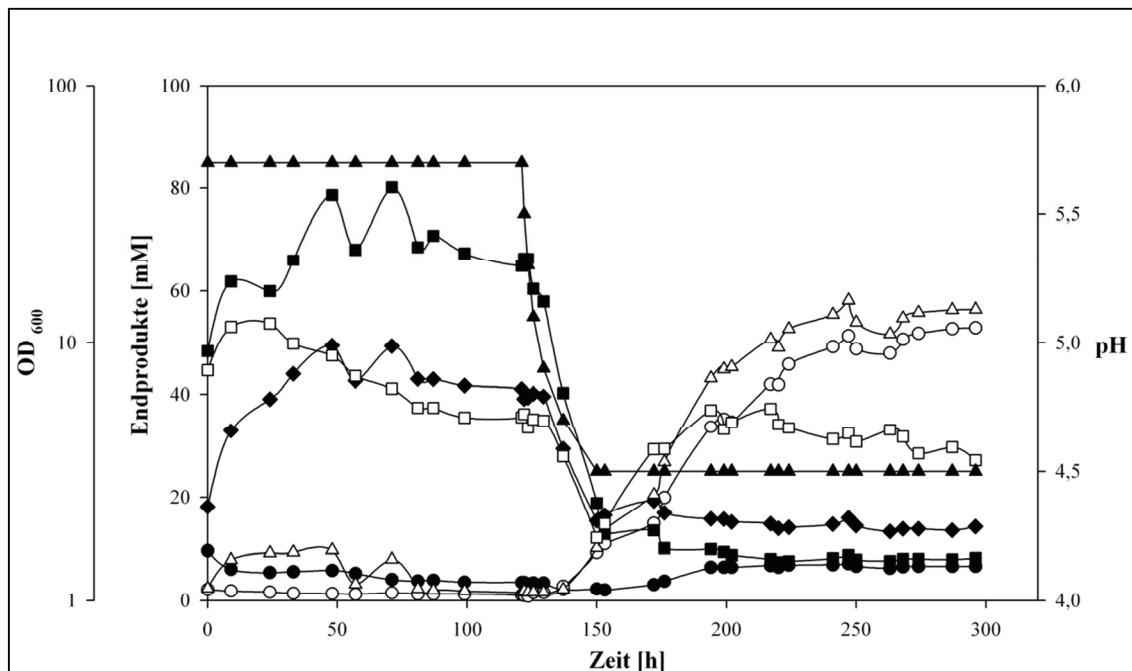


Abbildung A1: Fermentationsdaten eines dynamisches Shifts von *C. acetobutylicum*. Optische Dichte (\square), pH (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge), Butanol (\blacktriangle), Aceton (\circ), und Ethanol (\bullet).

Tabelle A1: Vergleich der Fermentationsprodukte und Optische Dichte (OD_{600}) zwischen *steady state*- und dynamischen Wachstum von *C. acetobutylicum*. *s.s.*, *steady state*; *dyn.*, *dynamisch*

Produkte [mM]	pH 5,7		pH 5,5		pH 5,3		pH 5,1		pH 4,9		pH 4,7		pH 4,5	
	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>	<i>s.s.</i>	<i>dyn.</i>
Ethanol	3,9	3,6	2,4	3,5	4,0	3,3	4,7	3,4	6,1	3,4	7,0	2,2	5,9	2,2
Acetat	42	41	37	39	38	39	18	40	14	40	20	29	13	24
Butyrat	68	65	44	66	54	66	12	60	6.5	58	10	40	6.2	25
Aceton	3,4	1,1	2,1	1,0	3,3	0,9	22	1,6	35	1,6	37	2,8	32	9,3
Butanol	0,4	1,6	0	1,8	0	1,7	25	1,7	41	1,6	43	2,2	40	10
OD_{600}	4,9	5,1	5,0	5,3	5,2	4,7	4,7	5,0	4,9	5,0	5,2	3,6	4,8	1,8

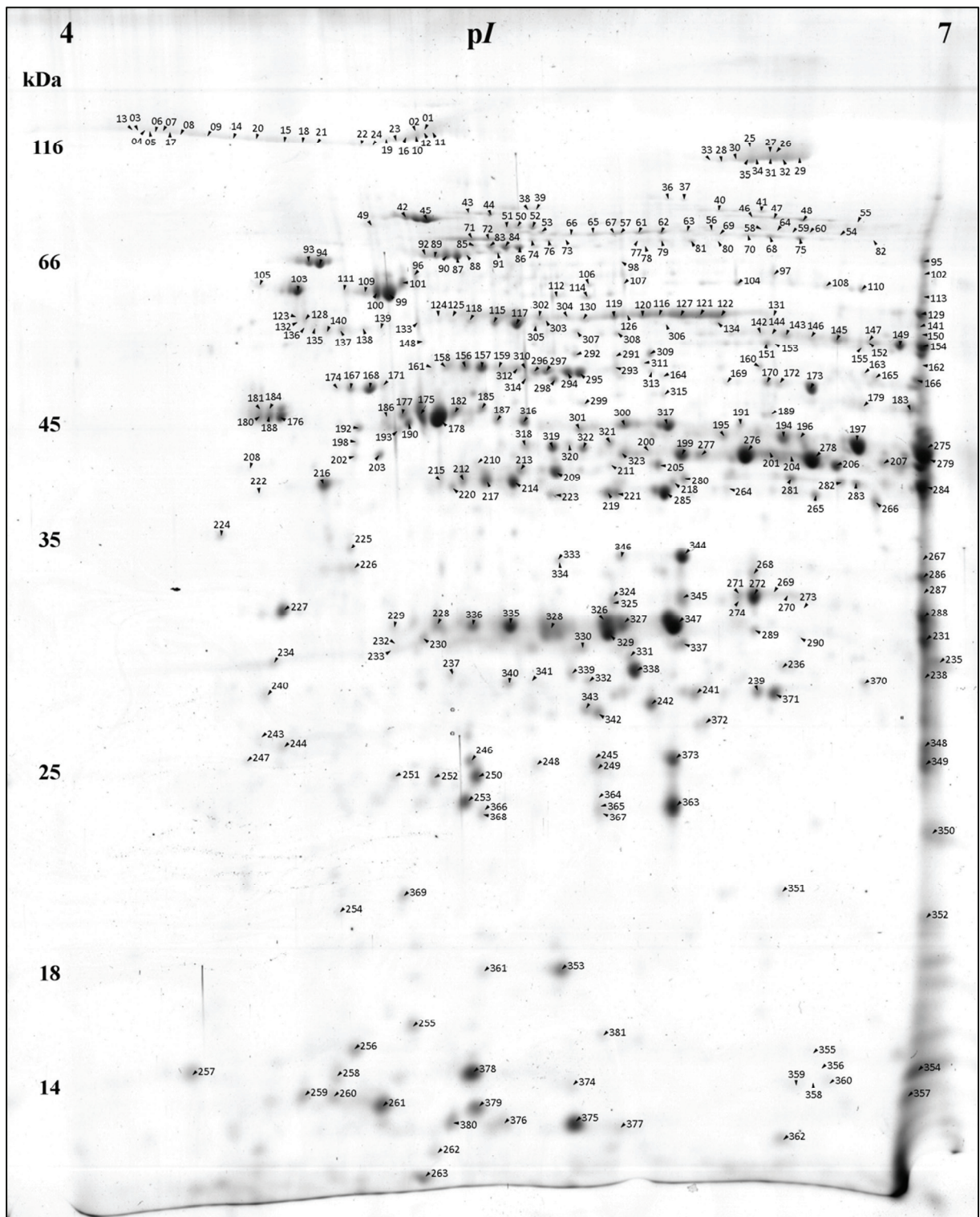


Abbildung A2: Proteomkarte cytosolischer Proteine von Zellen der Säurephase (pH 5,7). Die Nummern markieren alle detektierten Proteinspots, welche mittels MALDI-TOF identifiziert worden sind. Identifizierte Proteine sind in Tabelle A1 aufgelistet.

Tabelle A2: Liste der unter Säureproduktion identifizierten Proteine. Angeben sind die Spotnummern, der dazugehörige Rank (bei Doppelidentifikationen), der Proteinname, die Accession Number (www.uniprot.org), das Molekulargewicht (MW) und der isoelektrische Punkt (pI).

Rank	Spot	Protein Name	UniProt: Accession Number	MW	pI
1	1	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	2	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	3	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	4	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	5				
1	6	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	7	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	10	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	11	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	12	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	13				
1	14	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	15	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	16	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	17				
1	18	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	19	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	20	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	21	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	22	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	23	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	24	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	25	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	26	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	27	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	28	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	29	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	30	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	31	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	32	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	33	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	34	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	35	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	36	Valyl-tRNA synthetase	Q97GG8 SYV_CLOAB	101955,5938	5,6
1	37	Valyl-tRNA synthetase	Q97GG8 SYV_CLOAB	101955,5938	5,6
1	38	Protein translocase subunit secA.	Q97F94 SECA_CLOAB	95698,67969	5,25
1	39	Protein translocase subunit secA.	Q97F94 SECA_CLOAB	95698,67969	5,25
1	40	Leucyl-tRNA synthetase	Q97LB6 SYL_CLOAB	92829,67188	5,81
1	41	Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,60156	5,79
1	42	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,67188	4,96
1	43	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	Q97GL0 SYFB_CLOAB	88725,20313	5,13
1	44	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	Q97GL0 SYFB_CLOAB	88725,20313	5,13

1	45	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,67188	4,96
1	46	ATPases with chaperone activity clpC, two ATP-binding domain	Q97EC4 Q97EC4_CLOAB	91806,50781	5,94
1	47	ATPases with chaperone activity clpC, two ATP-binding domain	Q97EC4 Q97EC4_CLOAB	91806,50781	5,94
1	48	ATPases with chaperone activity clpC, two ATP-binding domain	Q97EC4 Q97EC4_CLOAB	91806,50781	5,94
1	49	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,67188	4,96
1	50	Translation initiation factor IF-2.	Q97I51 IF2_CLOAB	76289,75	5,16
1	51	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Q97I45 PNP_CLOAB	77940,15625	5,28
2		Translation initiation factor IF-2.	Q97I51 IF2_CLOAB	76289,75	5,16
1	52	Translation initiation factor IF-2.	Q97I51 IF2_CLOAB	76289,75	5,16
1	53	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,67188	4,96
1	54	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,53125	6,24
2		Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	55	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,53125	6,24
2		Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	56	DNA gyrase subunit B	P94604 GYRB_CLOAB	71569,60156	5,8
2		2-enoate reductase	Q97DV0 Q97DV0_CLOAB	73279,24219	5,62
1	57	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	58	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,53125	6,24
1	59	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,53125	6,24
2		Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	60	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,53125	6,24
2		Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	61	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	62	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	63	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
2		2-enoate reductase	Q97DV0 Q97DV0_CLOAB	73279,24219	5,62
1	64	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,53125	6,24
2		Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	65	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	66				
1	67	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	68	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,96875	5,83
1	69	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,96875	5,83
1	70	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,96875	5,83
1	71	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,21094	5,13
1	72	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,21094	5,13
1	73	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	74				
1	75	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,96875	5,83
1	76	Aspartyl-tRNA synthetase	Q97GU6 SYD_CLOAB	68200,10156	5,24
2		Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	77	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	78	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	79	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	80	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57

1	81	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	82	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	83	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,67969	5,21
2		Uncharacterized conserved protein.	Q97GZ0 Q97GZ0_CLOAB	71005,60156	5,2
1	84	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,67969	5,21
2		Uncharacterized conserved protein.	Q97GZ0 Q97GZ0_CLOAB	71005,60156	5,2
1	85	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,67969	5,21
2		Uncharacterized conserved protein.	Q97GZ0 Q97GZ0_CLOAB	71005,60156	5,2
1	86	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,67969	5,21
1	87	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,46094	5,09
1	88	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,46094	5,09
2		Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	Q97MN6 GLMS_CLOAB	66906,60938	5,24
1	89	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,46094	5,09
1	90	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,46094	5,09
1	91	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	Q97MN6 GLMS_CLOAB	66906,60938	5,24
2		Uncharacterized conserved protein.	Q97GZ0 Q97GZ0_CLOAB	71005,60156	5,2
1	92	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,46094	5,09
1	93	Chaperone protein dnaK	P30721 DNAK_CLOAB	65608,71094	4,8
1	94	Chaperone protein dnaK	P30721 DNAK_CLOAB	65608,71094	4,8
1	95	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	96				
1	97				
1	98	CTP synthase	Q97F61 PYRG_CLOAB	60041,76172	5,42
1	99	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	100	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	101	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	102	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	103	Trigger factor	Q97FT6 TIG_CLOAB	49508,14063	4,68
1	104	GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1.	Q97MT1 Q97MT1_CLOAB	58918,78906	5,74
1	105	DnaK protein	Q97LT2 Q97LT2_CLOAB	61654,26953	4,62
1	106	Arginyl-tRNA synthetase	Q97K78 SYR_CLOAB	64351,17969	5,35
1	107	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	108	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,94141	6,02
1	109	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	110	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,94141	6,02
1	111	Glutamyl-tRNA synthetase	Q97KC9 SYE_CLOAB	55436,23047	5,41
2		Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	112	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
1	113	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	114	Acetolactate synthase large subunit.	Q97EE4 Q97EE4_CLOAB	60074,76953	5,35
2		Lysyl-tRNA synthetase	Q97EB7 SYK_CLOAB	59566,42969	5,41
1	115	ATP synthase subunit alpha	Q9Z689 ATPA_CLOAB	55197,80078	5,21
2		2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Q97L53 GPMI_CLOAB	56366,46094	5,29
1	116	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	117	ATP synthase subunit alpha	Q9Z689 ATPA_CLOAB	55197,80078	5,21

2		Beta-glucosidase.	Q97J81 Q97J81_CLOAB	54405,30859	5,21
1	118	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Q97L53 GPMI_CLOAB	56366,46094	5,29
1	119	Glutamyl-tRNA synthetase	Q97KC9 SYE_CLOAB	55436,23047	5,41
2		Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	120	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	121	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	122	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	123	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	124	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Q97L53 GPMI_CLOAB	56366,46094	5,29
1	125	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Q97L53 GPMI_CLOAB	56366,46094	5,29
1	126	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	127	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	128	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	129	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	130	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
2		Glutamyl-tRNA synthetase	Q97KC9 SYE_CLOAB	55436,23047	5,41
1	131	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
2		Small subunit of NADPH-dependent glutamate synthase.	Q97IG7 Q97IG7_CLOAB	53572,08984	5,93
1	132	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	133				
1	134	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
2		Bifunctional purine biosynthesis protein purH	Q97J91 PUR9_CLOAB	55202,42188	5,67
1	135	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	136	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	137	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
2		Deacetylase/dipeptidase/desuccinylase family	Q97FL3 Q97FL3_CLOAB	51604,10156	4,89
1	138	Protein containing ChW-repeats.	Q97IV8 Q97IV8_CLOAB	53592,5	5,03
1	139	Deacetylase/dipeptidase/desuccinylase family	Q97FL3 Q97FL3_CLOAB	51604,10156	4,89
1	140	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,51172	4,89
1	141	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
2		Ferredoxin-nitrite reductase.	Q97MU7 Q97MU7_CLOAB	58425,16016	6,44
1	142	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	143	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	144	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	145	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	146	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	147	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
2		Beta-glucosidase.	Q97M15 Q97M15_CLOAB	54230,32031	6,11
1	148	Protein containing ChW-repeats.	Q97FZ0 Q97FZ0_CLOAB	52907,51172	5,19
1	149	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	150	Predicted Fe-S oxidoreductase.	Q97HK1 Q97HK1_CLOAB	54056,75	7,51
1	151	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	Q97D25 Q97D25_CLOAB	52453,23828	5,77
2		UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	Q97E89 MURC_CLOAB	50381,76953	5,85
1	152	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	153	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate	Q97D25 Q97D25_CLOAB	52453,23828	5,77

		dehydrogenase.			
2		UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	Q97E89 MURC_CLOAB	50381,76953	5,85
1	154	IMP dehydrogenase.	Q97FM8 Q97FM8_CLOAB	52155,21094	7,05
1	155	Bifunctional protein glmU	Q97E92 GLMU_CLOAB	49660,71094	6,01
2		Aspartyl-tRNA synthetase.	Q97EX6 Q97EX6_CLOAB	49655,35938	6,02
3		Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,85156	6,18
1	156	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,85938	5,1
1	157	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,85938	5,1
1	158	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,85938	5,1
2		Dihydroorotase	Q97LN7 PYRC_CLOAB	46498,98828	4,99
1	159	S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METK_CLOAB	43012,14063	5,32
2		Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,85938	5,1
3		Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
1	160	Seryl-tRNA synthetase 1	Q97N17 SYS1_CLOAB	48415,91016	5,75
1	161	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,85938	5,1
1	162				
1	163	Seryl-tRNA synthetase 2	Q97N21 SYS2_CLOAB	48622,16016	5,98
1	164	Iron-regulated ABC-type transporter membrane component	Q97E26 Q97E26_CLOAB	41015,62109	5,54
1	165	Serine hydroxymethyltransferase	Q97GV1 GLYA_CLOAB	45582,89063	6,16
2		Seryl-tRNA synthetase 2	Q97N21 SYS2_CLOAB	48622,16016	5,98
1	166	Serine hydroxymethyltransferase	Q97GV1 GLYA_CLOAB	45582,89063	6,16
2		Putative UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	P45360 Y2874_CLOAB	43466,60156	6,29
1	167	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,23828	4,87
1	168	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,23828	4,87
1	169	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,23828	4,87
1	170				
1	171	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,23828	4,87
1	172	O-acetylhomoserine sulfhydrylase.	Q97FF7 Q97FF7_CLOAB	46286,19141	5,91
1	173	O-acetylhomoserine sulfhydrylase.	Q97FF7 Q97FF7_CLOAB	46286,19141	5,91
1	174	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,23828	4,87
1	175	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	176	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,67188	4,59
1	177	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
2		DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Q97EK6 RPOA_CLOAB	35393,32813	4,96
1	178	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	179	Acetate kinase	P71104 ACKA_CLOAB	44313,44922	6,23
1	180	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,67188	4,59
1	181	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,67188	4,59
1	182	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	183	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	184	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,67188	4,59
1	185				
1	186	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	187	Ornithine carbamoyltransferase	Q97M82 OTC_CLOAB	37874,87891	5,14
1	188	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,67188	4,59
1	189	Related to HTH domain of SpoOJ/ParA/ParB/repB family	Q97N22 Q97N22_CLOAB	47692,57813	5,78

2		Probable S-layer protein.	Q97DC1 Q97DC1_CLOAB	48085,82031	8,26
3		ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit.	Q97KI4 HISZ_CLOAB	46219,10156	6,32
1	190	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Q97EK6 RPOA_CLOAB	35393,32813	4,96
2		Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	191	Glycerol-3-phosphate ABC-transporter, periplasmic component.	Q97LX5 Q97LX5_CLOAB	49732,92969	6,88
1	192	Cell division protein ftsZ.	Q97IE9 Q97IE9_CLOAB	39364,57813	4,87
1	193	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Q97EK6 RPOA_CLOAB	35393,32813	4,96
2		Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	194	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,10156	5,98
1	195	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,10156	5,98
1	196	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,10156	5,98
1	197	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,10156	5,98
1	198	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	199	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
1	200	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
1	201	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
2		Butyrate kinase 1	Q45829 BUK1_CLOAB	38917,42188	5,98
1	202	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
2		DNA polymerase III beta subunit.	Q97N34 Q97N34_CLOAB	41087,85156	4,83
1	203	DNA polymerase III beta subunit.	Q97N34 Q97N34_CLOAB	41087,85156	4,83
1	204	Butyrate kinase 1	Q45829 BUK1_CLOAB	38917,42188	5,98
1	205	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Q97GN4 Q97GN4_CLOAB	40527,12109	5,5
1	206	Butyrate kinase 1	Q45829 BUK1_CLOAB	38917,42188	5,98
1	207	Acetylmithine aminotransferase	Q97GH9 ARGD_CLOAB	42685,98047	6,29
2		Cyclopropane fatty acid synthase.	Q97KP0 Q97KP0_CLOAB	45342,03125	6,39
1	208	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,67188	4,59
1	209	Elongation factor Ts	Q97I65 EFTS_CLOAB	33571,42188	5,29
1	210	Elongation factor Ts	Q97I65 EFTS_CLOAB	33571,42188	5,29
2		Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,71875	5,2
1	211	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Q97GN4 Q97GN4_CLOAB	40527,12109	5,5
1	212	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,71875	5,2
1	213	Elongation factor Ts	Q97I65 EFTS_CLOAB	33571,42188	5,29
1	214	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,71875	5,2
1	215	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,71875	5,2
1	216	Flagellin	O69136 O69136_CLOAB	29502,7793	5,78
1	217	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,71875	5,2
1	218	MreB.	Q97JN1 Q97JN1_CLOAB	35670,96094	5,55
2		Isocitrate dehydrogenase.	Q97KE7 Q97KE7_CLOAB	36115,87109	5,47
1	219	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,05078	5,55
1	220	Phosphate acetyltransferase	P71103 PTA_CLOAB	36116,76172	5,06
1	221	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,05078	5,55
1	222	Flagellin	O69136 O69136_CLOAB	29502,7793	5,78
1	223	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,05078	5,55
1	224	Autolytic lysozyme	P34020 LYS_CLOAB	34956,14844	4,43
1	225	Galactose mutarotase related enzyme.	Q97ES5 Q97ES5_CLOAB	34138,89063	4,82
1	226	UPF0082 protein CA_C2295.	Q97GS1 Y2295_CLOAB	27188,38086	4,74

1	227	Putative uncharacterized protein.	Q97MY3 Q97MY3_CLOAB	31134,94922	4,67
1	228	Peptidil-prolyl cis-trans isomerase.	Q97MB9 Q97MB9_CLOAB	28266,43945	5,04
2		Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,83008	5,19
3		Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
1	229	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF	Q97KH8 HIS6_CLOAB	27524,15039	4,91
1	230	Solo B3/4 domain	Q97TI8 Q97TI8_CLOAB	26564,25977	4,97
1	231	Phosphate import ATP-binding protein pstB	Q97IE0 PSTB_CLOAB	28068,56055	6,85
2		Periplasmic phosphate-binding protein.	Q97IE3 Q97IE3_CLOAB	31691,90039	8,77
3		Single-strand DNA-binding protein, ssb.	Q97GI5 Q97GI5_CLOAB	26497,51953	7,6
1	232	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,83008	5,19
2		Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF	Q97KH8 HIS6_CLOAB	27524,15039	4,91
3		Solo B3/4 domain	Q97TI8 Q97TI8_CLOAB	26564,25977	4,97
1	233	Solo B3/4 domain	Q97TI8 Q97TI8_CLOAB	26564,25977	4,97
1	234	Cell division protein DivIVA.	Q97H95 Q97H95_CLOAB	24055,7793	4,57
1	235	50S ribosomal protein L1.	Q97EG6 RL1_CLOAB	24445,16016	9,43
2		Cell division ATP-binding protein.	Q97LQ7 Q97LQ7_CLOAB	25371,30078	8,87
3		30S ribosomal protein S2.	Q97I66 RS2_CLOAB	26120,7793	6,37
1	236	Acetoacetate decarboxylase	P23670 ADC_CLOAB	27519,08984	5,81
2		Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit	Q97E28 Q97E28_CLOAB	27422,38086	5,83
1	237	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,83008	5,19
1	238	Cell division ATP-binding protein.	Q97LQ7 Q97LQ7_CLOAB	25371,30078	8,87
2		Tryptophan synthase alpha chain	Q97EF6 TRPA_CLOAB	29142,32031	6,48
1	239	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,91016	5,78
1	240	Protein grpE	P30726 GRPE_CLOAB	22647,98047	4,5
1	241	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,91016	5,78
1	242	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,42969	5,49
1	243	50S ribosomal protein L4.	Q97EH9 RL4_CLOAB	22851,34961	9,78
1	244	Methyl methane sulfonate/mytomycin C/UV resistance protein	Q97J74 Q97J74_CLOAB	20978,41016	4,57
2		50S ribosomal protein L4.	Q97EH9 RL4_CLOAB	22851,34961	9,78
1	245	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	246	Arginine biosynthesis bifunctional protein argJ 1	Q97GH6 ARGJ1_CLOAB	43808,42969	6,27
2		Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,55078	4,98
1	247	Phage-related protein.	Q97MX8 Q97MX8_CLOAB	25993,06055	4,53
2		Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,26172	5,04
1	248	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	249				
1	250	Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,55078	4,98
1	251	Adenine phosphoribosyltransferase	Q97GU0 APT_CLOAB	18842,89063	4,94
2		Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,55078	4,98
1	252	Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,55078	4,98
1	253	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	P58276 CLPP_CLOAB	21409,96094	5,03
1	254	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q97FH0 Q97FH0_CLOAB	19406,46094	4,73
1	255	18 kDa heat shock protein	Q03928 HSP18_CLOAB	17733,7793	5,27
2		Putative uncharacterized protein.	Q97MY4 Q97MY4_CLOAB	17931,2793	4,95

3		Transcriptional regulator, Lrp family.	Q97KE2 Q97KE2_CLOAB	17555,10938	5,16
1	256	Flavodoxin.	Q97GB7 Q97GB7_CLOAB	15610,9502	4,8
1	257	Acyl carrier protein homolog	Q97HJ4 ACPH_CLOAB	11992,08984	4,25
1	258	Thioredoxin.	Q97EM7 Q97EM7_CLOAB	11560,84961	4,69
2		50S ribosomal protein L17.	Q97EK7 RL17_CLOAB	13001,0498	10,3 5
1	259	Uncharacterized protein from alkaline shock protein family	Q97HC7 Q97HC7_CLOAB	13887,2998	4,6
1	260	10 kDa chaperonin	P30719 CH10_CLOAB	10419,58008	5,06
1	261	50S ribosomal protein L7/L12.	Q97EG8 RL7_CLOAB	12612,73047	4,86
1	262				
1	263	30S ribosomal protein S6.	Q97CX2 RS6_CLOAB	10905,74023	4,95
1	264	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,05078	5,55
2		ABC transporter, ATP-binding protein.	Q97MP5 Q97MP5_CLOAB	35460,73828	5,99
1	265	UDP-glucose 4-epimerase.	Q97J57 Q97J57_CLOAB	36049,39063	5,89
2		ABC transporter, ATP-binding protein.	Q97MP5 Q97MP5_CLOAB	35460,73828	5,99
1	266	ABC transporter, ATP-binding protein.	Q97MP5 Q97MP5_CLOAB	35460,73828	5,99
1	267	Dihydrodipicolinate synthase 1	Q97GI9 DAPA1_CLOAB	32210,91016	8,16
2		Lactate dehydrogenase.	Q97IU7 Q97IU7_CLOAB	36566,96875	6,41
1	268	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	269	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	270	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	271	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	272	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	273				
1	274	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	275	Acetyl-CoA acetyltransferase	P45359 THLA_CLOAB	41214,48828	6,92
1	276	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
1	277	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
1	278	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
1	279	Acetyl-CoA acetyltransferase	P45359 THLA_CLOAB	41214,48828	6,92
2		Cyclopropane fatty acid synthase.	Q97KP0 Q97KP0_CLOAB	45342,03125	6,39
3		Acetylmethionine aminotransferase	Q97GH9 ARGD_CLOAB	42685,98047	6,29
1	280	HTH-type transcriptional regulator regA.	P58258 REGA_CLOAB	37399,60938	5,56
2		Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,85938	5,94
1	281	Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,85938	5,94
1	282	Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,85938	5,94
2		DAHP synthase related protein.	Q97KM5 Q97KM5_CLOAB	37190,57031	6,16
1	283	Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,85938	5,94
1	284	Putative uncharacterized protein.	Q97G10 Q97G10_CLOAB	35276,46094	6,46
1	285	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,05078	5,55
1	286	Predicted aldo/keto reductase, YTBE/YVGN <i>B.subtilis</i> ortholog	Q97HQ1 Q97HQ1_CLOAB	31799,40039	6,27
2		6-phosphofructokinase	O08308 K6PF_CLOAB	34171,94141	6,92
1	287	Predicted aldo/keto reductase, YTBE/YVGN <i>B.subtilis</i> ortholog	Q97HQ1 Q97HQ1_CLOAB	31799,40039	6,27
2		Phosphate butyryltransferase	P58255 PTB_CLOAB	32206,99023	6,34
3		6-phosphofructokinase	O08308 K6PF_CLOAB	34171,94141	6,92
1	288	Phosphate butyryltransferase	P58255 PTB_CLOAB	32206,99023	6,34

2		Stage 0 sporulation protein A homolog.	P58253 SP0A_CLOAB	31510,51953	6,36
1	289	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Q97GN3 Q97GN3_CLOAB	32042,55078	5,73
1	290	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Q97GN3 Q97GN3_CLOAB	32042,55078	5,73
2		30S ribosomal protein S2.	Q97I66 RS2_CLOAB	26120,7793	6,37
1	291	Adenylosuccinate synthetase	Q97D87 PURA_CLOAB	46938,98828	5,49
1	292	Asparaginyl-tRNA synthetase	Q97E56 SYN_CLOAB	53406,01953	5,34
1	293	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
2		Argininosuccinate lyase	Q97KE5 ARLY_CLOAB	50058,80859	5,49
1	294	S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METK_CLOAB	43012,14063	5,32
2		Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
1	295	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
1	296	S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METK_CLOAB	43012,14063	5,32
2		Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
1	297	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
2		S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METK_CLOAB	43012,14063	5,32
1	298	Homoserine dehydrogenase.	Q97KC1 Q97KC1_CLOAB	47620,92969	5,23
2		Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
1	299	Histidyl-tRNA synthetase	Q97FJ7 SYH_CLOAB	49214,85156	5,35
1	300	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,12891	5,62
1	301	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,12891	5,62
1	302	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Q97L53 GPMI_CLOAB	56366,46094	5,29
2		Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
3		Iron-regulated ABC-type transporter membrane component	Q97E27 Q97E27_CLOAB	51871,03906	5,32
1	303	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
2		Glutamyl-tRNA synthetase	Q97KC9 SYE_CLOAB	55436,23047	5,41
1	304	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
2		Iron-regulated ABC-type transporter membrane component	Q97E27 Q97E27_CLOAB	51871,03906	5,32
1	305	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A 2	Q97EX8 GATA2_CLOAB	52447,98828	5,24
2		ATP synthase subunit alpha	Q9Z689 ATPA_CLOAB	55197,80078	5,21
1	306	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,12109	5,74
1	307	Glycyl-tRNA synthetase	Q97EB8 SYG_CLOAB	53342,58984	5,3
1	308	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A 1	Q97FQ7 GATA1_CLOAB	53175,12109	5,47
1	309	Adenylosuccinate synthetase	Q97D87 PURA_CLOAB	46938,98828	5,49
1	310	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
1	311	Argininosuccinate lyase	Q97KE5 ARLY_CLOAB	50058,80859	5,49
1	312	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,17188	5,37
2		S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METK_CLOAB	43012,14063	5,32
1	313	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX.	Q97FT7 CLPX_CLOAB	47581,10938	5,51
1	314	Homoserine dehydrogenase.	Q97KC1 Q97KC1_CLOAB	47620,92969	5,23
1	315				
1	316	Ornithine carbamoyltransferase	Q97M82 OTC_CLOAB	37874,87891	5,14
1	317	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,12891	5,62
1	318	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Q97I09 ISPH_CLOAB	71944,02344	5,73
1	319				

1	320				
1	321	PLP-dependent aminotransferase.	Q97FA8 Q97FA8_CLOAB	44005,42188	5,37
1	322	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Q97I09 ISPH_CLOAB	71944,02344	5,73
1	323	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,67969	5,93
1	324	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	325	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	326	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
1	327	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
1	328	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
2		Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,83008	5,19
1	329	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
1	330	Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	331	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,60938	5,39
2		Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	332	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,42969	5,49
2		3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,60938	5,39
1	333	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,35156	5,54
1	334	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,35156	5,54
1	335	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,83008	5,19
1	336	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,83008	5,19
1	337	Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	338	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,60938	5,39
1	339	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,60938	5,39
1	340	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase.	Q97GI6 Q97GI6_CLOAB	25103,10938	5,22
2		NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,42969	5,49
1	341	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,42969	5,49
1	342	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,42969	5,49
2		Phage shock protein A.	Q97M85 Q97M85_CLOAB	24963,84961	5,35
1	343	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,42969	5,49
1	344	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,35156	5,54
1	345	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,05078	5,78
1	346	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,35156	5,54
1	347	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53
1	348	Multimeric flavodoxin WrbA family protein.	Q97DX9 Q97DX9_CLOAB	22507,26953	8,47
1	349	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisH	Q97KI0 HIS5_CLOAB	22503,58008	7,64
1	350	ATP synthase subunit delta	Q9Z690 Q9Z690_CLOAB	20781,33984	7,82
2		50S ribosomal protein L5.	Q97EJ0 RL5_CLOAB	20648,99023	9,5
3		Translation initiation factor IF-3.	Q97GK5 IF3_CLOAB	19844,78906	9,59
1	351	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Q97EE1 LEUD_CLOAB	18013,19922	5,74
1	352	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,35156	5,54
1	353	18 kDa heat shock protein	Q03928 HSP18_CLOAB	17733,7793	5,27
1	354	50S ribosomal protein L27.	Q97JL5 RL27_CLOAB	10796,73047	9,76
2		Phosphocarrier Protein	Q97I34 Q97I34_CLOAB	9023,919922	7,98
1	355	Uncharacterized, ortholog of YgaT gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR2 Q97TR2_CLOAB	25789,64063	5,53

1	356				
1	357				
1	358				
1	359				
1	360	Phosphocarrier Protein	Q97I34 Q97I34_CLOAB	9023,919922	7,98
2		HIT family hydrolase.	Q97JJ3 Q97JJ3_CLOAB	12579,51953	5,93
1	361	18 kDa heat shock protein	Q03928 HSP18_CLOAB	17733,7793	5,27
1	362				
1	363	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	364	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	365	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	366	DTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase.	Q97GN5 Q97GN5_CLOAB	21332,58984	5,12
1	367	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	368	DTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase.	Q97GN5 Q97GN5_CLOAB	21332,58984	5,12
1	369	Single-stranded DNA-binding protein 3	Q97CX3 SSB3_CLOAB	15944,84961	4,86
1	370	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneam	Q97KH9 HIS4_CLOAB	26096,08984	6,03
1	371	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,91016	5,78
1	372	Lipase-esterase related protein.	Q97KV0 Q97KV0_CLOAB	27118,19922	5,68
1	373	Uncharacterized, ortholog of YgaS gene of <i>B.subtilis</i> .	Q97TR1 Q97TR1_CLOAB	24484,83008	5,58
1	374	Nitrogen regulatory protein PII, gene nrgB.	Q97L81 Q97L81_CLOAB	13462,0498	5,31
1	375	Putative septation protein spoVG.	Q97E91 SP5G_CLOAB	10801,57031	5,25
1	376	Putative septation protein spoVG.	Q97E91 SP5G_CLOAB	10801,57031	5,25
1	377				
1	378	10 kDa chaperonin	P30719 CH10_CLOAB	10419,58008	5,06
1	379	TPR-repeat-containing protein.	Q97DM4 Q97DM4_CLOAB	35915,89063	4,89
1	380	Putative uncharacterized protein.	Q97LR6 Q97LR6_CLOAB	13448,88965	5,05
1	381				
1	8	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88
1	9	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,5313	5,88

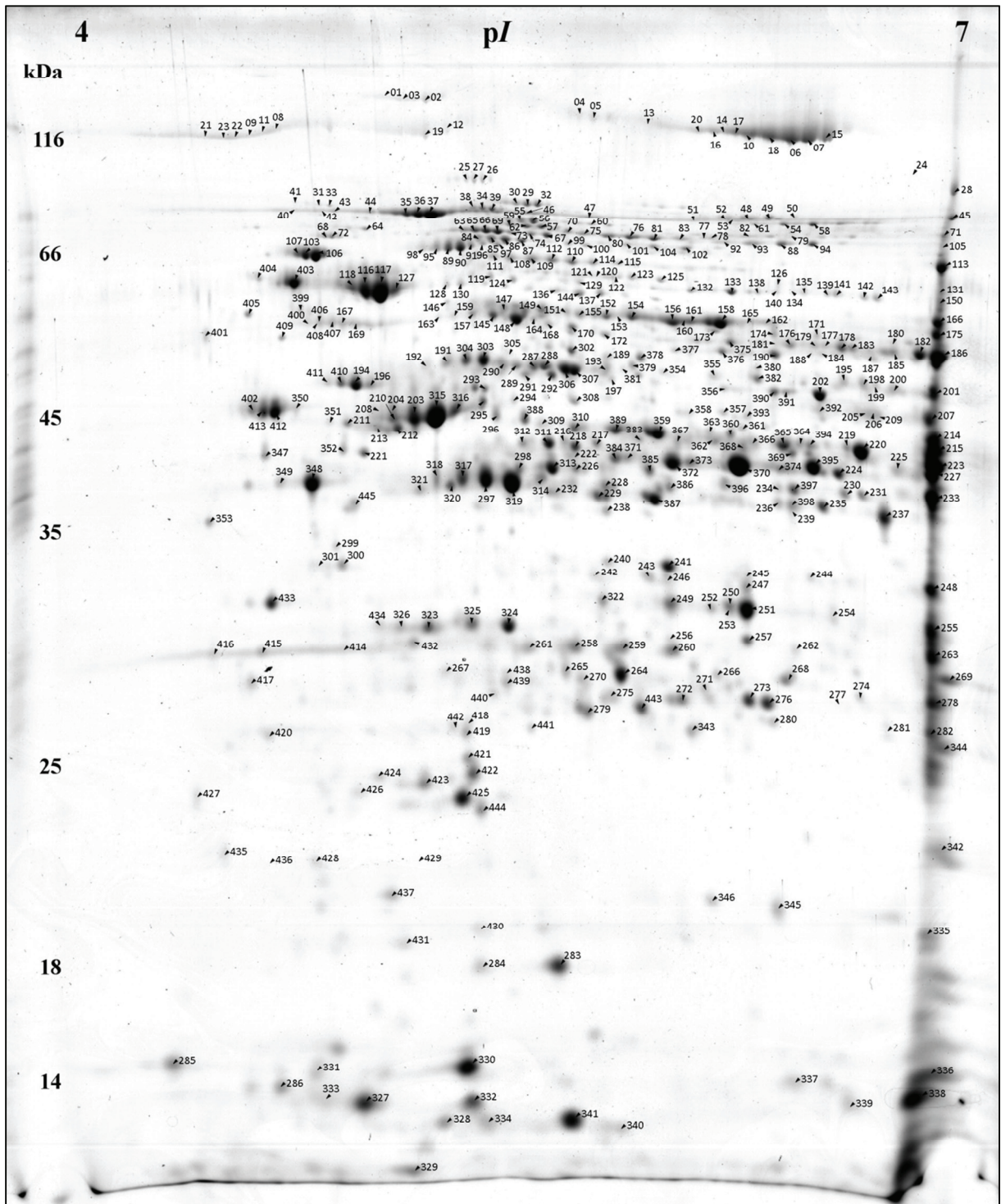


Abbildung A3: Proteomkarte cytosolischer Proteine von Zellen der Lösungsmittelphase (pH 4,5). Die Nummern markieren alle detektierten Proteinspots, welche mittels MALDI-TOF identifiziert worden sind. Identifizierte Proteine sind in Tabelle A2 aufgelistet.

Tabelle A3: Liste der unter Lösungsmittelproduktion identifizierten Proteine. Angeben sind die Spotnummern, der dazugehörige Rank (bei Doppelidentifikationen), der Proteinname, die Accession Number (www.uniprot.org), das Molekulargewicht (MW) und der isoelektrische Punkt (pI).

Rank	Spot	Protein Name	UniProt: Accession Number	MW	pI
1	1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Q97EG9 RPOB_CLOAB	139162,484	4,93
1	2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Q97EG9 RPOB_CLOAB	139162,484	4,93
1	3	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Q97EG9 RPOB_CLOAB	139162,484	4,93
1	4	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	Q97FT3 CARB_CLOAB	118385,406	5,37
1	5				
1	6	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	7	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	10	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	11	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	12	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	13	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	14	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	15	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	16	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	17	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	18	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	19	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	20	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	21	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	22	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	23	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	24				
1	25	Zn-dependent peptidase, insulinase family.	Q97EV0 Q97EV0_CLOAB	113308,328	5,16
1	26	Zn-dependent peptidase, insulinase family.	Q97EV0 Q97EV0_CLOAB	113308,328	5,16
1	27	Zn-dependent peptidase, insulinase family.	Q97EV0 Q97EV0_CLOAB	113308,328	5,16
1	28	Ribonucleotide reductase, vitamin B12-dependent.	Q97K72 Q97K72_CLOAB	110428,391	6,71
1	29	Protein translocase subunit secA.	Q97F94 SECA_CLOAB	95698,6797	5,25
1	30	Protein translocase subunit secA.	Q97F94 SECA_CLOAB	95698,6797	5,25
1	31				
1	32	Protein translocase subunit secA.	Q97F94 SECA_CLOAB	95698,6797	5,25
1	33	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	34	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
2		Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	Q97GL0 SYFB_CLOAB	88725,2031	5,13
1	35	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,6719	4,96
1	36	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,6719	4,96
1	37	Elongation factor G	Q97EH4 EFG_CLOAB	76354,6719	4,96
1	38	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	39	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
2		Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	Q97GL0 SYFB_CLOAB	88725,2031	5,13
1	40	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	41	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	42	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44

1	43	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	44	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	45	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	46	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	47	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
1	48	Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,6016	5,79
1	49	Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,6016	5,79
1	50	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
2		Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,6016	5,79
1	51	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
2		Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,6016	5,79
1	52	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
2		Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,6016	5,79
3		Leucyl-tRNA synthetase	Q97LB6 SYL_CLOAB	92829,6719	5,81
1	53	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	P33744 ADHE_CLOAB	95260,6016	8,44
2		Chaperone protein clpB.	Q97KG0 CLPB_CLOAB	97874,6016	5,79
1	54	ATPases with chaperone activity clpC, two ATP-binding domain	Q97EC4 Q97EC4_CLOAB	91806,5078	5,94
1	55	Translation initiation factor IF-2.	Q97I51 IF2_CLOAB	76289,75	5,16
1	56	Translation initiation factor IF-2.	Q97I51 IF2_CLOAB	76289,75	5,16
1	57	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Q97I45 PNP_CLOAB	77940,1563	5,28
1	58	ATPases with chaperone activity clpC, two ATP-binding domain	Q97EC4 Q97EC4_CLOAB	91806,5078	5,94
1	59	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Q97I45 PNP_CLOAB	77940,1563	5,28
1	60	FUSION ribonuclease and ribosomal protein S1 domain.	Q97L50 Q97L50_CLOAB	83816,1719	5,37
1	61	ATPases with chaperone activity clpC, two ATP-binding domain	Q97EC4 Q97EC4_CLOAB	91806,5078	5,94
1	62	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Q97I45 PNP_CLOAB	77940,1563	5,28
1	63	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,2109	5,13
1	64	Possible processive endoglucanase family 48, secreted; CelF	Q97KK7 Q97KK7_CLOAB	80667,1172	5,12
1	65	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,2109	5,13
1	66	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,2109	5,13
1	67	Aspartyl-tRNA synthetase	Q97GU6 SYD_CLOAB	68200,1016	5,24
1	68	Chemotaxis histidine kinase, CheA	Q97GZ5 Q97GZ5_CLOAB	77583,5313	4,79
1	69	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,2109	5,13
1	70				
1	71	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	72	Chemotaxis histidine kinase, CheA	Q97GZ5 Q97GZ5_CLOAB	77583,5313	4,79
1	73	TYP A/BIP A type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,2109	5,13
2		Aspartyl-tRNA synthetase	Q97GU6 SYD_CLOAB	68200,1016	5,24
1	74	Aspartyl-tRNA synthetase	Q97GU6 SYD_CLOAB	68200,1016	5,24
1	75	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	76	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	77	2-enoate reductase	Q97DV0 Q97DV0_CLOAB	73279,2422	5,62
1	78	2-enoate reductase	Q97DV0 Q97DV0_CLOAB	73279,2422	5,62
1	79	Pyruvate-formate lyase.	Q97KD9 Q97KD9_CLOAB	83949,5313	6,24
1	80	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56
1	81	Glutamine synthetase type III.	Q97FR9 Q97FR9_CLOAB	76693,5625	5,56

1	82	DNA gyrase subunit B	P94604 GYRB_CLOAB	71569,6016	5,8
1	83				
1	84	TYPA/BIPA type GTPase.	Q97IF7 Q97IF7_CLOAB	67690,2109	5,13
2		Uncharacterized conserved protein.	Q97GZ0 Q97GZ0_CLOAB	71005,6016	5,2
1	85	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,6797	5,21
2		Uncharacterized conserved protein.	Q97GZ0 Q97GZ0_CLOAB	71005,6016	5,2
1	86	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,6797	5,21
1	87	Transketolase.	Q97KH5 Q97KH5_CLOAB	72661,6797	5,21
1	88	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,9688	5,83
1	89	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,4609	5,09
1	90	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,4609	5,09
1	91	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,4609	5,09
1	92	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,9688	5,83
1	93	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,9688	5,83
1	94	Aconitase A.	Q97KE8 Q97KE8_CLOAB	69589,9688	5,83
1	95	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,4609	5,09
1	96	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	Q97MN6 GLMS_CLOAB	66906,6094	5,24
1	97	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	Q97MN6 GLMS_CLOAB	66906,6094	5,24
1	98	Chaperone protein htpG	Q97E05 HTPG_CLOAB	72361,4609	5,09
1	99	Prolyl-tRNA synthetase	Q97ED5 SYP_CLOAB	64096,3008	5,37
1	100	Prolyl-tRNA synthetase	Q97ED5 SYP_CLOAB	64096,3008	5,37
1	101	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	102	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	103	Chaperone protein dnaK	P30721 DNAK_CLOAB	65608,7109	4,8
1	104	Methionyl-tRNA synthetase	Q97EW5 SYM_CLOAB	73571,3125	5,57
1	105				
1	106	Chaperone protein dnaK	P30721 DNAK_CLOAB	65608,7109	4,8
1	107	Chaperone protein dnaK	P30721 DNAK_CLOAB	65608,7109	4,8
1	108	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	109	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	110	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	111	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	112	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	113	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	114	Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	115	CTP synthase	Q97F61 PYRG_CLOAB	60041,7617	5,42
2		Carbon-monoxide dehydrogenase, beta chain.	Q97MS5 Q97MS5_CLOAB	68342,3594	5,4
1	116	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
1	117	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
1	118	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
1	119	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	120				
1	121	Phosphomannomutase.	Q97GM9 Q97GM9_CLOAB	64674,3203	5,59
1	122	Phosphomannomutase.	Q97GM9 Q97GM9_CLOAB	64674,3203	5,59
1	123	Phosphomannomutase.	Q97GM9 Q97GM9_CLOAB	64674,3203	5,59
1	124	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88

1	125	Phosphomannomutase.	Q97GM9 Q97GM9_CLOAB	64674,3203	5,59
1	126				
1	127	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
1	128	Phosphoenolpyruvate-protein kinase	Q97EM3 Q97EM3_CLOAB	59782,75	5,08
1	129	Arginyl-tRNA synthetase	Q97K78 SYR_CLOAB	64351,1797	5,35
1	130	Phosphoenolpyruvate-protein kinase	Q97EM3 Q97EM3_CLOAB	59782,75	5,08
1	131	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	132	GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1.	Q97MT1 Q97MT1_CLOAB	58918,7891	5,74
1	133	GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1.	Q97MT1 Q97MT1_CLOAB	58918,7891	5,74
1	134	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,9414	6,02
1	135				
1	136	Acetolactate synthase large subunit.	Q97EE4 Q97EE4_CLOAB	60074,7695	5,35
2		Lysyl-tRNA synthetase	Q97EB7 SYK_CLOAB	59566,4297	5,41
1	137	Lysyl-tRNA synthetase	Q97EB7 SYK_CLOAB	59566,4297	5,41
1	138				
1	139	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,9414	6,02
1	140	GTPase, sulfate adenylate transferase subunit 1.	Q97MT1 Q97MT1_CLOAB	58918,7891	5,74
1	141	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,9414	6,02
1	142	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,9414	6,02
1	143	Dihydroxy-acid dehydratase	Q97EE3 ILVD_CLOAB	58328,9414	6,02
1	144	Acetolactate synthase large subunit.	Q97EE4 Q97EE4_CLOAB	60074,7695	5,35
2		Lysyl-tRNA synthetase	Q97EB7 SYK_CLOAB	59566,4297	5,41
1	145	ATP synthase subunit alpha	Q9Z689 ATPA_CLOAB	55197,8008	5,21
1	146	ATPase components of ABC transporter with duplicated ATPase	Q97F07 Q97F07_CLOAB	59446,0703	5
1	147				
1	148	ATP synthase subunit alpha	Q9Z689 ATPA_CLOAB	55197,8008	5,21
1	149	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Q97L53 GPMI_CLOAB	56366,4609	5,29
1	150	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
2		Predicted metal-dependent hydrolase of metallo-beta-lactamas	Q97IF8 Q97IF8_CLOAB	61614,9805	7,29
1	151	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	152	Glutamyl-tRNA synthetase	Q97KC9 SYE_CLOAB	55436,2305	5,41
2		Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	153	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	154	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	155	Glutamyl-tRNA synthetase	Q97KC9 SYE_CLOAB	55436,2305	5,41
1	156	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	157	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	158	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	159	ATP synthase subunit alpha	Q9Z689 ATPA_CLOAB	55197,8008	5,21
1	160	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	161	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	162	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
1	163	Ferredoxin-nitrite reductase.	Q97MU7 Q97MU7_CLOAB	58425,1602	6,44
1	164				
1	165	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74

1	166	Formate--tetrahydrofolate ligase	Q97EB3 FTHS_CLOAB	60468,4102	6,5
1	167	Formate--tetrahydrofolate ligase	Q97EB3 FTHS_CLOAB	60468,4102	6,5
1	168	Glycyl-tRNA synthetase	Q97EB8 SYG_CLOAB	53342,5898	5,3
1	169				
1	170	Glycyl-tRNA synthetase	Q97EB8 SYG_CLOAB	53342,5898	5,3
1	171	Small subunit of NADPH-dependent glutamate synthase.	Q97IG7 Q97IG7_CLOAB	53572,0898	5,93
1	172	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A 1	Q97FQ7 GATA1_CLOAB	53175,1211	5,47
1	173	Pyruvate kinase	O08309 KPYK_CLOAB	50560,1211	5,74
2		Bifunctional purine biosynthesis protein purH	Q97J91 PUR9_CLOAB	55202,4219	5,67
1	174	Small subunit of NADPH-dependent glutamate synthase.	Q97IG7 Q97IG7_CLOAB	53572,0898	5,93
1	175				
1	176	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	177	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	178	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	179	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	180	Beta-glucosidase.	Q97M15 Q97M15_CLOAB	54230,3203	6,11
1	181	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	182				
1	183	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	184				
1	185	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
1	186	IMP dehydrogenase.	Q97FM8 Q97FM8_CLOAB	52155,2109	7,05
1	187	Pyruvate kinase	Q97K83 Q97K83_CLOAB	51179,8516	6,18
2		Aspartyl-tRNA synthetase.	Q97EX6 Q97EX6_CLOAB	49655,3594	6,02
1	188	Fe-S oxidoreductase.	Q97K49 Q97K49_CLOAB	53097,4805	6,01
3		Aspartyl-tRNA synthetase.	Q97EX6 Q97EX6_CLOAB	49655,3594	6,02
1	189	Adenylosuccinate synthetase	Q97D87 PURA_CLOAB	46938,9883	5,49
1	190	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	Q97D25 Q97D25_CLOAB	52453,2383	5,77
2		UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	Q97E89 MURC_CLOAB	50381,7695	5,85
1	191	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,8594	5,1
1	192	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,8594	5,1
1	193	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,1719	5,37
2		Argininosuccinate lyase	Q97KE5 ARLY_CLOAB	50058,8086	5,49
1	194	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,2383	4,87
1	195	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,2383	4,87
1	196	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,2383	4,87
1	197	Iron-regulated ABC-type transporter membrane component	Q97E26 Q97E26_CLOAB	41015,6211	5,54
1	198				
1	199	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	Q97EE0 LEU2_CLOAB	45498,5	6,19
1	200				
1	201	Serine hydroxymethyltransferase	Q97GV1 GLYA_CLOAB	45582,8906	6,16
1	202	O-acetylhomoserine sulfhydrylase.	Q97FF7 Q97FF7_CLOAB	46286,1914	5,91
1	203	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	204	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	205	Acetate kinase	P71104 ACKA_CLOAB	44313,4492	6,23

1	206	Acetate kinase	P71104 ACKA_CLOAB	44313,4492	6,23
1	207	Acetate kinase	P71104 ACKA_CLOAB	44313,4492	6,23
1	208	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	209	Acetate kinase	P71104 ACKA_CLOAB	44313,4492	6,23
1	210	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	211	Cell division protein ftsZ.	Q97IE9 Q97IE9_CLOAB	39364,5781	4,87
1	212	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Q97EK6 RPOA_CLOAB	35393,3281	4,96
1	213	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Q97EK6 RPOA_CLOAB	35393,3281	4,96
1	214	Similar to C-ter. of UDP-glucuronosyltransferases, YpfP <i>B.subtilis</i>	Q97TG4 Q97TG4_CLOAB	43437,1719	6,58
1	215	Protein recA	P58254 RECA_CLOAB	38065,0898	6,88
1	216	PLP-dependent aminotransferase.	Q97FA8 Q97FA8_CLOAB	44005,4219	5,37
1	217	PLP-dependent aminotransferase.	Q97FA8 Q97FA8_CLOAB	44005,4219	5,37
1	218	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Q97I09 ISPH_CLOAB	71944,0234	5,73
1	219	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,1016	5,98
1	220	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,1016	5,98
1	221	DNA polymerase III beta subunit.	Q97N34 Q97N34_CLOAB	41087,8516	4,83
1	222	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	223				
1	224	Butyrate kinase 1	Q45829 BUK1_CLOAB	38917,4219	5,98
1	225	Butyrate kinase 1	Q45829 BUK1_CLOAB	38917,4219	5,98
1	226	NADH-dependent butanol dehydrogenase.	Q97DT0 Q97DT0_CLOAB	42218,8086	5,39
1	227	Acetyl-CoA acetyltransferase	P45359 THLA_CLOAB	41214,4883	6,92
1	228	Acetyl-CoA acetyltransferase	P45359 THLA_CLOAB	41214,4883	6,92
1	229	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,0508	5,55
1	230	Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,8594	5,94
1	231	Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,8594	5,94
1	232				
1	233	Putative uncharacterized protein.	Q97G10 Q97G10_CLOAB	35276,4609	6,46
1	234	Putative uncharacterized protein.	Q97G10 Q97G10_CLOAB	35276,4609	6,46
1	235	UDP-glucose 4-epimerase.	Q97J57 Q97J57_CLOAB	36049,3906	5,89
1	236	UDP-glucose 4-epimerase.	Q97J57 Q97J57_CLOAB	36049,3906	5,89
1	237	ABC transporter, ATP-binding protein.	Q97MP5 Q97MP5_CLOAB	35460,7383	5,99
1	238	Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	Q97H75 PPAC_CLOAB	34502,8398	5,42
1	239				
1	240	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,3516	5,54
1	241	Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,3516	5,54
1	242	Pyridoxal biosynthesis lyase pdxS	Q97LG7 PDXS_CLOAB	31812,3105	5,5
1	243	Pyridoxal biosynthesis lyase pdxS	Q97LG7 PDXS_CLOAB	31812,3105	5,5
1	244	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase.	Q97K96 Q97K96_CLOAB	30633,0508	5,92
1	245				
1	246	8-oxoguanine-DNA-glycosylase.	Q97FM4 Q97FM4_CLOAB	34397,3398	5,54
2		Cysteine synthase	Q97GY0 Q97GY0_CLOAB	32918,3516	5,54
1	247	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
1	248	Predicted aldo/keto reductase, YTBE/YVGN <i>B.subtilis</i> ortholog	Q97HQ1 Q97HQ1_CLOAB	31799,4004	6,27
2		6-phosphofructokinase	O08308 K6PF_CLOAB	34171,9414	6,92

1	249	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
1	250	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
1	251	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
1	252	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
2		Exodeoxyribonuclease	Q97MH6 Q97MH6_CLOAB	29431,5898	5,59
1	253	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
1	254	Stage 0 sporulation protein A homolog.	P58253 SP0A_CLOAB	31510,5195	6,36
1	255				
1	256	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Q97GN3 Q97GN3_CLOAB	32042,5508	5,73
2		Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	257	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Q97GN3 Q97GN3_CLOAB	32042,5508	5,73
1	258	Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	259	Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	260				
1	261	Fructose-bisphosphate aldolase	Q97KT9 Q97KT9_CLOAB	30367,7207	5,49
1	262	30S ribosomal protein S2.	Q97I66 RS2_CLOAB	26120,7793	6,37
1	263	Phosphate import ATP-binding protein pstB	Q97IE0 PSTB_CLOAB	28068,5605	6,85
1	264	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,6094	5,39
1	265	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,6094	5,39
1	266	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,6094	5,39
1	267	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,8301	5,19
1	268	Acetoacetate decarboxylase	P23670 ADC_CLOAB	27519,0898	5,81
1	269	50S ribosomal protein L1.	Q97EG6 RL1_CLOAB	24445,1602	9,43
1	270	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,4297	5,49
1	271	Dihydrodipicolinate reductase	Q97GI8 DAPB_CLOAB	27283,7598	5,65
1	272	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,9102	5,78
1	273	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,9102	5,78
1	274	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,9102	5,78
1	275	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,9102	5,78
2		SpoOJ regulator, soj/para family.	Q97TD5 Q97TD5_CLOAB	28560,75	5,42
1	276	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,9102	5,78
1	277	Triosephosphate isomerase	O52633 TPIS_CLOAB	26526,9102	5,78
1	278	Butyrate--acetoacetate CoA-transferase subunit B	P23673 CTFB_CLOAB	23608,5996	7,79
1	279	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,4297	5,49
1	280	Adenylate kinase	Q97EJ9 KAD_CLOAB	23929,3809	5,83
1	281	Uracil phosphoribosyltransferase	Q97F73 UPP_CLOAB	22995,2109	6,45
1	282	Uracil phosphoribosyltransferase	Q97F73 UPP_CLOAB	22995,2109	6,45
1	283	18 kDa heat shock protein	Q03928 HSP18_CLOAB	17733,7793	5,27
1	284	18 kDa heat shock protein	Q03928 HSP18_CLOAB	17733,7793	5,27
1	285	Acyl carrier protein homolog	Q97HJ4 ACPH_CLOAB	11992,0898	4,25
1	286	Uncharacterized protein from alkaline shock protein family,	Q97HC7 Q97HC7_CLOAB	13887,2998	4,6
1	287	S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METHK_CLOAB	43012,1406	5,32
1	288	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,1719	5,37
1	289	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,1719	5,37
1	290	S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METHK_CLOAB	43012,1406	5,32
2		Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,1719	5,37

3		Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,8594	5,1
1	291	Homoserine dehydrogenase.	Q97KC1 Q97KC1_CLOAB	47620,9297	5,23
1	292	Homoserine dehydrogenase.	Q97KC1 Q97KC1_CLOAB	47620,9297	5,23
1	293	Transcription terminator NusA.	Q97I54 Q97I54_CLOAB	39770,8906	5,14
1	294	Peptide chain release factor 1	Q97F68 RF1_CLOAB	40949,5703	5,18
2		Histidyl-tRNA synthetase	Q97FJ7 SYH_CLOAB	49214,8516	5,35
1	295	Sensory protein, containing EAL-domain.	Q97M76 Q97M76_CLOAB	46403,0313	5,1
1	296	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	297	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,7188	5,2
1	298	Elongation factor Ts	Q97I65 EFTS_CLOAB	33571,4219	5,29
1	299	Galactose mutarotase related enzyme.	Q97ES5 Q97ES5_CLOAB	34138,8906	4,82
1	300	UPF0082 protein CA_C2295.	Q97GS1 Y2295_CLOAB	27188,3809	4,74
1	301	UPF0082 protein CA_C2295.	Q97GS1 Y2295_CLOAB	27188,3809	4,74
1	302	Asparaginyl-tRNA synthetase	Q97E56 SYN_CLOAB	53406,0195	5,34
1	303	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,8594	5,1
1	304	Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,8594	5,1
1	305	Xre family DNA-binding domain and TPR-repeat-containing prot	Q97KG1 Q97KG1_CLOAB	50251,0195	5,19
2		Argininosuccinate synthase	Q97KE6 ASSY_CLOAB	45016,8594	5,1
1	306	S-adenosylmethionine synthetase	Q97F85 METHK_CLOAB	43012,1406	5,32
1	307	Glucose-6-phosphate isomerase	Q97FP8 G6PI_CLOAB	49759,1719	5,37
1	308	Histidyl-tRNA synthetase	Q97FJ7 SYH_CLOAB	49214,8516	5,35
1	309	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,1289	5,62
1	310	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,1289	5,62
1	311	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Q97I09 ISPH_CLOAB	71944,0234	5,73
1	312	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Q97I09 ISPH_CLOAB	71944,0234	5,73
1	313	Elongation factor Ts	Q97I65 EFTS_CLOAB	33571,4219	5,29
1	314	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,7188	5,2
1	315	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	316	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	317	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,7188	5,2
1	318	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,7188	5,2
1	319	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,7188	5,2
1	320	Ketol-acid reductoisomerase	Q97MV0 ILVC_CLOAB	37638,7188	5,2
2		Phosphate acetyltransferase	P71103 PTA_CLOAB	36116,7617	5,06
1	321	Phosphate acetyltransferase	P71103 PTA_CLOAB	36116,7617	5,06
1	322	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	P52041 HBD_CLOAB	30563,0508	5,78
1	323	Peptidil-prolyl cis-trans isomerase.	Q97MB9 Q97MB9_CLOAB	28266,4395	5,04
1	324	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,8301	5,19
1	325	Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,8301	5,19
1	326	Peptidil-prolyl cis-trans isomerase.	Q97MB9 Q97MB9_CLOAB	28266,4395	5,04
1	327	50S ribosomal protein L7/L12.	Q97EG8 RL7_CLOAB	12612,7305	4,86
2		Rubrerhythrin.	Q97D83 Q97D83_CLOAB	20093,8906	5,5
1	328	Putative uncharacterized protein.	Q97LR6 Q97LR6_CLOAB	13448,8896	5,05
1	329	30S ribosomal protein S6.	Q97CX2 RS6_CLOAB	10905,7402	4,95
1	330	10 kDa chaperonin	P30719 CH10_CLOAB	10419,5801	5,06

1	331	10 kDa chaperonin	P30719 CH10_CLOAB	10419,5801	5,06
2		Thioredoxin.	Q97EM7 Q97EM7_CLOAB	11560,8496	4,69
1	332	Cold shock protein.	Q97EW6 Q97EW6_CLOAB	7306,56006	4,92
1	333	Rubrerhythrin.	Q97D83 Q97D83_CLOAB	20093,8906	5,5
1	334	Putative septation protein spoVG.	Q97E91 SP5G_CLOAB	10801,5703	5,25
1	335	50S ribosomal protein L10.	Q97EG7 RL10_CLOAB	18710,9297	6,64
1	336	Phosphocarrier Protein	Q97I34 Q97I34_CLOAB	9023,91992	7,98
2		50S ribosomal protein L27.	Q97JL5 RL27_CLOAB	10796,7305	9,76
1	337				
1	338	FMN-binding protein.	Q97DF1 Q97DF1_CLOAB	13759,96	6,82
1	339				
1	340	UPF0296 protein CA_C1717.	Q97ID1 Y1717_CLOAB	10092,3301	5,3
2		Chemotaxis signal receiving protein CheY.	Q97GZ7 Q97GZ7_CLOAB	13100,7695	5,47
1	341	Putative septation protein spoVG.	Q97E91 SP5G_CLOAB	10801,5703	5,25
1	342	50S ribosomal protein L5.	Q97EJ0 RL5_CLOAB	20648,9902	9,5
2		ATP synthase subunit delta	Q9Z690 Q9Z690_CLOAB	20781,3398	7,82
1	343	Lipase-esterase related protein.	Q97KV0 Q97KV0_CLOAB	27118,1992	5,68
1	344	Butyrate--acetoacetate CoA-transferase subunit A	P33752 CTFA_CLOAB	23625,5508	8,99
1	345	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Q97EE1 LEUD_CLOAB	18013,1992	5,74
1	346	Ribosome-associated protein Y	Q97F93 Q97F93_CLOAB	20280,5391	5,59
1	347	Extracellular neutral metalloprotease, NPRE.	Q97G52 Q97G52_CLOAB	60325,2383	6,38
1	348	Flagellin	O69136 O69136_CLOAB	29502,7793	5,78
1	349	Flagellin	O69136 O69136_CLOAB	29502,7793	5,78
1	350	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,6719	4,59
1	351	Cell division protein ftsZ.	Q97IE9 Q97IE9_CLOAB	39364,5781	4,87
1	352	Elongation factor Tu	Q97EH5 EFTU_CLOAB	43425,2617	5,04
1	353	Autolytic lysozyme	P34020 LYS_CLOAB	34956,1484	4,43
1	354	TPR repeats containing protein.	Q97M74 Q97M74_CLOAB	50731,4414	5,56
1	355	Seryl-tRNA synthetase 1	Q97N17 SYS1_CLOAB	48415,9102	5,75
1	356				
1	357				
1	358	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase.	Q97JG2 Q97JG2_CLOAB	46181,1016	5,71
2		UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 2	Q97DD9 MURA2_CLOAB	44299,1992	5,72
1	359	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,1289	5,62
1	360	Glycerol-3-phosphate ABC-transporter, periplasmic component.	Q97LX5 Q97LX5_CLOAB	49732,9297	6,88
1	361	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	Q97MU2 GSA_CLOAB	46584,6016	5,69
1	362	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,1016	5,98
1	363	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,1289	5,62
1	364				
1	365	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	P52042 ACDS_CLOAB	41360,1016	5,98
2		NADH-dependent butanol dehydrogenase B	Q04945 ADHB_CLOAB	43259,25	5,75
1	366	NADH-dependent butanol dehydrogenase A	Q04944 ADHA_CLOAB	42954,9219	5,81
2		NADH-dependent butanol dehydrogenase B	Q04945 ADHB_CLOAB	43259,25	5,75
1	367	NADH-dependent butanol dehydrogenase B	Q04945 ADHB_CLOAB	43259,25	5,75
2		Predicted dehydrogenase.	Q97DS2 Q97DS2_CLOAB	36646,7305	5,64
1	368	NADH-dependent butanol dehydrogenase B	Q04945 ADHB_CLOAB	43259,25	5,75

1	369	NADH-dependent butanol dehydrogenase B	Q04945 ADHB_CLOAB	43259,25	5,75
1	370	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	371	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
2		Putative ATP:guanido phosphotransferase CA_C3190	Q97EC3 Y3190_CLOAB	38785,1484	5,42
1	372	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	373	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	374	Butyrate kinase 1	Q45829 BUK1_CLOAB	38917,4219	5,98
1	375	Beta_glucosidase.	Q97TT6 Q97TT6_CLOAB	53775,8008	5,69
1	376	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	Q97D25 Q97D25_CLOAB	52453,2383	5,77
1	377	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	Q97D25 Q97D25_CLOAB	52453,2383	5,77
1	378	Adenylosuccinate synthetase	Q97D87 PURA_CLOAB	46938,9883	5,49
1	379	Argininosuccinate lyase	Q97KE5 ARLY_CLOAB	50058,8086	5,49
1	380	Seryl-tRNA synthetase 1	Q97N17 SYS1_CLOAB	48415,9102	5,75
1	381	TPR repeats containing protein.	Q97M74 Q97M74_CLOAB	50731,4414	5,56
1	382	Seryl-tRNA synthetase 1	Q97N17 SYS1_CLOAB	48415,9102	5,75
1	383	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase.	Q97EN6 Q97EN6_CLOAB	39958,9609	5,5
1	384	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	385	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Q97GN4 Q97GN4_CLOAB	40527,1211	5,5
1	386	HTH-type transcriptional regulator regA.	P58258 REGA_CLOAB	37399,6094	5,56
1	387	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	P52039 ETFA_CLOAB	35942,0508	5,55
1	388	Ornithine carbamoyltransferase	Q97M82 OTC_CLOAB	37874,8789	5,14
1	389	Phosphoglycerate kinase	O52632 PGK_CLOAB	42357,1289	5,62
1	390	O-acetylhomoserine sulfhydrylase.	Q97FF7 Q97FF7_CLOAB	46286,1914	5,91
1	391	O-acetylhomoserine sulfhydrylase.	Q97FF7 Q97FF7_CLOAB	46286,1914	5,91
1	392	Acetate kinase	P71104 ACKA_CLOAB	44313,4492	6,23
2		3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase.	Q97HK3 Q97HK3_CLOAB	43831,8516	6,1
1	393	Putative competence-damage inducible protein.	Q97D94 CINA_CLOAB	45040,4102	6,14
2		UDP-N-acetylglucosamine 1- carboxyvinyltransferase 2	Q97DD9 MURA2_CLOAB	44299,1992	5,72
1	394	NADH-dependent butanol dehydrogenase A	Q04944 ADHA_CLOAB	42954,9219	5,81
2		Aspartate aminotransferase.	Q97MH7 Q97MH7_CLOAB	42249,6289	5,89
1	395	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	396	UPF0210 protein CA_C0479.	Q97LS5 Y479_CLOAB	47314,3789	5,47
2		Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,8594	5,94
1	397	Branched-chain-amino-acid transaminase	Q97J07 Q97J07_CLOAB	37487,8594	5,94
1	398	ABC transporter, ATP-binding protein.	Q97MP5 Q97MP5_CLOAB	35460,7383	5,99
2		UDP-glucose 4-epimerase.	Q97J57 Q97J57_CLOAB	36049,3906	5,89
1	399	60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
1	400	Ferredoxin-nitrite reductase.	Q97MU7 Q97MU7_CLOAB	58425,1602	6,44
1	401	Flagellar switch protein FliY, contains CheC-like domain.	Q97H00 Q97H00_CLOAB	44396,5195	4,39
1	402	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,6719	4,59
1	403	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O52631 G3P_CLOAB	35827,6797	5,93
1	404	DnaK protein	Q97LT2 Q97LT2_CLOAB	61654,2695	4,62
1	405	Protein containing cell adhesion domain.	Q97EM4 Q97EM4_CLOAB	54539,0898	4,76
2		TPR-repeat-containing protein; Cell-adhesion domain.	Q97EM5 Q97EM5_CLOAB	76160,1094	4,77

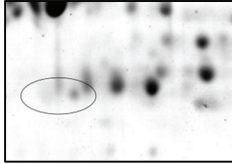
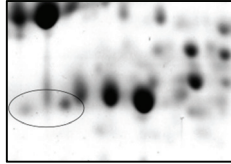
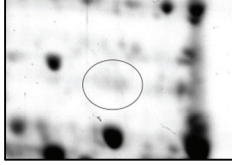
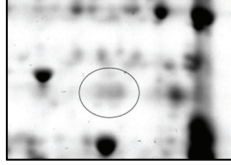
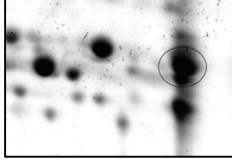
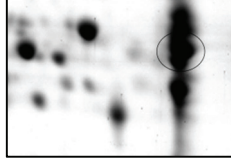
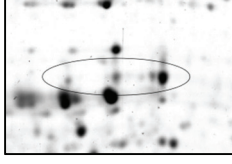
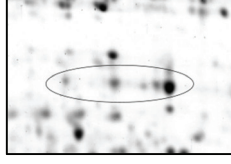
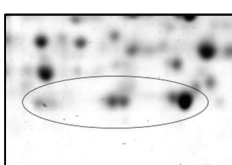
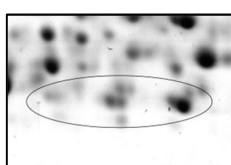
1	406	Deacetylase/dipeptidase/desuccinylase family of Zn-dependent	Q97FL3 Q97FL3_CLOAB	51604,1016	4,89
2		60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
3		Ferredoxin-nitrite reductase.	Q97MU7 Q97MU7_CLOAB	58425,1602	6,44
1	407	Deacetylase/dipeptidase/desuccinylase family of Zn-dependen	Q97FL3 Q97FL3_CLOAB	51604,1016	4,89
2		60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
3		Ferredoxin-nitrite reductase.	Q97MU7 Q97MU7_CLOAB	58425,1602	6,44
1	408	Deacetylase/dipeptidase/desuccinylase family of Zn-dependent	Q97FL3 Q97FL3_CLOAB	51604,1016	4,89
2		60 kDa chaperonin	P30717 CH60_CLOAB	58037,5117	4,89
1	409	Flagellar hook protein FlgE.	Q97H59 Q97H59_CLOAB	43942,4414	4,71
1	410	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,2383	4,87
1	411	ATP synthase subunit beta	Q9Z687 ATPB_CLOAB	51062,2383	4,87
1	412	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,6719	4,59
1	413	Enolase	Q97L52 ENO_CLOAB	46772,6719	4,59
1	414	Periplasmic phosphate-binding protein.	Q97IE3 Q97IE3_CLOAB	31691,9004	8,77
1	415	Cell division protein DivIVA.	Q97H95 Q97H95_CLOAB	24055,7793	4,57
2		Periplasmic phosphate-binding protein.	Q97IE3 Q97IE3_CLOAB	31691,9004	8,77
1	416	Protein containing cell adhesion domain.	Q97EM4 Q97EM4_CLOAB	54539,0898	4,76
2		TPR-repeat-containing protein; Cell-adhesion domain.	Q97EM5 Q97EM5_CLOAB	76160,1094	4,77
1	417	Protein grpE	P30726 GRPE_CLOAB	22647,9805	4,5
1	418	Glycogen-binding regulatory subunit of S/T protein phosphatase	Q97TH2 Q97TH2_CLOAB	28008,7109	6,08
1	419	Nucleoside phosphorylase.	Q97H96 Q97H96_CLOAB	25226,9707	5,04
1	420	Methyl methane sulfonate/mytomycin C/UV resistance protein,	Q97J74 Q97J74_CLOAB	20978,4102	4,57
2		50S ribosomal protein L4.	Q97EH9 RL4_CLOAB	22851,3496	9,78
1	421	Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,5508	4,98
2		Arginine biosynthesis bifunctional protein argJ 1	Q97GH6 ARGJ1_CLOAB	43808,4297	6,27
1	422	Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,5508	4,98
1	423	Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,5508	4,98
1	424	Adenine phosphoribosyltransferase	Q97GU0 APT_CLOAB	18842,8906	4,94
2		Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,5508	4,98
1	425	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	P58276 CLPP_CLOAB	21409,9609	5,03
1	426	Elongation factor P	Q97HB8 EFP_CLOAB	21062,5508	4,98
2		Peptide methionine sulfoxide reductase msrA	Q97MV3 MSRA_CLOAB	18832,2109	4,81
1	427	Chemotaxis signal transduction protein CheW.	Q97GZ8 Q97GZ8_CLOAB	15005,9199	4,27
1	428	Transcription elongation factor greA	Q97EB6 GRE_A_CLOAB	17701,1191	4,7
1	429				
1	430	S-ribosylhomocysteine lyase	Q97F13 LUXS_CLOAB	17892,7891	5,35
1	431	S-ribosylhomocysteine lyase	Q97F13 LUXS_CLOAB	17892,7891	5,35
1	432	Solo B3/4 domain	Q97TI8 Q97TI8_CLOAB	26564,2598	4,97
2		Electron transfer flavoprotein subunit beta	P52040 ETFB_CLOAB	28031,8301	5,19
1	433	Putative uncharacterized protein.	Q97MY3 Q97MY3_CLOAB	31134,9492	4,67
1	434	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF	Q97KH8 HIS6_CLOAB	27524,1504	4,91
1	435	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase.	Q97DA8 Q97DA8_CLOAB	17844,9492	4,5
1	436	Transcription elongation factor greA	Q97EB6 GRE_A_CLOAB	17701,1191	4,7
1	437	Single-stranded DNA-binding protein 3	Q97CX3 SSB3_CLOAB	15944,8496	4,86

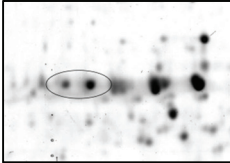
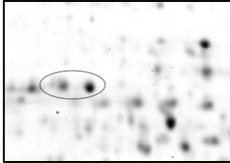
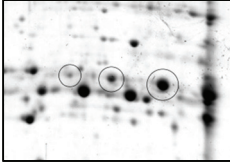
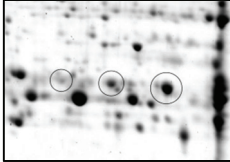
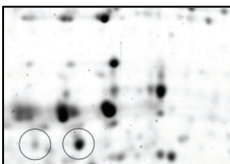
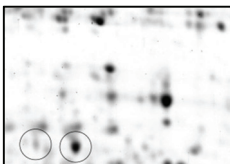
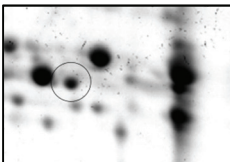
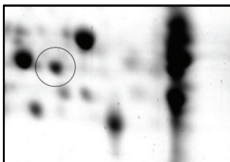
1	438	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase.	Q97GI6 Q97GI6_CLOAB	25103,1094	5,22
2		3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	P52046 CRT_CLOAB	28171,6094	5,39
1	439	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase.	Q97GI6 Q97GI6_CLOAB	25103,1094	5,22
1	440	Nudix	Q97D79 Q97D79_CLOAB	23059,6699	5,06
1	441	Glutamine ABC transporter	Q97MS9 Q97MS9_CLOAB	27279,0508	5,28
1	442	Response regulator	Q97E94 Q97E94_CLOAB	26075,4707	5,06
1	443	NifU-related domain containing protein.	Q97G09 Q97G09_CLOAB	24680,4297	5,49
1	444	DTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase.	Q97GN5 Q97GN5_CLOAB	21332,5898	5,12
2		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	P58276 CLPP_CLOAB	21409,9609	5,03
1	445	Flagellin	O69136 O69136_CLOAB	29502,7793	5,78
1	9	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88
1	8	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.	Q97GY6 Q97GY6_CLOAB	128599,531	5,88

Tabelle A4: Ausgewählte Proteine des biphasischen Stoffwechsels mit Klassifizierung nach ihrer Funktion. Proteine mit einer Ratio > 1,0 (signifikant: Faktor $\geq 2,0$) haben eine erhöhte Spotmenge in der Säurephase (pH 5,7). Proteine mit einer Ratio < 1,0 (signifikant: Ratio $\leq 0,5$) haben eine erhöhte Spotmenge in der Lösungsmittelphase (pH 4,5).

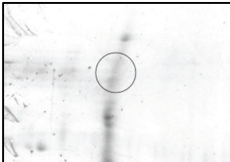
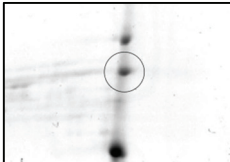
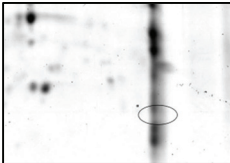
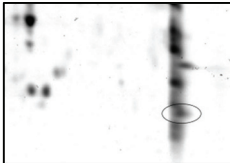
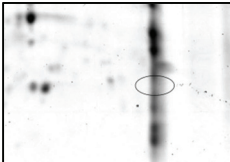
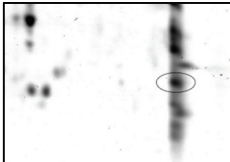
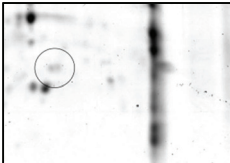
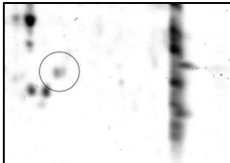
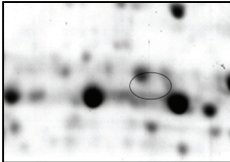
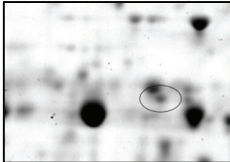
ORF#	Proteinfunktion ^a	Spot # ^b	pH 5,7	pH 4,5	Ratio ^{c,d}
------	------------------------------	---------------------	--------	--------	----------------------

Bildung von Säuren

CAC1742 (<i>pta</i>)	Phosphate acetyltransferase	S 220 L 320, 321			~0,6
CAC1743 (<i>ack</i>)	Acetate kinase	S 179 L 206			~0,9
CAC2873 (<i>thlA</i>)	Acetyl-CoA acetyltransferase	S 275 L 227			~1,3
CAC2708 (<i>hbd</i>)	3-hydroxy-butryl-CoA dehydrogenase	S 272, 324, 345 L 249, 251, 322			~1,3
CAC2709 (<i>etfA</i>)	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	S 219, 223, 285 L 229, 387			~1,2

CAC2710 (<i>etfB</i>)	Electron transfer flavoprotein beta- subunit	S 335, 336 L 324, 325			~2,0
CAC2711 (<i>bcd</i>)	Butyryl-CoA dehydrogenase	S 194, 195, 197 L 220, 362, 365			~1,2
CAC2712 (<i>crt</i>)	Enoyl-CoA hydratase	S 338, 339 L 264, 265			~1,1
CAC3075 (<i>buk</i>)	Butyrate kinase	S 206 L 224			~1,2

Bildung von Lösungsmitteln

CA_P0162 (<i>adhe1</i>)	Aldehyde dehydrogenase (NAD ⁺)	L 45			∞
CA_P0163 (<i>ctfA</i>)	Butyrate- acetoacetate CoA- transferase subunit A	L 344			∞
CA_P0164 (<i>ctfB</i>)	Butyrate- acetoacetate CoA- transferase subunit B	L 278			∞
CA_P0165 (<i>adc</i>)	Acetoacetate decarboxylase	S 263 L268			~0,8
CAC3298 (<i>bdhB</i>)	NADH-dependent butanol dehydrogenase B	L 369			∞

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

^b: Die Spotnummern der Proteine sind auf den Proteomkarten für die Säurephase (S) bei pH 5,7 (Anhang, Abb. A2) und Lösungsmittelphase (L) bei pH 4,5 (Anhang, Abb. A3) zu finden.

^c: Das Unendlichkeitszeichen (∞) bedeutet, dass ein Protein in der Säurephase bei pH 5,7 nicht detektiert werden konnte.

^d: Bei Identifikation von mehreren Spots für ein Protein, wurde der Mittelwert dargestellt.

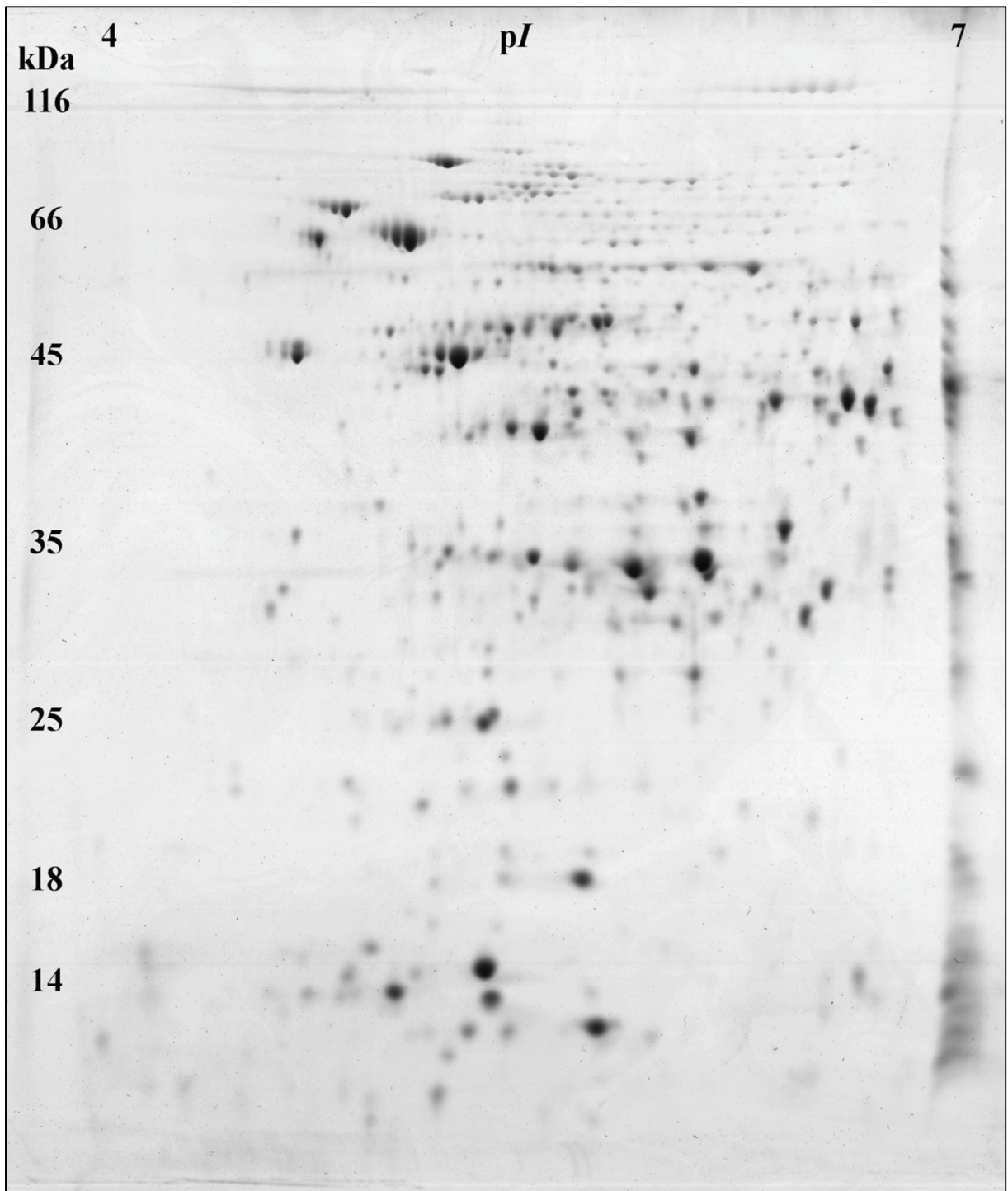


Abbildung A4: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Wildtyp-Zellen bei pH 5,5.

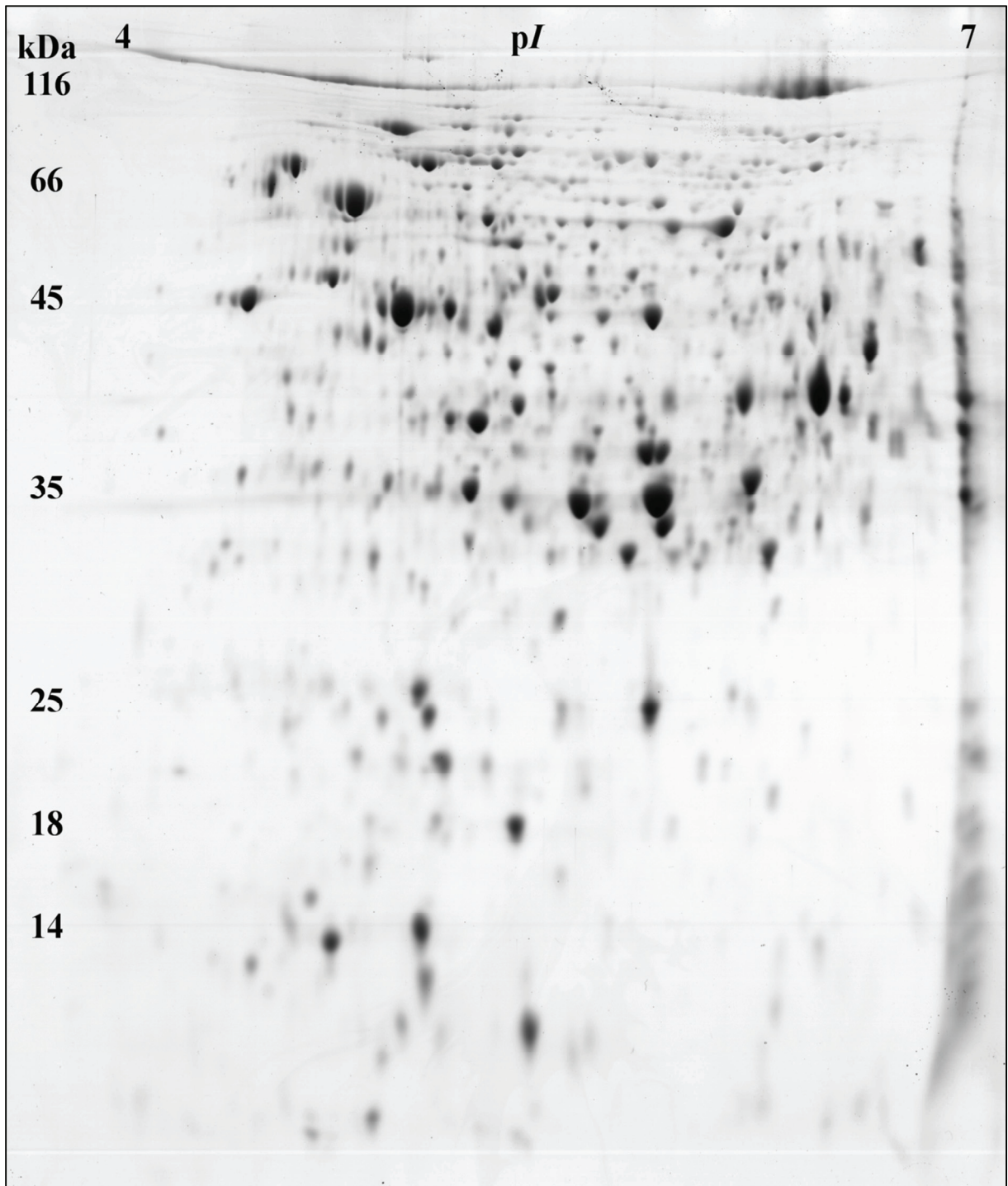


Abbildung A5: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Wildtyp-Zellen bei pH 5,3.

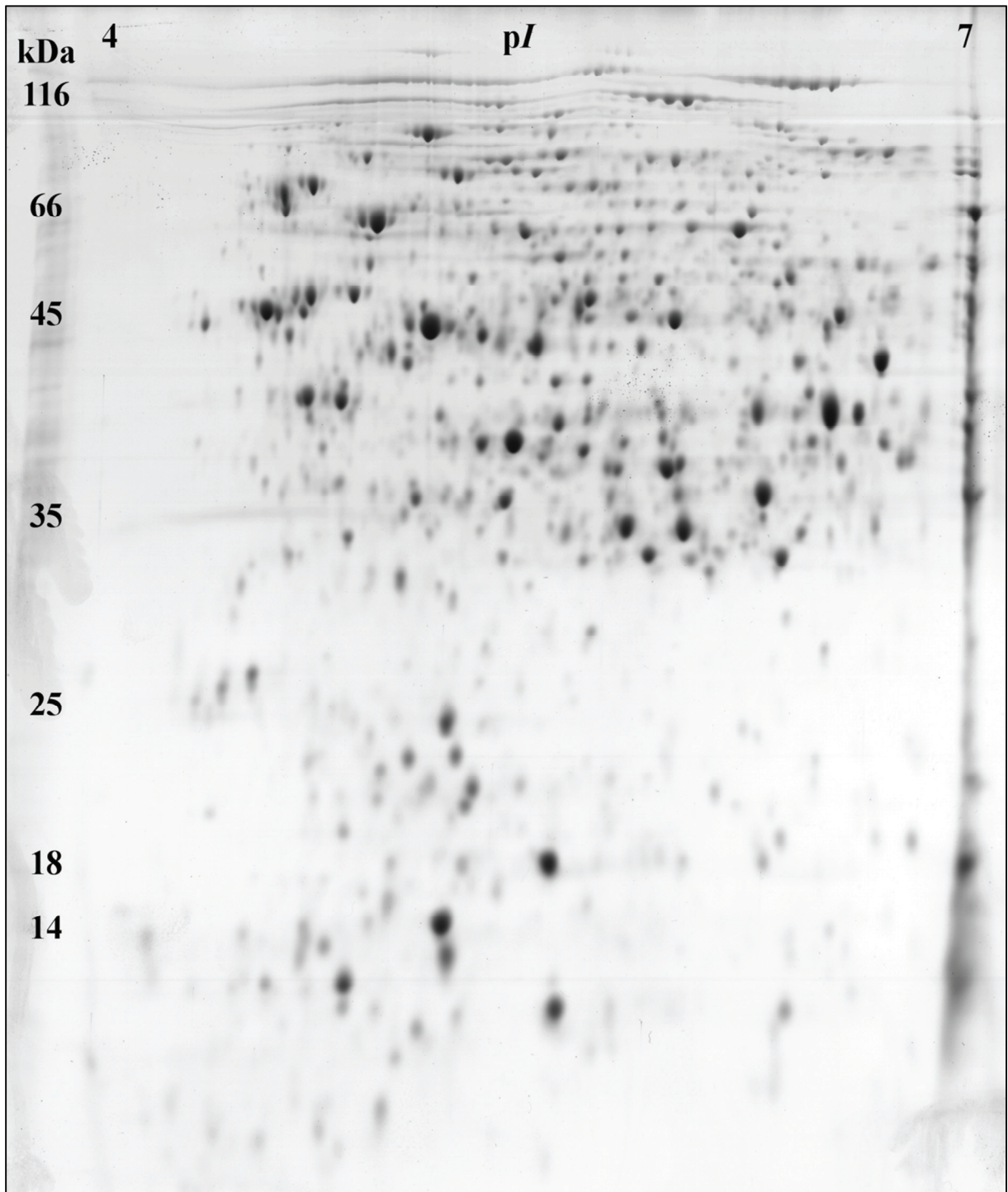


Abbildung A6: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Wildtyp-Zellen bei pH 5,1.

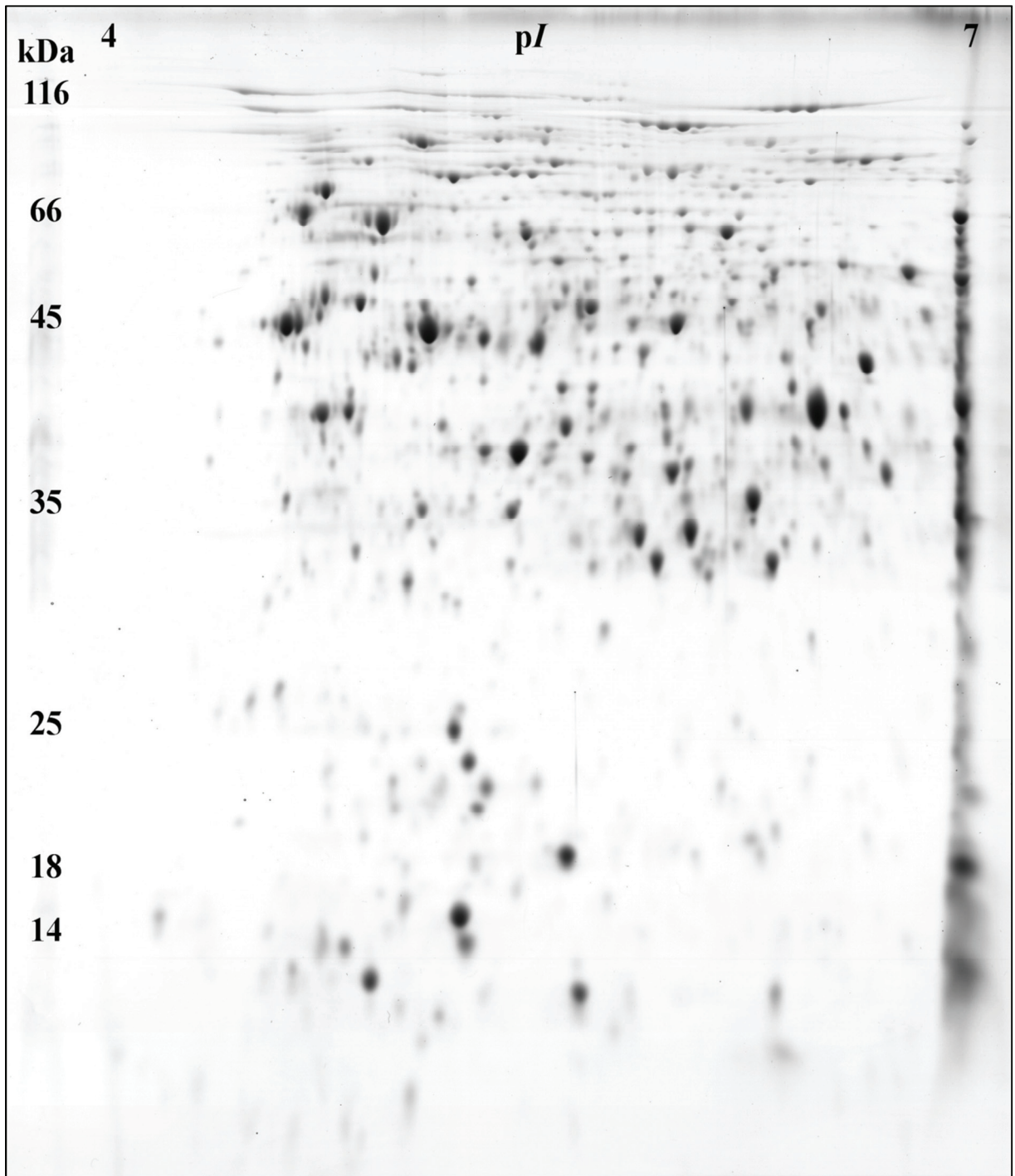


Abbildung A7: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Wildtyp-Zellen bei pH 4,9.

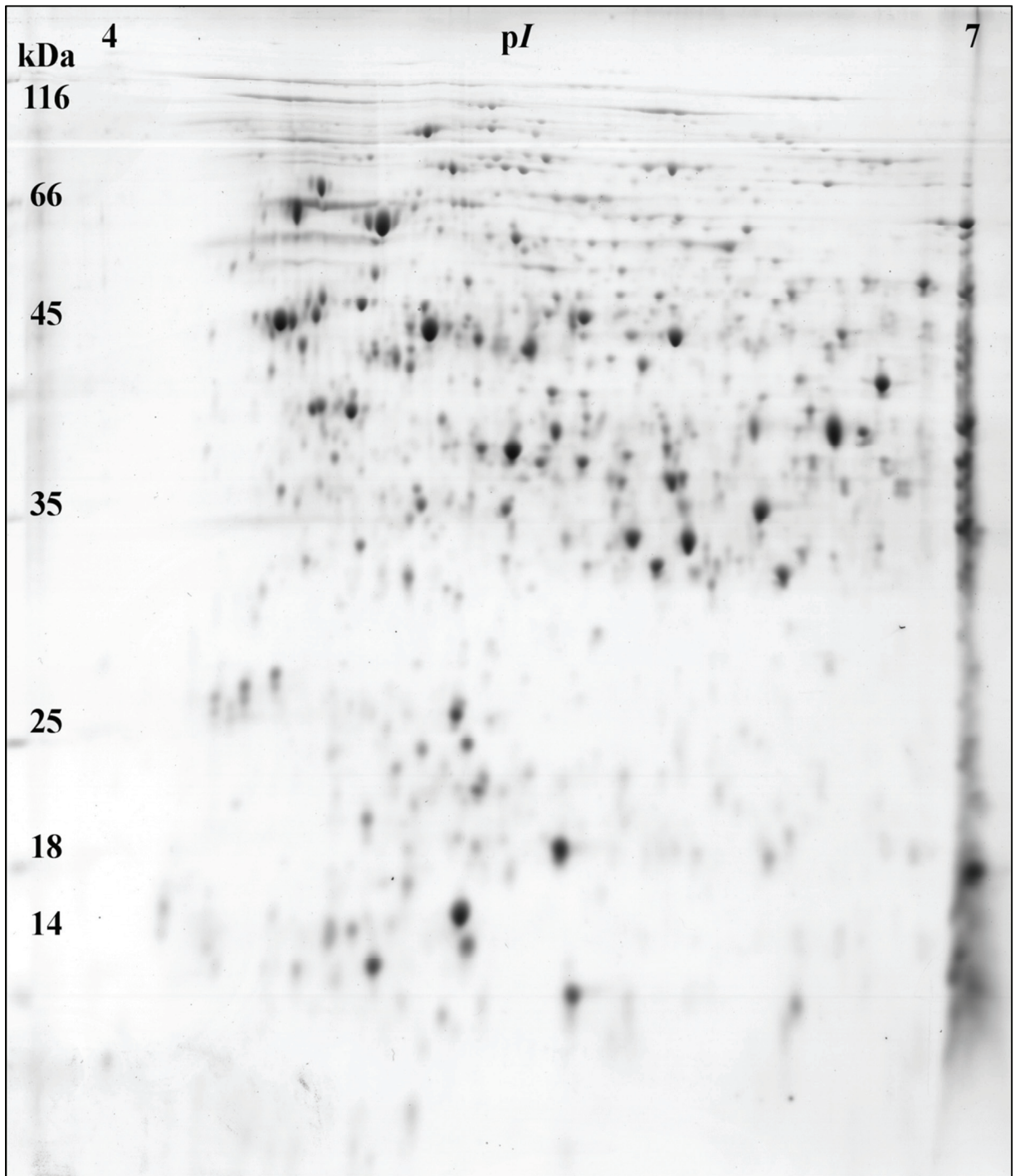


Abbildung A8: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Wildtyp-Zellen bei pH 4,7.

Tabelle A5: Ausgewählte Gene mit Klassifizierung nach ihrer Funktion. Gene mit einer Ratio > 1,0 (signifikant: Ratio $\geq 3,0$ und mind. 3 der 4 Werte der einzelnen Arrays sind $\geq 2,0$) haben eine erhöhte Transkriptmenge in der Säurephase (pH 5,7) bzw. ein reprimiertes Transkriptlevel in der Lösungsmittelphase (pH 4,5). Gene mit einer Ratio < 1,0 (signifikant: Ratio $\leq 0,33$ und mind. 3 der 4 Werte der einzelnen Micro Arrays $\leq 0,5$ sind) haben eine erhöhte Spotmenge in der Lösungsmittelphase (pH 4,5) bzw. ein reprimiertes Transkriptlevel in der Säurephase.

ORF#	Gen	Proteinfunktion ^a	1. Array	2. Array	3. Array	4. Array	durchs. Ratio	SD
<u>Glykolyse</u>								
CAC2680	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	1,2	1,1	4,4	2,8	2,4	1,5
CAC0517	<i>pfkA</i>	6-phosphofruktokinase	1,1	1,0	1,7	1,1	1,2	0,3
CAC0827		Fructose-bisphosphate aldolase	1,1	1,0	1,8	1,6	1,4	0,4
CAC3657		NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,6	0,5	1,3	0,7	0,8	0,3
CAC0709	<i>gapC</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1,0	0,9	1,9	1,9	1,4	0,5
CAC0710	<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase	1,5	1,4	2,5	1,8	1,8	0,5
CAC0711	<i>tpi</i>	Triosephosphate isomerase	1,2	0,8	3,4	1,7	1,8	1,1
CAC0712	<i>pgm-i</i>	Phosphoglyceromutase	0,7	0,7	2,9	1,7	1,5	1,1
CAC0713	<i>eno</i>	Phosphopyruvate hydratase	0,9	0,8	2,8	1,6	1,5	0,9
CAC0518	<i>pykA</i>	Pyruvate kinase	1,8	1,1	4,4	1,8	2,3	1,5
CAC1036	<i>pykA</i>	Pyruvate kinase	1,6	1,3	3,4	1,8	2,0	0,9
CAC0028	<i>hydA</i>	Hydrogene dehydrogenase	1,6	1,4	2,2	1,7	1,7	0,4

Bildung von Säuren

CAC1742	<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	0,8	0,8	1,2	1,0	0,9	0,2
CAC1743	<i>ack</i>	Acetate kinase	0,9	0,8	1,0	0,9	0,9	0,1
CAC2873	<i>thlA</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	2,3	1,7	8,1	3,5	3,9	2,9
CAC2708	<i>hbd</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	1,9	1,5	3,3	3,3	2,5	0,9
CAC2709	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	2,3	2,0	5,4	2,4	3,0	1,6
CAC2710	<i>etfB</i>	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	1,9	1,6	6,6	2,4	3,1*	2,4
CAC2711	<i>bcd</i>	Butyryl-CoA dehydrogenase	2,0	1,8	6,1	2,4	3,1	2,0
CAC2712	<i>crt</i>	Enoyl-CoA hydratase	2,1	1,8	7,2	2,9	3,5	2,5
CAC3075	<i>buk</i>	Butyrate kinase	4,0	2,8	8,1	5,7	5,1	2,3
CAC3076	<i>ptb</i>	Phosphate butyryltransferase	3,4	2,5	9,5	5,4	5,2	3,1

Bildung von Lösungsmitteln

CA_P0162	<i>adhE1</i>	Aldehyde dehydrogenase (NAD ⁺)	0,012	0,009	0,008	0,004	0,008	0,003
CA_P0163	<i>ctfA</i>	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit A	0,009	0,010	0,009	0,004	0,008	0,003
CA_P0164	<i>ctfB</i>	Butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B	0,014	0,010	0,007	0,004	0,008	0,004
CA_P0165	<i>adc</i>	Acetoacetate decarboxylase	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,1
CAC3298	<i>bdhB</i>	NADH-dependent butanol dehydrogenase B	0,5	0,5	1,0	0,6	0,6	0,2
CAC3299	<i>bdhA</i>	NADH-dependent butanol dehydrogenase A	1,2	1,1	2,3	2,2	1,7	0,6
CA_P0035	<i>adhE2</i>	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	2,9	3,4	2,9	2,3	2,9	0,4
CA_P0059		Alcohol dehydrogenase	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	0,1

CAC3392		NADH-dependent butanol dehydrogenase	1,2	0,9	2,2	1,1	1,4	0,6
---------	--	--------------------------------------	-----	-----	-----	-----	------------	-----

Stressantwort

CAC1280	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor	0,7	0,5	1,4	0,7	0,8	0,4
CAC1281	<i>grpE</i>	Molecular chaperone GrpE	0,8	0,7	1,9	0,6	1,0	0,6
CAC1282	<i>dnaK</i>	Molecular chaperone DnaK	0,7	0,6	2,2	0,8	1,1	0,8
CAC1283	<i>dnaJ</i>	Molecular chaperones DnaJ (HSP40 family)	0,6	0,6	1,8	0,8	0,9	0,6
CAC0456	<i>lonA</i>	ATP-dependent protease	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,1
CAC2637	<i>lonA</i>	ATP-dependent Lon protease	1,2	1,1	1,7	1,0	1,3	0,3
CAC2703	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	0,6	0,5	2,0	1,5	1,2	0,7
CAC2704	<i>groES</i>	Co-chaperonin GroES (HSP10 family)	0,7	0,4	3,5	1,0	1,4	1,4
CAC3189	<i>clpC</i>	ATPase with chaperone activity	1,3	1,1	3,0	1,8	1,8	0,9
CAC3190		ATP guanido phosphotransferase	1,7	1,5	2,9	1,2	1,8	0,7
CAC3191	<i>yacH</i>	Uncharacterized conserved protein	1,7	1,4	2,4	1,2	1,7	0,6
CAC3192	<i>ctsR</i>	Transcriptional regulator	1,7	1,5	1,8	1,4	1,6	0,2
CAC0648		Molecular chaperone, DnaJ family	0,8	1,2	0,5	0,8	0,8	0,3
CAC1412	<i>cdrC</i>	Methyl methane sulfonate/mytomycin C/UV resistance protein	2,5	2,5	2,2	1,5	2,2	0,5
CAC1415		TerC family protein, ortholog of stress response protein	1,7	2,0	0,9	1,2	1,5	0,5
CAC1716		Uncharacterized stress-induced protein, YicC family	1,1	1,0	3,3	1,3	1,7	1,1
CAC3315	<i>hspG</i>	Heat shock protein 90	1,3	1,0	5,7	2,4	2,6	2,1
CAC3714		Molecular chaperone (small heat shock protein) HSP18	0,5	0,4	0,6	0,6	0,5	0,1

Bildung von „branched-chain amino acids“

CAC0091	<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	0,4	0,3	1,4	0,9	0,7	0,5
CAC1479	<i>ilvE</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase	0,8	0,8	1,3	1,1	1,0	0,2
CAC3169	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase large subunit	0,6	0,7	0,7	0,5	0,6	0,1
CAC3170	<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	0,5	0,6	0,7	0,5	0,6	0,1
CAC3171	<i>leuB</i>	Isopropylmalate dehydrogenase	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,02
CAC3172	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	0,5	0,5	0,7	0,6	0,6	0,1
CAC3173	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase	0,5	0,5	0,8	0,6	0,6	0,1
CAC3174	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	0,6	0,5	1,2	0,8	0,8	0,3
CAC3175		Hypothetical protein	0,6	0,5	0,6	0,4	0,5	0,1
CAC3176	<i>ilvN</i>	Acetolactate synthase. small subunit	0,4	0,3	0,7	0,4	0,4	0,2

^a: Namen nach Nölling *et al.* (2001).

*: Die durchschnittliche Ratio war > 3,0, aber 3 der 4 Werte der einzelnen Arrays waren nicht $\geq 2,0$. Dies bedeutete, dass das Gen nach den gewählten Kriterien, nicht signifikant in der Säurephase hochreguliert war.

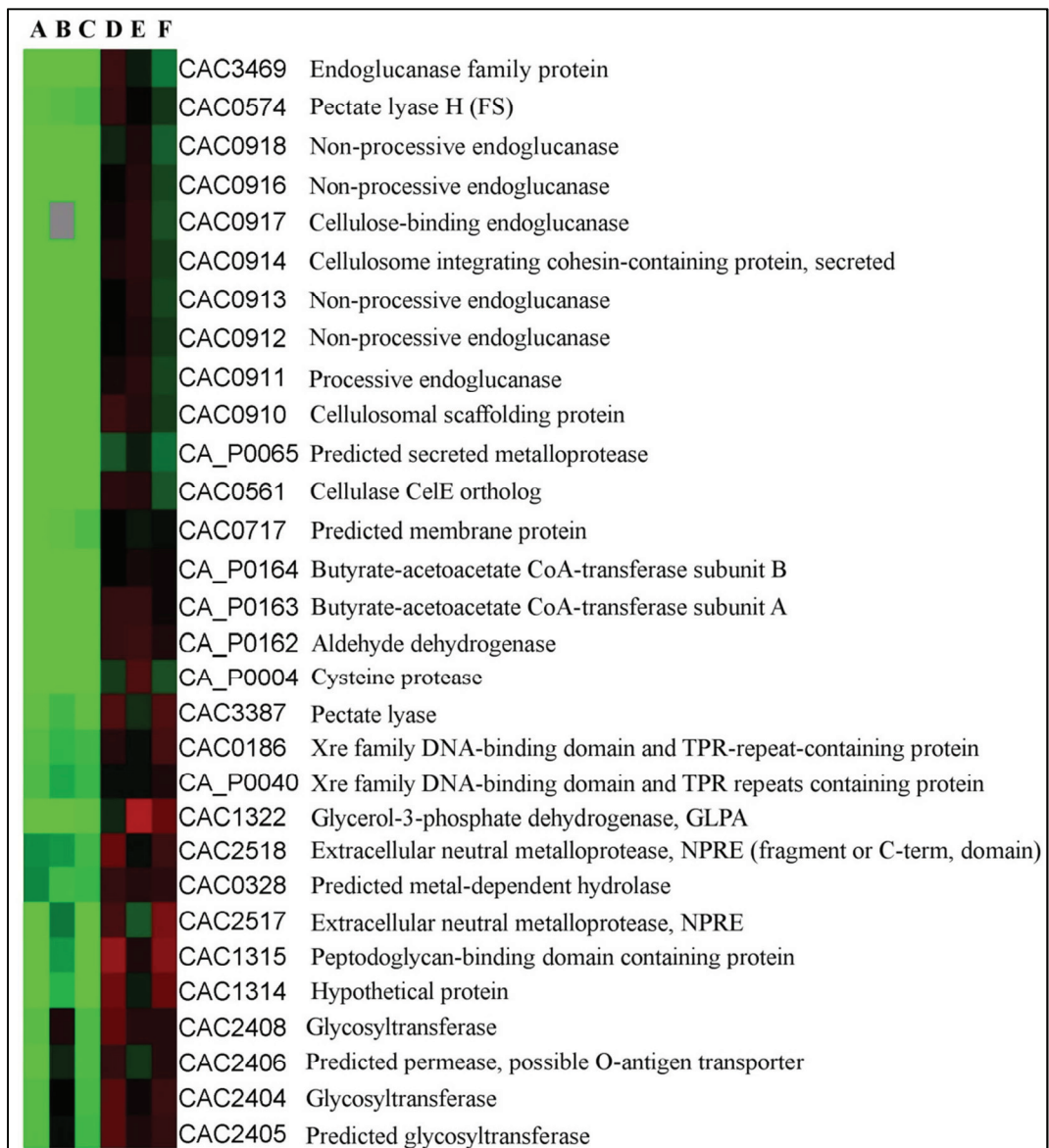


Abb. A9: Fortsetzung der Abbildung Siehe Folgeseite

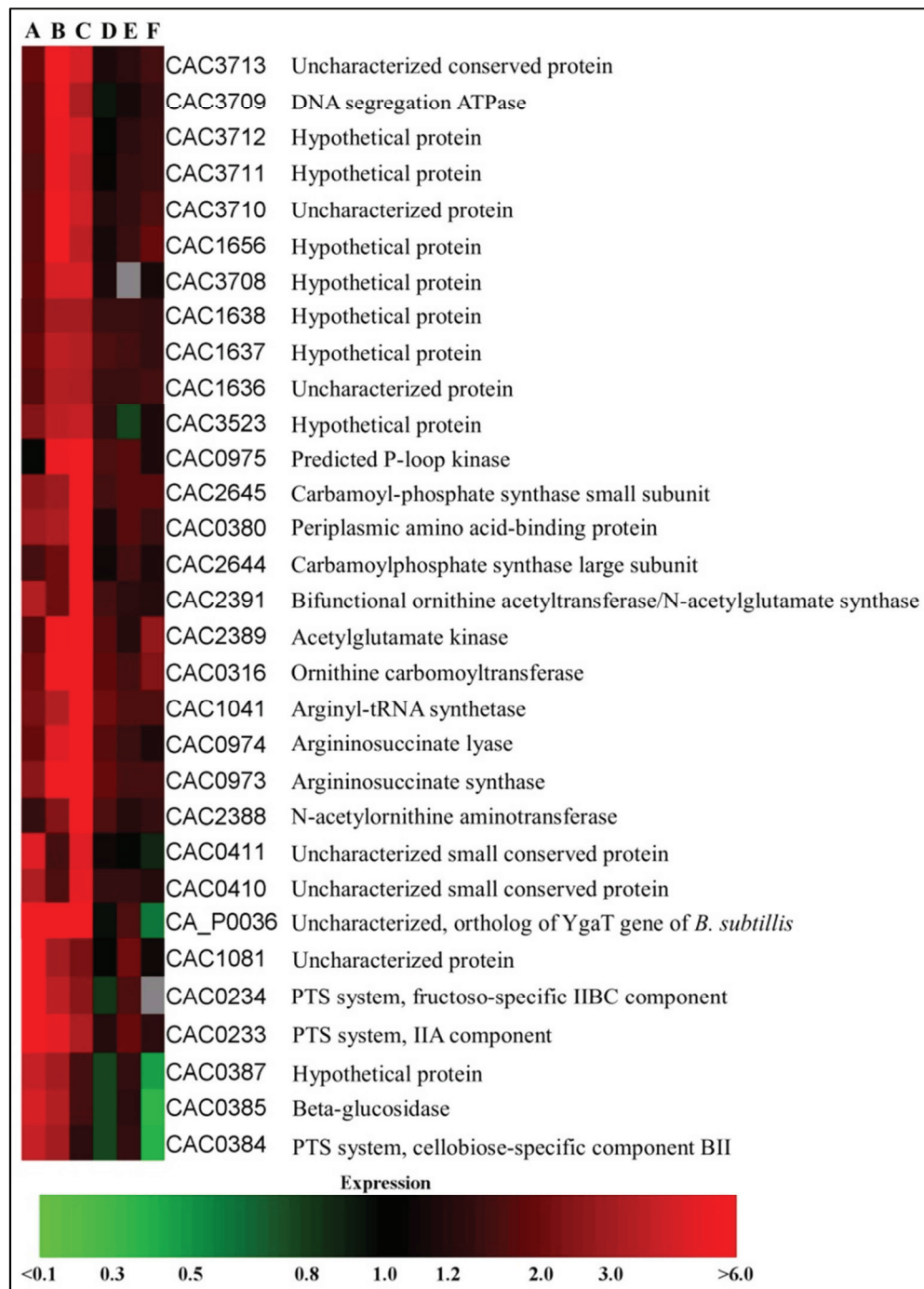


Abb. A9: Darstellung ausgewählter Gene, die ab pH 5,1 ein unterschiedliches Transkriptmuster im Vergleich zu einer Säurephase (pH 5,7, 5,5, 5,3) aufweisen. Die RNA aller pH-Stufen (A: 5,7; B: 5,5; C: 5,3; D: 5,1; E: 4,9; F: 4,7) wurde mit der Referenz-RNA des pH-Wertes 4,5 hybridisiert. Die Expressionswerte $\geq 3,0$ gelten als signifikant induziert (rot) und $\leq 0,33$ als signifikant reprimiert (grün) in den untersuchten pH-Werten (A-F) zur verglichenen pH-Stufe 4,5. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund der gewählten Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden.

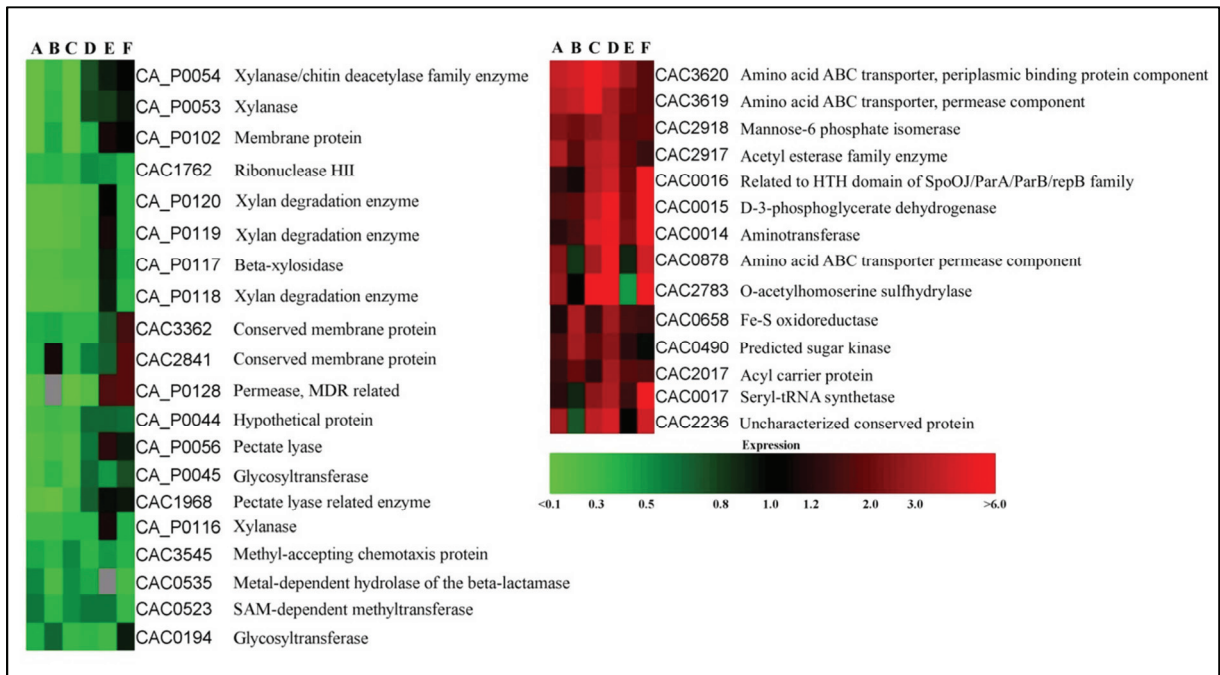


Abb. A10: Darstellung ausgewählter Gene, die ab pH 5,1 ein ähnliches Transkriptmuster aufweisen wie in einer Säurephase (pH 5,7, 5,5, 5,3). Die RNA aller pH-Stufen (A: 5,7; B: 5,5; C: 5,3; D: 5,1; E: 4,9; F: 4,7) wurde mit der Referenz-RNA des pH-Wertes 4,5 hybridisiert. Die Expressionswerte $\geq 3,0$ gelten als signifikant induziert (rot) und $\leq 0,33$ als signifikant reprimiert (grün) in den untersuchten pH-Werten (A-F) zur verglichenen pH-Stufe 4,5. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund der gewählten Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden.

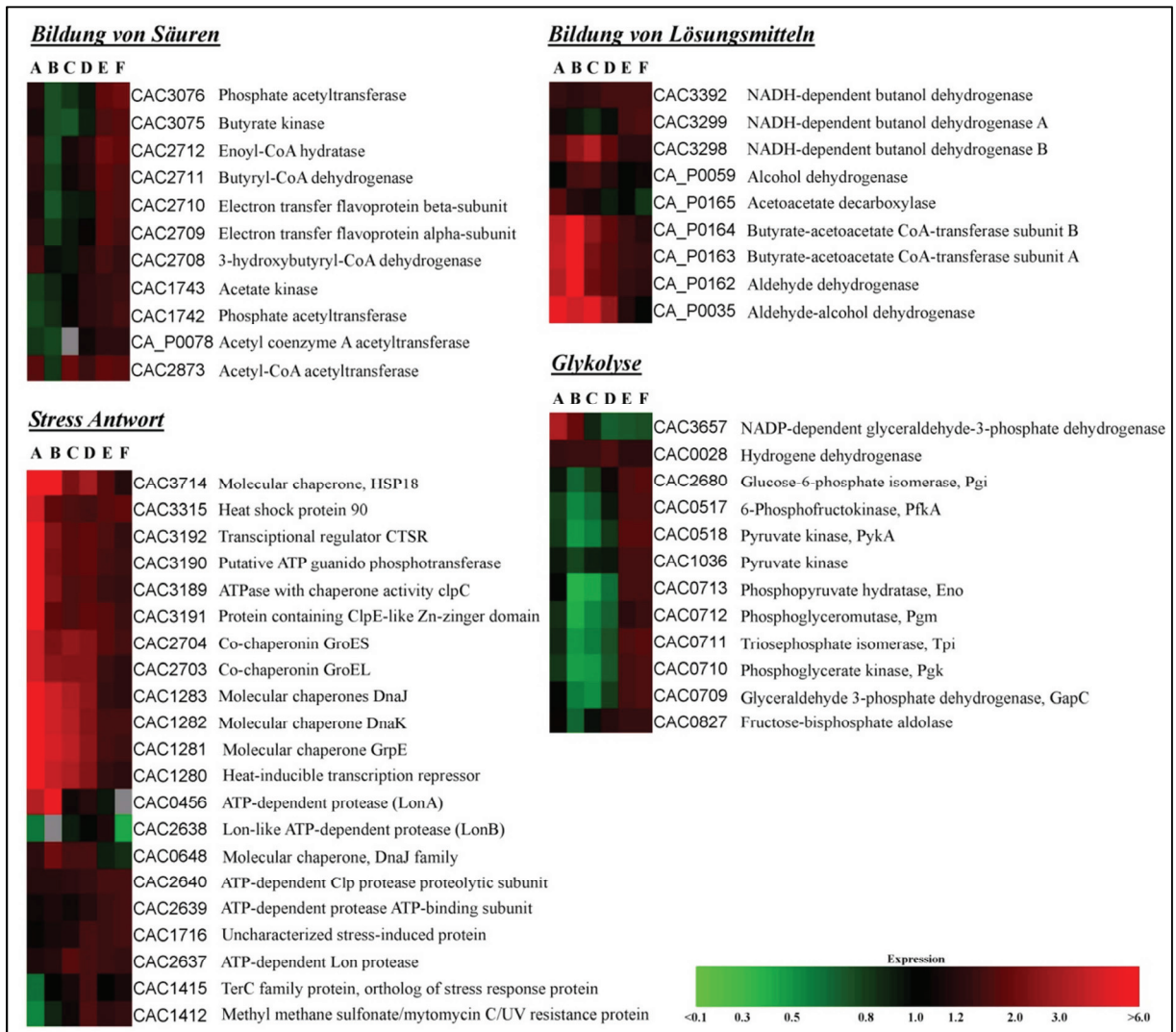


Abb. A11: Expressionsprofile nach Butanolzugabe für ausgewählte Gene geordnet nach ihrer Funktion. Die RNA aller Zeitpunkte nach Butanolzugabe (A: 0,25 h; B: 1 h; C: 2 h; D: 4 h; E: 24 h; F: 48 h) wurde mit der Referenz-RNA des unbehandelten pH-Wertes 5,7 hybridisiert. Die Expressionswerte $\geq 3,0$ gelten als signifikant induziert (rot) und $\leq 0,33$ als signifikant reprimiert (grün) zu den untersuchten Zeitpunkten (A-F) nach Butanolzugabe zur verglichenen pH-Stufe 5,7. Bei grau dargestellten Kästchen konnten aufgrund der gewählten Filterkriterien keine Aussagen zur Genexpression getroffen werden.



Abb. A12: Fortsetzung der Abbildung Siehe Folgeseite

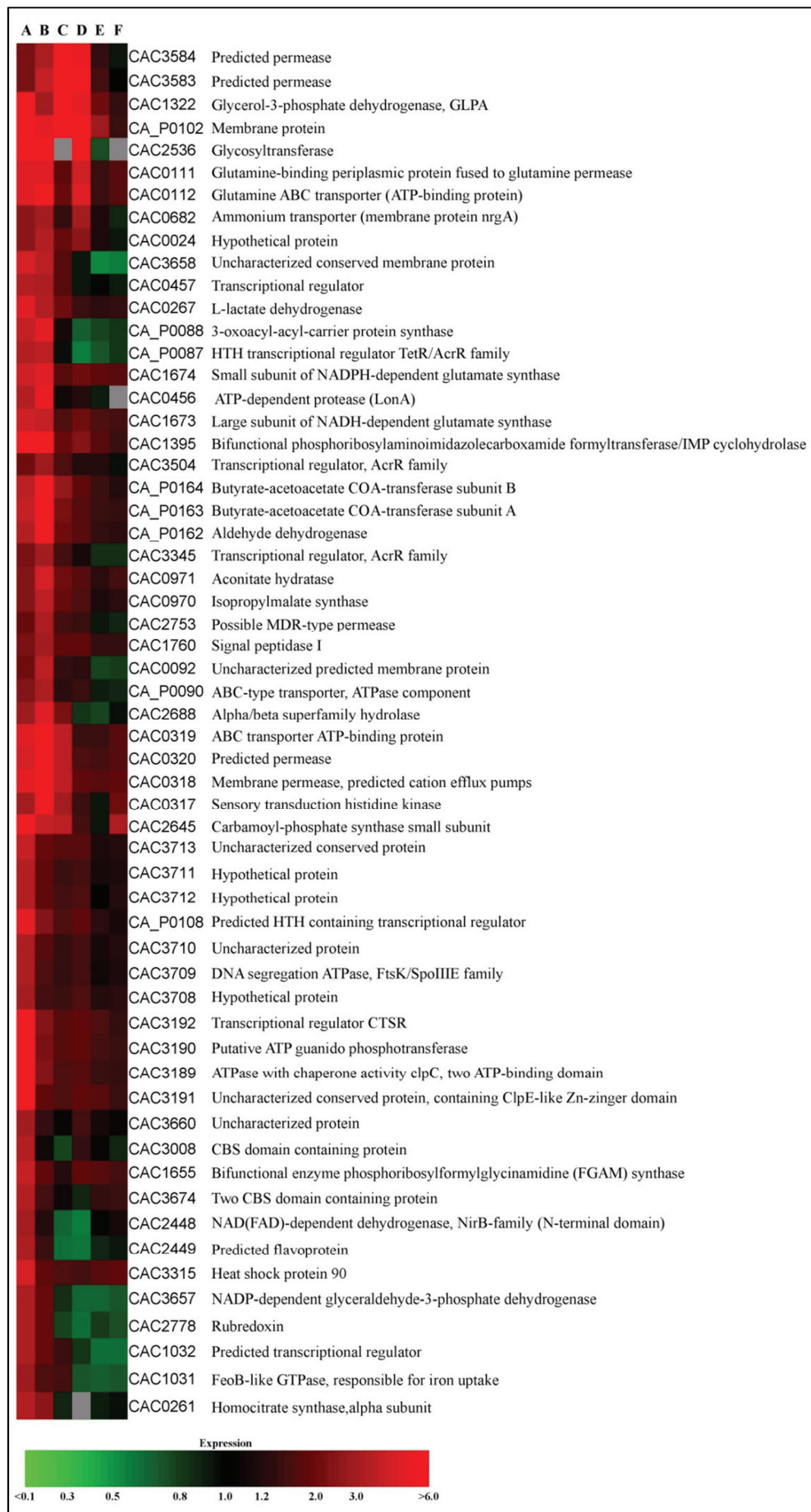


Abb. A12: Expressionsprofil nach Butanolzugabe für ausgewählte Gene mit erhöhter Transkriptmenge. Erklärung der Legende Siehe Abb. A11.



Abb. A13: Expressionsprofile nach Butanolzugabe für ausgewählte Gene mit verminderter Transkriptmenge. Erklärung der Legende Siehe Abb. A11.

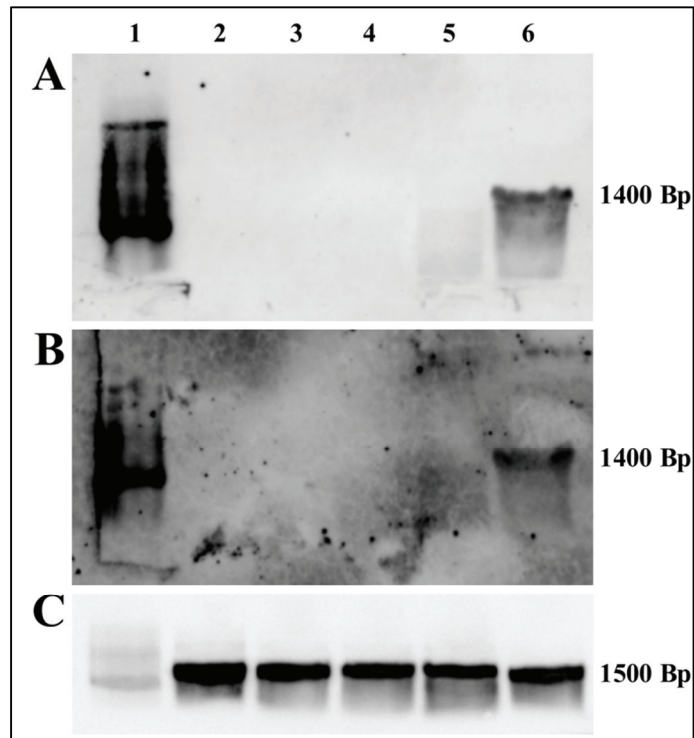


Abbildung A14: Northern Blot Analysen von *cap0037* und *cap0036* zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums einer statischen Wildtyp-Kultur (Abb. 3.17 A).

Spuren: 1-Marker, 2-16 h, 3-26 h, 4-36 h, 5-58 h, 6-Kontrolle (1 μ g RNA von Zellen aus kontinuierlicher Kultur von *C. acetobutylicum* bei pH 5,7). (A) Die Hybridisierung erfolgte mit DIG-markierter Sonde gegen *cap0036*. Spuren 2-5 mit 25 μ g RNA versetzt. (B) Die Hybridisierung erfolgte mit DIG-markierter Sonde gegen *cap0037*. Spuren 2-5 mit 25 μ g RNA versetzt. (C) 16S-rRNA-Transkripte als Kontrolle der RNA Integrität. Spuren 2-5 mit 1 μ g RNA versetzt.

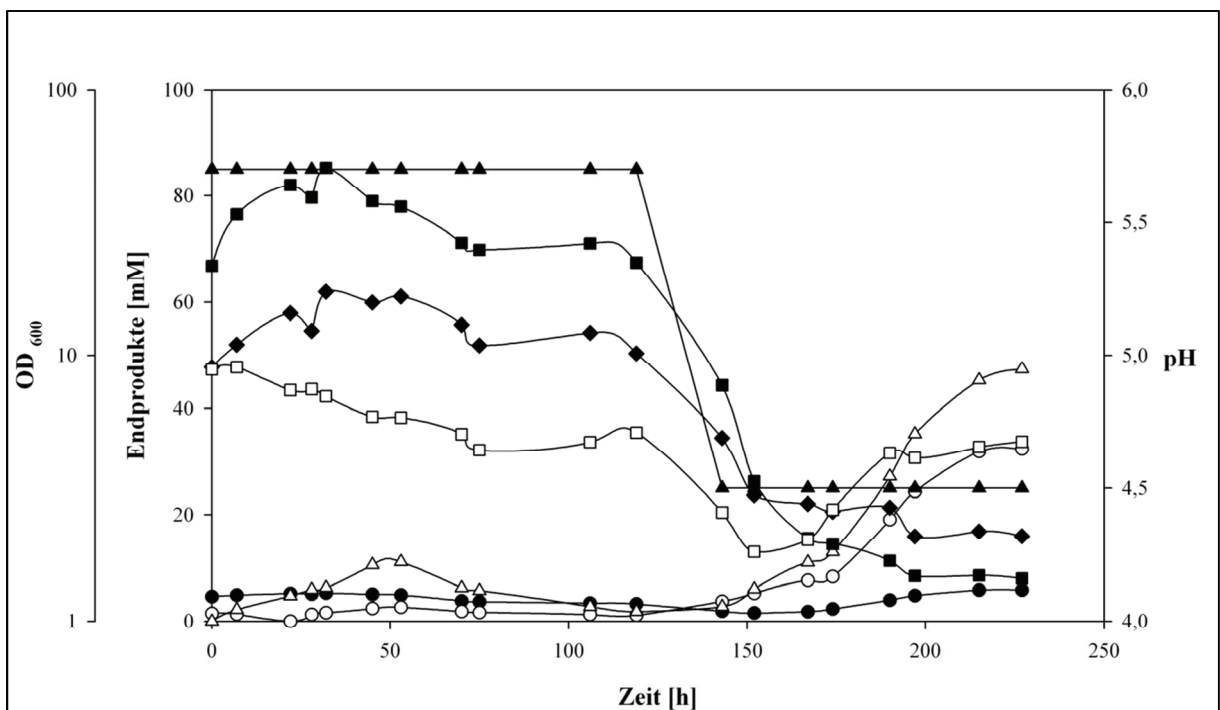


Abbildung A15: Fermentationsprodukte und Wachstum einer kontinuierlichen Kultur der Mutante *cap0036_Int* bei pH 5,7 und pH 4,5. Optische Dichte (\square), pH (\blacktriangle), Butyrat (\blacksquare), Acetat (\blacklozenge), Butanol (\triangle), Aceton (\circ), und Ethanol (\bullet).

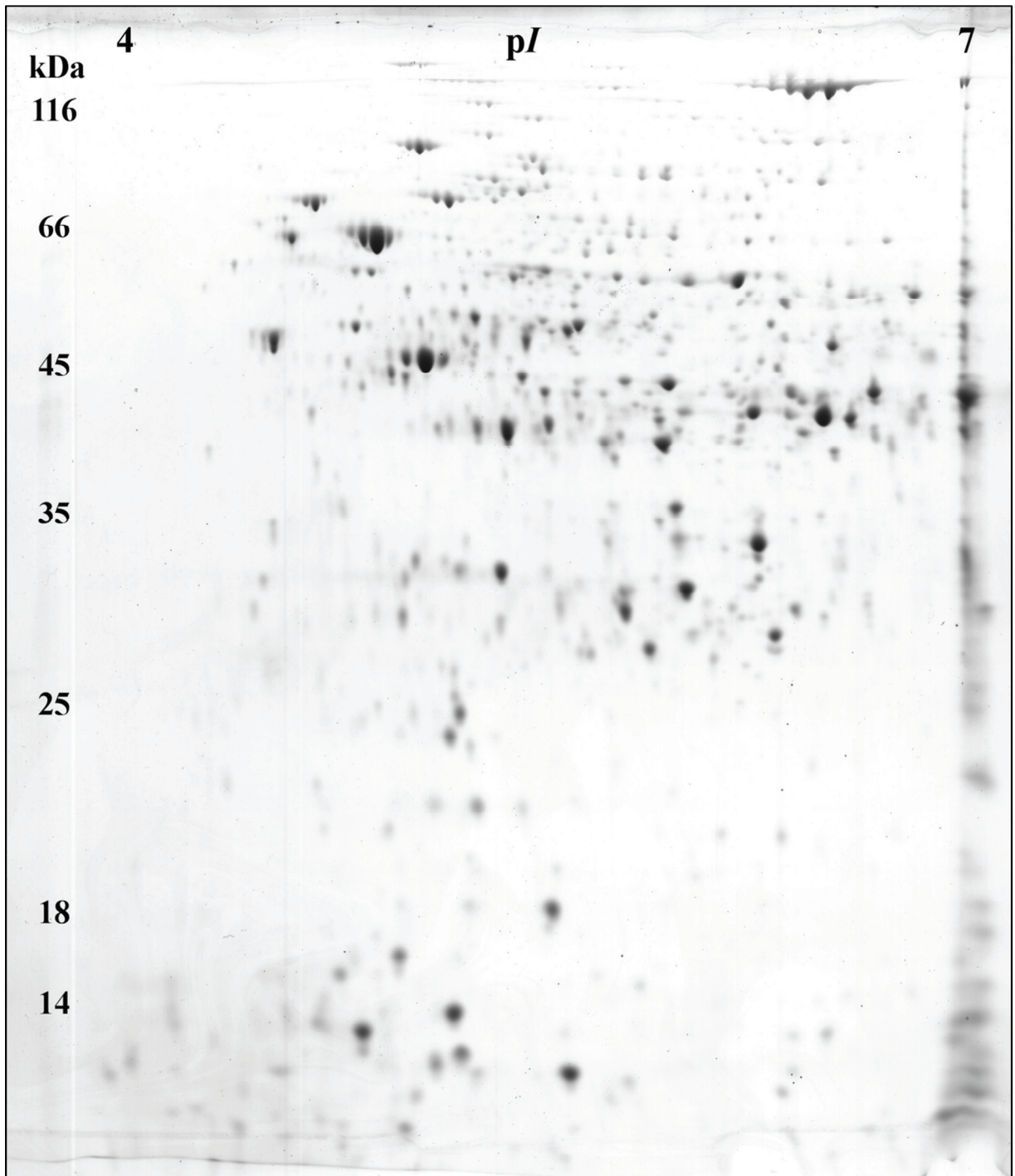


Abbildung A16: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Zellen der Mutante *cap0036_Int* aus der Säurephase (pH 5,7).

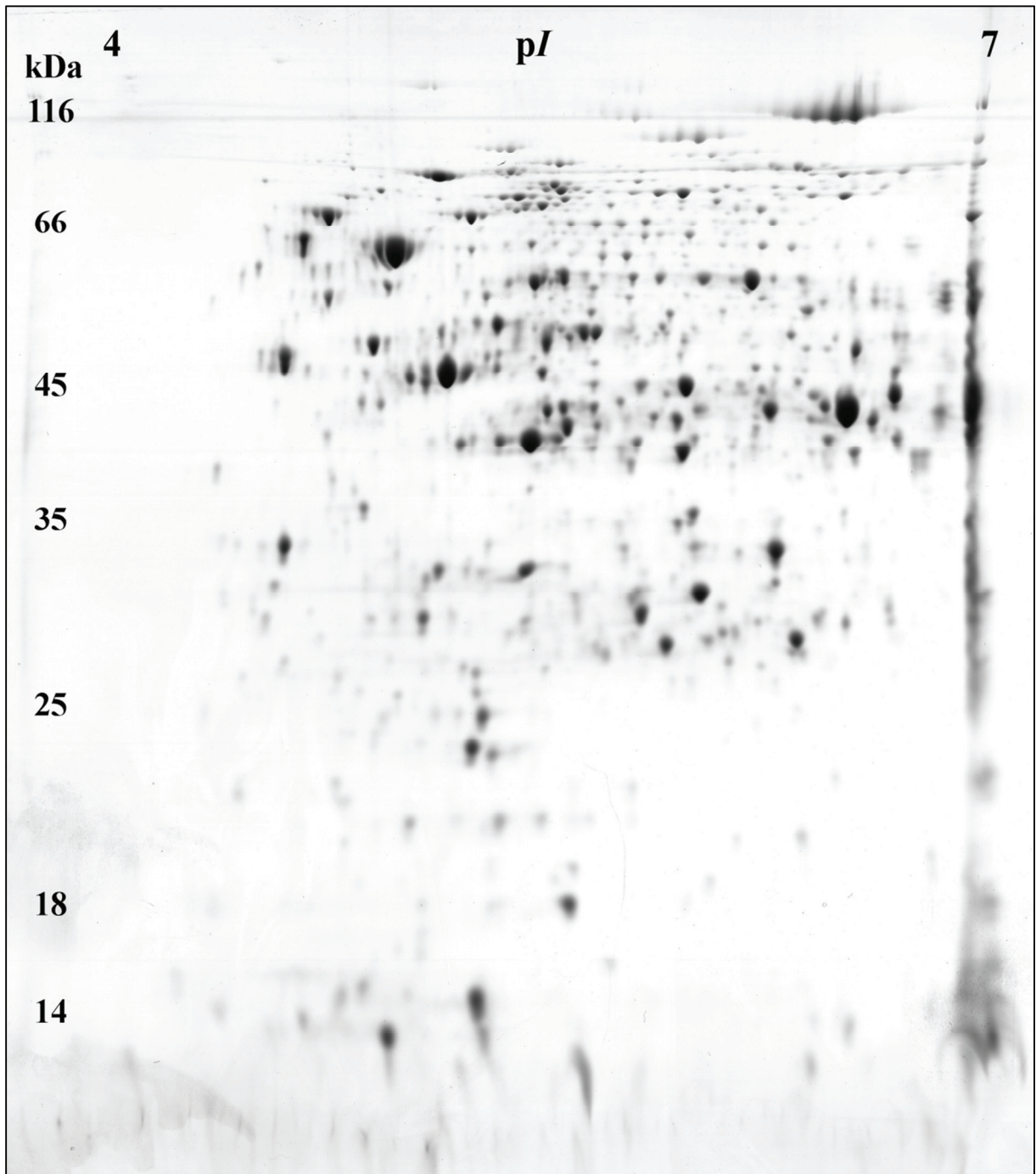


Abbildung A17: Repräsentatives kolloidal Coomassie gefärbtes 2D-Gel cytosolischer Proteine von Zellen der Mutante *cap0036_Int* aus der Lösungsmittelphase (pH 4,5).

Selbständigkeitserklärung

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

Rostock, den

Holger Janssen