

**Metabolic Engineering von *Clostridium acetobutylicum*:  
Steigerung der Butanolbildung durch homologe Genexpression**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

**Miriam Stella Mann**

aus Rostock

geboren am 28.01.1984 in Castrop-Rauxel

Rostock, Mai 2012

Einreichung der Dissertation: 02.05.2012

Wissenschaftliches Kolloquium: 09.07.2012

**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

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Stabilitätserhöhung von in <i>C. acetobutylicum</i> exprimierten Proteinen durch Co-Expression von Chaperonen	4
1.2 Co-Expression zentraler Schlüsselenzyme in <i>C. acetobutylicum</i> zur Verbesserung der Butanolproduktion durch Beeinflussung des Stoffflusses	6
1.3 Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus <i>C. acetobutylicum</i>	8
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	11
2.2 Zellanzucht	15
2.2.1 Nährmedien für <i>C. acetobutylicum</i>	15
2.2.2 Nährmedien für <i>E. coli</i>	17
2.2.3 Medienzusätze	17
2.2.4 Herstellung von Titan-(III)-NTA-Lösung	17
2.3 Stammkulturen und Reinheitskontrolle	18
2.4 Statische Kulturen von <i>C. acetobutylicum</i>	18
2.5 Anaerobe Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium	19
2.6 Bestimmung von physiologischen Parametern	19
2.6.1 Messung der optischen Dichte	19
2.6.2 Bestimmung der Wachstumsrate	19
2.6.3 Bestimmung des pH-Werts	20
2.6.4 Bestimmung der gebildeten Gesamtgasmenge (HÖNICKE, 2009)	20
2.6.5 Glukosebestimmung	21
2.6.6 Laktatbestimmung	22
2.6.7 Gaschromatographische Analyse flüssiger Gärungsprodukte	23
2.6.7.1 Probenvorbereitung	23
2.6.7.2 Quantifizierung	24
2.6.7.3 Analysebedingungen	24
2.6.8 Gaschromatographische Analyse gasförmiger Gärungsprodukte	24
2.6.8.1 Probenvorbereitung	24
2.6.8.2 Quantifizierung	25
2.6.8.3 Analysebedingungen	25
2.6.9 Butanolstress ( <i>n</i> -Butanol)	25
2.6.10 Lichtmikroskopie	25

2.7	Nukleinsäure-Standardmethoden	26
2.7.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	26
2.7.2	Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.7.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.7.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	27
2.7.2.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	29
2.7.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren	31
2.7.3.1	Natriumacetatfällung	31
2.7.3.2	Ammoniumacetatfällung	31
2.7.3.3	Isopropanolfällung	32
2.7.3.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	32
2.7.4	Agarosegelelektrophorese	32
2.7.4.1	Standard-Gelelektrophorese (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)	32
2.7.4.2	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.7.5	Enzymatische Modifikationen von DNA	33
2.7.5.1	Restriktion von DNA	33
2.7.5.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	34
2.7.5.3	Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.7.6	<i>In vitro</i> Amplifikation von DNA mittels PCR	35
2.7.6.1	Primerdesign	35
2.7.6.2	Standard-PCR	36
2.8	Erzeugung rekombinanter Organismen	37
2.8.1	DNA-Transfer in <i>E. coli</i>	37
2.8.1.1	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.8.1.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.8.1.3	CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i>	38
2.8.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	39
2.8.1.5	Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> durch Elektroporation	39
2.9	Arbeiten mit Proteinen	40
2.9.1	Gesamtproteingewinnung aus <i>E. coli</i>	40
2.9.2	Gesamtproteingewinnung aus <i>C. acetobutylicum</i>	40
2.9.3	Protein-Standardmethoden	41
2.9.3.1	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA Agarose	41
2.9.3.2	Protein-Konzentrationsbestimmung (BRADFORD, 1976; mod.)	42
2.9.3.3	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970; mod.)	42
2.9.3.4	Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie	44

2.10	Enzymassays	45
2.10.1	Thiolase-Assay (HARTMANIS & GATENBECK, 1984)	45
2.10.2	$\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay (MADAN <i>et al.</i> , 1973)	46
2.10.3	Crotonase-Assay (HARTMANIS und GATENBECK, 1984)	46
2.10.4	Butyryl-CoA Dehydrogenase-Assay (LI <i>et al.</i> , 2008)	47
2.10.2	Charakterisierung einer <i>ThIA</i> -Mutanten-Bibliothek	48
2.10.2.1	Acetoacetyl-CoA Reduktase Aktivität (HAYWOOD <i>et al.</i> , 1988)	48
2.10.2.2	Gekoppelter Mikrotiterplatten- <i>ThIA/phaB</i> -Assay	49
2.11	Herstellung der <i>thIA</i> <sup>MUT</sup> -Bibliothek	50
2.12	Bezugsquellen	50
<b>3</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Homologe Expression mit Hilfe des pT-Vektors	53
3.2	Stabilitätserhöhung von in <i>C. acetobutylicum</i> exprimierten Proteinen durch Co-Expression von Chaperonen	55
3.2.1	Butanolproduktion	55
3.2.2	Butanoltoleranz	59
3.2.3	Butanoladaption	61
3.3	Co-Expression zentraler Schlüsselenzyme in <i>C. acetobutylicum</i> zur Verbesserung der Butanolproduktion durch Beeinflussung des Stoffflusses	64
3.3.1	Enzymassays	64
3.3.2	Physiologische Charakterisierung	65
3.3.2.1	Quantifizierungen der Gasbildung	66
3.3.2.2	Wachstum und Produktbildung	68
3.4	Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus <i>C. acetobutylicum</i>	72
3.4.2	Charakterisierung von <i>E. coli</i> pASK-IBA3_ <i>thIA</i> <sup>WT</sup>	72
3.4.3	Charakterisierung von <i>E. coli</i> pASK-IBA3_ <i>thIA</i> <sup>MUT</sup>	76
3.4.4	Charakterisierung von <i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>thIA</i> <sup>Derivat</sup>	78
3.4.4.1	Wachstum von <i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>thIA</i> <sup>Derivat</sup>	78
3.4.4.2	Produktbildung von <i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>thIA</i> <sup>Derivat</sup>	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
4.1	Stabilitätserhöhung von in <i>C. acetobutylicum</i> exprimierten Proteinen durch die Co-Expression von Chaperonen	83
4.1.1	Butanolresistenz	83
4.1.2	Butanolproduktion	84
4.1.3	Butanoladaption	86
4.2	Co-Expression zentraler Schlüsselenzyme in <i>C. acetobutylicum</i> zur Beeinflussung des Stoffflusses von Butanol	87

4.2.1	Enzymatische Charakterisierung	88
4.2.2	Phänotypische Charakterisierung	89
4.3	Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus <i>C. acetobutylicum</i>	95
4.3.1	Genotypische Charakterisierung	97
4.3.2	Phänotypische Charakterisierung	99
	Zusammenfassung	i
	Literaturverzeichnis	ii
	Anhang	xiv
	Danksagung	xxvii
	Lebenslauf	xxviii
	Selbstständigkeitserklärung	xxix

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Adenin, Absorption
A.	Aqua, <i>Acetobacterium</i>
ad.	auffüllen auf
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5-triphosphat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparagin
<i>bcd</i>	Butyryl-CoA Dehydrogenase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c	centi, Konzentration
C	Cytosin
C-	Carboxy-
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
CFU	colony forming units
CGM	clostridial growth medium
CoA	Coenzym A
<i>crt</i>	Crotonase
Cys	Cystein
d	Schichtdicke, Desoxy, Tag(e)
<i>dest.</i>	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
<i>etfAB</i>	Elektrontransferprotein A und B
Fw	Forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin; Aminosäure: Glycin
Gl.	Gleichung
Gly	Glycin
<i>groESL</i>	Chaperonin GroEL mit Co-chaperonin GroES
<i>grpE</i>	GrpE protein HSP-70 cofactor
H	Aminosäure: Histidin

H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
<i>hbd</i>	β-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase
His	Histidin
<i>hspG</i>	heat shock protein 90
Hrsg.	Herausgeber
HSP	Heat shock protein
Ile	Isoleucin
Kl.	Klon
l	Liter, Länge
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
M	Molar (Konzentrationsmaß; 1 Molar = 1 mol/l)
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Met	Methionin
Mg	Magnesium
mod.	modifiziert
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Medium Synthetique
m-RNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
N-	Aminon
N	Stickstoff; Aminosäure: Asparagin
Na	Natrium
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat)
NADH(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat), reduziert
Ni	Nickel
nt	Nukleotide
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
Ω	Ohm
omik	Analyse der Genomik, Proteomik und Metabolomik
ORI	origin of replication
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Phe	Phenylalanin
R	Aminosäure: Arginin
RCA	reinforced clostridial agar
red	reduziert
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)



RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
Ser	Serin
SAP	Shrimps Alkalische Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tet	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
term.	Terminal
<i>thl</i>	Thiolase
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Uracil, Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt; Volumen; Aminosäure: Valin
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

## 1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde aufgrund stetig steigender Erdölpreise das Interesse an Biotreibstoffen immer größer. Daher gewinnt die clostridielle Aceton-Butanol-Ethanol Fermentation (ABE-Fermentation) immer mehr an Bedeutung (DÜRRE, 2008). Diese stellt einen der ältesten und wichtigsten Fermentationsprozesse dar, welcher lediglich von der Ethanol-Fermentation durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* übertroffen wird (LÜTKE-EVERSLOH & BAHL, 2011). Bei der ABE-Fermentation wandeln solventogene Clostridien Zucker oder Stärke in Lösungsmittel um (JONES & WOODS, 1986). Hierbei steht seit einigen Jahren besonders Butanol als hochwertige Industriechemikalie im Fokus des Interesses. Heutzutage wird Butanol meist petrochemisch hergestellt, aber aufgrund schwindender Rohölvorkommen und ökologischer Gesichtspunkte nimmt das Interesse an mikrobiologisch hergestelltem Biobutanol immer mehr zu. So produziert China seit 2004 durch die klassische ABE-Fermentation bereits wieder ~350.000 t Butanol pro Jahr (CHIAO & SUN, 2007). Mehr als die Hälfte der weltweiten Butanolproduktion findet Anwendung in der Produktion von Acrylaten und Methacrylsäure-Estern. Diese und weitere Derivate finden Anwendung in der Produktion von Textilien, Faserstoffen und Kunststoffprodukten (DÜRRE, 2008). Weiterhin gewinnt Butanol als Treibstoff immer mehr an Bedeutung. So genanntes Biobutanol kann als Benzinzusatz ohne Modifikationen oder bestimmte Zusätze verwendet werden und hat einige bedeutende Vorteile gegenüber Ethanol (LEE *et al.*, 2008). Zu diesen Vorteilen zählt sein höherer Energiegehalt, die geringere Korrosivität und Flüchtigkeit, sowie eine wesentlich verminderte Aufnahmefähigkeit für Wasser, die eine Phasentrennung im Treibstoff vermindert (DÜRRE, 2008; GREEN, 2011). So konnte bereits 2005 David Ramey einen 13 Jahre alten Buick durch die Vereinigten Staaten von Amerika fahren, welcher mit reinem Butanol als Brennstoff betrieben wurde (DÜRRE, 2008).

Das Bakterium *Clostridium acetobutylicum*, welches Anfang des 20. Jahrhunderts von C. WEIZMANN isoliert und beschrieben wurde, ist aufgrund seines biphasischen Gärungsstoffwechsels in der Lage, die für den Organismus namensgebenden Lösungsmittel Aceton und Butanol in signifikanten Mengen zu produzieren. Durch das Potential von Butanol als Ersatztreibstoff und die steigenden Rohölpreise in den letzten Jahren nahm das

wirtschaftliche Interesse an *C. acetobutylicum* wieder deutlich zu (DÜRRE, 2007; NI & SUN, 2009). Intensive Forschungen in den letzten Jahrzehnten führten dazu, dass sich *C. acetobutylicum* zu einem Modellorganismus für apathogene Clostridien entwickelt hat. Bei *C. acetobutylicum* handelt es sich um ein stäbchenförmiges Bakterium, welches in Abwässern, Schlämmen und Böden zu finden ist und aufgrund seiner Fähigkeit der Endosporenbildung als potentiell ubiquitär verbreitet gilt (BAHL & DÜRRE, 2001). Zudem ist es durch einen biphasischen Gärungsstoffwechsel und einen komplexen Zellzyklus charakterisiert (Abb. 1.1).

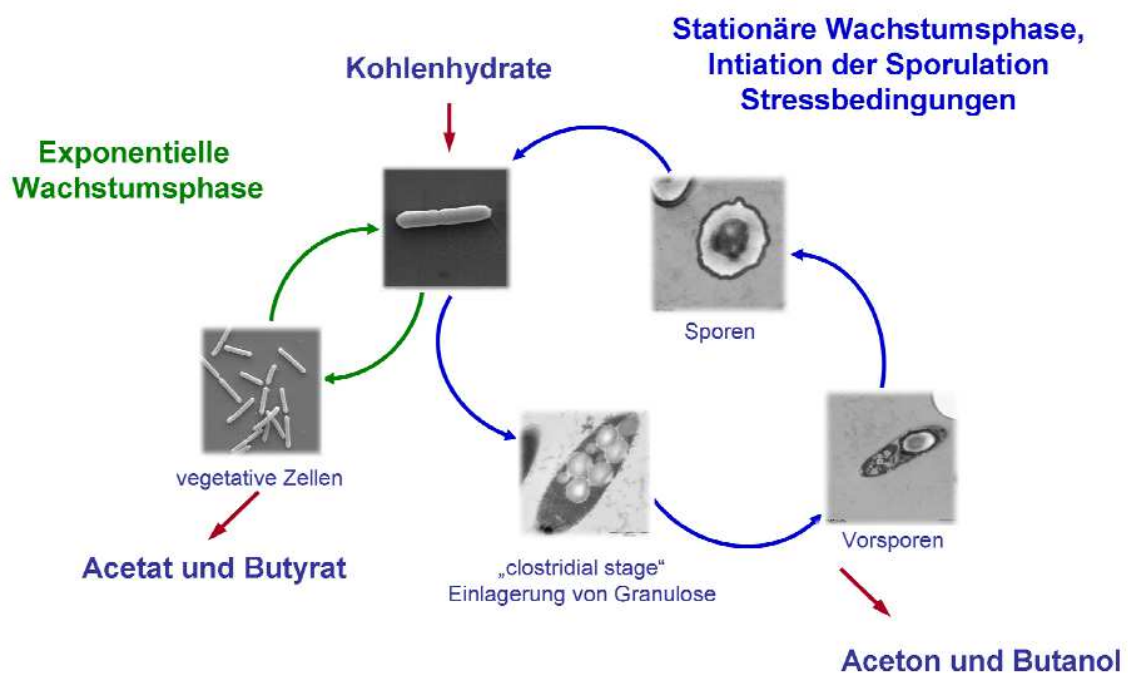


Abb. 1.1: Zellzyklus mit Produkten der biphasischen Gärung von *C. acetobutylicum* (HILLMANN, 2009; Erläuterung siehe Text)

Während der exponentiellen Wachstumsphase fermentiert *C. acetobutylicum* Zucker vorrangig zu den löslichen organischen Säuren Acetat und Butyrat. Daneben entstehen beachtliche Mengen an Gas in Form von Kohlendioxid und molekularem Wasserstoff. Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase kommt es zu einer Umstellung des Stoffwechsels, wobei die verbliebenen Zuckermoleküle und die vorhandenen Säuren vorrangig in die neutralen Lösungsmittel Ethanol, Aceton und Butanol umgewandelt werden. Dieser charakteristische Vorgang im Stoffwechsel wird als „Lösungsmittelshift“ bezeichnet. Bei einer Fermentation mit Zuckern oder Stärke produziert *C. acetobutylicum* die Gärungsendprodukte Aceton, Butanol und Ethanol typischerweise in einem molekularem

Verhältnis von 3:6:1 (MITCHELL, 1998). Allerdings ist festzustellen, dass *C. acetobutylicum* immer noch im Gegensatz zum klassischen Ethanolproduzenten *S. cerevisiae* wissenschaftlich vergleichsweise wenig untersucht ist. Ein Grund hierfür war lange Zeit der Mangel an gentechnischen Methoden für Clostridien, um z.B. gezielte Genexpressionen durchzuführen (LEHMANN *et al.*, 2012). Mittlerweile haben sich jedoch in den letzten zwei Jahrzehnten zahlreiche Methoden zur genetischen Modifikation von *C. acetobutylicum* entwickelt (u.a. GIRBAL *et al.*, 1955; GIRBAL & SOUCAILLE, 1998; TUMMALA *et al.*, 1999; TUMMALA *et al.*, 2003; SILLERS *et al.*, 2008). Allerdings sind bisher keine umfassenden Metabolic Engineering (ME)-Projekte zur Stammoptimierung von *C. acetobutylicum* publiziert, obwohl dieser Ansatz die biotechnologische Butanolproduktion im Vergleich zu petrochemischen Verfahren konkurrenzfähiger machen könnte. Bisher bestimmten drei wesentliche Faktoren die wirtschaftliche Konkurrenz der klassischen biotechnologischen Butanolproduktion: hohe Substratkosten, niedrige Produktausbeute (2 % [v/v]) wegen der Toxizität der Lösungsmittel und hohe Kosten für das „Downstream Processing“ (DÜRRE, 1998). Um diesen entgegenzuwirken, stellt das ME einen wichtigen Ansatz dar, um den Stoffwechsel gezielt zu manipulieren, so dass der Stofffluss verstärkt in Richtung Butanol verschoben wird. Der Begriff des Metabolic Engineering wurde 1991 von James E. Bailey definiert und ist mittlerweile ein Standardbegriff in der Mikrobiologie (BAILEY, 1991). Bei dem Begriff des Metabolic Engineering handelt es sich um die Entwicklung von Strategien zur Schaffung bzw. Optimierung von biotechnologischen Produktionsorganismen. Dabei werden Veränderungen auf enzymatischer oder regulatorischer Ebene im Organismus vorgenommen. Hierbei werden die Zielproteine aus bekannten Stoffwechselwegen abgeleitet oder aufgrund von Ergebnissen aus „omik“ Experimenten gewählt (JANSSEN *et al.*, 2010; GRIMMLER *et al.*, 2011). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass gezieltes Metabolic Engineering zu gewünschten Erfolgen führen kann, wie z.B. verbesserte Ethanolproduktion in *C. acetobutylicum* (LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011).

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt, auf der Basis gezielter Proteinexpression in *C. acetobutylicum* einen Stamm mit gesteigerter Butanolproduktion zu generieren:

1. Stabilitätserhöhung von in *C. acetobutylicum* exprimierten Proteinen durch die Co-Expression von Chaperonen
2. Co-Expression zentraler Schlüsselenzyme in *C. acetobutylicum* zur Verbesserung der Butanolproduktion durch Beeinflussung des Stoffflusses
3. Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus *C. acetobutylicum*

Im Folgenden sollen die o. g. Strategien näher erläutert werden.

### **1.1 Stabilitätserhöhung von in *C. acetobutylicum* exprimierten Proteinen durch Co-Expression von Chaperonen**

Die hohe Toxizität von Butanol führt zu einer Limitierung der Produktbildung von *C. acetobutylicum*. Hohe Konzentrationen an Butanol führen zu einer Inhibition des Nährstofftransport, der Glukoseaufnahme und der Membrangebundenen ATPase Aktivität (BOWLES & ELLEFSON, 1985). Die chaotrophischen Wirkung von Butanol bewirkt eine Störung des zellulären Energiehaushaltes, es kommt zu einem Abfall des interzellulären pHs und der ATP Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität ist die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* auf 13 g/l Butanol I (JONES & WOODS, 1986) limitiert. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Produktion von Butanol zu Stress für den Organismus führt. Obwohl diese Zusammenhänge bisher noch nicht vollkommen verstanden wurden, konnten einige Arbeiten zeigen, dass Chaperone eine besondere Rolle bei der Butanol-Stressantwort von *C. acetobutylicum* spielen (ALSAKER *et al.*, 2004; TOMAS *et al.*, 2004). Daher zielte dieser Arbeit darauf ab, einen clostridiellen Produktionsstamm mit verbesserten Wachstumseigenschaften in Gegenwart von Butanol zu produzieren. Denn die erhöhte Butanoltoleranz gilt als Grundlage eine verbesserte Butanolproduktion überhaupt erst zu ermöglichen. Dazu wurde als erstes Teilziel die homologe Co-Expression von Chaperon-codierten Proteinen in *C. acetobutylicum* definiert. Die Produktion von Chaperonen ist eine generelle zelluläre Schutzfunktion gegenüber einer großen Anzahl von Umwelt bedingten

Stressfaktoren. Molekulare Chaperone spielen in der Protein- biosynthese, -transport, -faltung und Degradation von nicht stabilen Proteinen eine wichtige Rolle. In *C. acetobutylicum* annotierte Chaperone sind unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen stark hoch reguliert (NARBERHAUS & BAHL, 1992; NARBERHAUS *et al.*, 1992). Transkriptionsdaten von *groESL*, *grpE* und *htpG* zeigten, dass diese von den Zellen insbesondere auch nach Butanolstress stark induziert werden (TOMAS *et al.*, 2004). Eine Induktion dieser Stressproteine konnte auch während der solventogenen Wachstumsphase im Zellzyklus von *C. acetobutylicum* detektiert werden (ALSAKER & PAPOUTSAKIS, 2005). Es ist somit wahrscheinlich, dass Chaperone eine große Rolle bei der Faltung oder Aktivierung von Proteinen während des Lösungsmittelstresses spielen (NICOLAOU *et al.*, 2010). In Arbeiten von TOMAS *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass die homologe Expression des polycistronischen Operons *groESL* (CA\_C2703-04), welches für das Klasse I (HSP 60) Chaperon *GroEL* und sein co-Chaperon *GroES* codiert, zu einer signifikant erhöhten Butanoltoleranz führt. Vergleichend zum Typ-Stamm konnte auch eine höhere Butanolkonzentration gezeigt werden (TOMAS *et al.*, 2003). Daher wurde zunächst ein *C. acetobutylicum*-Stamm mit vermehrter Expression von *groESL* hergestellt, der dann als Positivkontrolle in den weiteren Experimenten diente. Zudem sind in dieser Arbeit zwei neue Stämme, die für Chaperone codieren, sowohl auf ihre Butanoltoleranz als auch auf ihre Butanolproduktion hin untersucht worden. Hierfür wurden das Hitzeschock-Protein (HSP) 60 Co-Protein *grpE* (CA\_C0471) und das HSP 90 Protein *htpG* (CA\_C3315) homolog in *C. acetobutylicum* co-exprimiert und analysiert. Es war bereits bekannt, dass *grpE* an dem molekularen Chaperon *dnaK* (CA\_C1282) bindet und dort für die Energiegewinnung durch die Rückführung von ADP zu ATP verantwortlich ist (RÜNGELING *et al.*, 1999). Für die Faltung und Aktivierung von Substratproteinen ist *htpG* zuständig (THOMAS & BANEYX, 2000). Die Funktionen beider genannten Chaperone führen zu der Annahme, dass diese sich als ideale Kandidaten für die erhöhte Co-Expression in *C. acetobutylicum* zur Verbesserung der Butanoltoleranz bzw. Butanolproduktion eignen.



der Produktion der organischen Säuren Acetat und Butyrat das vorhandene Pyruvat zur weiteren Erzeugung von molekularer Energie genutzt. Wenn die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichen, werden die vorhandenen Produkte zur Produktion der Lösungsmittel Aceton, Ethanol und Butanol verwendet. Für den Ablauf dieses komplexen Stoffwechsels sind vornehmlich die zentralen Enzyme Thiolase (CA\_C2873),  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (CA\_C2708), Crotonase (CA\_C2712) und Butyryl-CoA Dehydrogenase (CA\_C2711) zuständig. Sie sind hauptverantwortlich für die Reaktion vom Acetoacetyl-CoA zum Butyryl-CoA, so dass sowohl die organischen Säuren, als auch die Lösungsmittel in *C. acetobutylicum* gebildet werden können. BOYNTON *et al.* (1996) konnten zeigen, dass die beschriebenen Enzyme des Gärungsstoffwechsels aus *C. acetobutylicum* sich mit Enzymkomplexen aus Eukaryoten ähneln, welche für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren verantwortlich sind. Dies legt den Schluss nahe, dass die zentralen clostridiellen Enzyme hoch konservierte Domänen aufweisen (BOYNTON *et al.*, 1996). Die Enzyme - bis auf die Thiolase - werden im Genom von *C. acetobutylicum* von dem *bcs*-Operon („butyryl-CoA synthesis operon“) exprimiert. Die Thiolase liegt weiter in unmittelbarer Nähe *upstream* auf dem Chromosom (monocistronisches Operon) von *C. acetobutylicum* und ist keinem Gärungsstoffwechsel-relevantem Operon zuzuordnen.

In ersten Arbeiten wurden bereits mittels Metabolic Engineering Strategien versucht, in *C. acetobutylicum* und verwandten bakteriellen Stämmen den Weg des Gärungsstoffwechsels in Richtung Butanolsynthese zu verbessern (LEE *et al.*, 2008; PAPOUTSAKIS, 2008). Um die Butanolausbeute zu erhöhen, sollte die Synthese von Nebenprodukten während der Butanolproduktion minimiert werden. Dies kann durch die Inaktivierung oder Herunterregulierung von Genen geschehen, welche für die Aceton- oder Säurebildung zuständig sind. So führt eine niedrige Produktion von Aceton und Acetat zu einer verbesserten Butanolausbeute (GREEN *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 2009). Andererseits ist es möglich den Stofffluss in Richtung Butanol zu verstärken, indem man die Hauptenzyme des Gärungsstoffwechsels homolog in *C. acetobutylicum* ATCC 824 co-exprimiert. In dieser Arbeit wurden folgende Enzyme in *C. acetobutylicum* ATCC 824 getrennt voneinander mit Hilfe des pT-Plasmids homolog co-exprimierten: Thiolase (CA\_C2873),  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (CA\_C2708), Crotonase (CA\_C2712) und Butyryl-CoA Dehydrogenase (CA\_C2711).



### 1.3 Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus *C. acetobutylicum*

Die große Gruppe der Thiolasen ist unterteilt in biosynthetische und degradative Enzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Die degradative Thiolase (E.C. 2.3.1.16; Acyl-CoA:Acetyl-CoA C-Acetyltransferase) spielt eine wichtige Rolle im Fettsäure- $\beta$ -Oxidationsweg und besitzt einen großen Substratbereiches für langkettige Fettsäuren ( $C_4$ - $C_{16}$ ). Andererseits gibt es die biosynthetischen Thiolasen (E.C. 2.3.1.9; Acetyl-CoA-Acetyl-CoA C-Acetyltransferase), welche spezifisch für  $C_4$ -Substrate sind. Die Thiolase (Acetyl-CoA Acetyltransferase; CA\_C2873) aus *C. acetobutylicum* stellt das erste Enzym im Gärungsstoffwechsel (Abb. 1.2) dar. Sie gilt als zentrales Schlüsselenzym für den clostridiellen Stoffwechsel und katalysiert die Bildung des ersten  $C_4$ -Körpers durch die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu einem Molekül Acetoacetyl-CoA. In den nächsten drei Schritten wird Butyryl-CoA zu Butyrat umgewandelt, unter der gleichzeitigen Produktion von ATP. Die Thiolase ist sehr strikt durch das Substrat:Produkt-Verhältnis reguliert, um die Kontrolle des metabolischen Flusses gewährleisten zu können. Die Aktivität der Thiolase nimmt während des Wachstumsverlaufes von *C. acetobutylicum* stetig zu und erreicht seine maximale Aktivität in der stationären Wachstumsphase. Im Genom von *C. acetobutylicum* sind zwei Thiolasen annotiert: *thIA* (C\_AC2873) und *thIB* (C\_AP0078), wobei nur *thIA* physiologisch relevant für den Organismus ist. Die Expression von *thIB* ist sehr gering und bisher nur in der Transitionsphase zwischen Acidogenese und Solventogenese beschrieben (WINZER *et al.*, 2000; GRIMMLER *et al.*, 2011) Im Allgemeinen weisen Thiolasen von Eukaryoten und Prokaryoten hohe Homologien auf (HAAPALAINEN *et al.*, 2006). Die Thiolase aus *Zoogloea ramigera* wurde bereits kristallographisch untersucht und ermöglicht ein besseres Verständnis hinsichtlich Enzymkinetik und Substrat-Enzym-Komplexen. Normalerweise ist die Thiolase aus *Z. ramigera* in der Biosynthese von Polyhydroxybutyraten, ein weit verbreiteter Typ für cytoplasmatische Energie und Kohlenstoffspeicherung, verantwortlich (LU *et al.*, 2009). Die Aminosäuresequenz der Thiolase von *Z. ramigera* konnte mit der von *C. acetobutylicum* verglichen werden und erlaubte so Rückschlüsse auf strukturell möglicherweise entscheidende Bereiche (Abb. 1.3).

C.ac.	--MKEVVIASAVRTAIGSYGKSLKDVPVAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQ	58
Z.ram.	MSTPSIVIASAARTAVGVSFNGAFANTPAHELGATVISAVLERAGVAAGEVNEVILGQVLP	60
	.:*****.***:*:*:. :. :.*** :****.*. .:::***: . :*****:**	
C.ac.	AGLGQNPARGASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENM	118
Z.ram.	AGEGQNPARGAAMKAGVPQEATAWGMNQLXGSGLRAVALGMQQIATGDASIIVAGGMESM	120
	** *****:***:* * * * * :*: : *****:***. * * :***.:***:***.*	
C.ac.	SRAPYLANNARWGYRMGNAKFVDEMITDGLWDAFN DYHMGITAENIAERWNI SREEQDEF	178
Z.ram.	SMAPHCAH-LRGGVKMGDFK MIDTMIKDGLTDAFYGYHMGTTAENVAKQWQLSRDEQDAF	179
	* **: * : * * :*: * :*: * **.* ** * * .**** *****:***:***:*** * *	
C.ac.	ALASQKAEAAIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFGSTIEGLAKLKPAPFKD	238
Z.ram.	AVASQNKAEAAQKDGFRKDEIVPFIVKGRKGDITVDADEYIRHGATLDSMAKLRPAFDKE	239
	*:***:*** * *.*:*****.:*****: .**:**: *.**:*:*:***:***.*:	
C.ac.	GTVTAGNASGLNDCAAVLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKA	298
Z.ram.	GTVTAGNASGLNDGAAAALLMSEAEASRRGIQPLGRIVSWATVGVDPKVMGTGPIPASRK	299
	***** ** . :** :*.. *:*:***:***.:** ** :** :	
C.ac.	AIEKAGWTVDELDLIESNEAFAAQSLAVAKDLKFD MNKVN VNGGAIALGHPIGASGARIL	358
Z.ram.	ALERAGWKIGDLDLVEANEAFAAQACAVNKDLGWDPSIVNVNGGAIALGHPIGASGARIL	359
	*:***:***.:***:***:*****: ** ** * * * . *****:*****:	
C.ac.	VTLVHAMQKRDAKGLATLTCIGGGQGTAILLEKC	392
Z.ram.	NLLFEMKRRGARKGLATLTCIGGGMGVAMCIESL	393
	**:. * :*:***:***** *.*: *:	

**Abb. 1.3: Vergleich der Aminosäuresequenz der Thiolasen von *C. acetobutylicum* und *Z. ramigera*.** Der Sequenzvergleich ist mit Hilfe von ClustalW 2.1 durchgeführt worden; Aminosäuren sind wie folgt gekennzeichnet: "\*" identische, ":" hohe Ähnlichkeit und "." Ähnlichkeit. Die katalytischen Histidin- und Cysteinbindungen sind unterstrichen und die putativen Aminosäuren die an der CoA-Bindung beteiligt sind, sind grau schattiert.

Aus der Strukturanalyse von *Z. ramigera* ist bekannt, dass die Thiolase ein Tetramer bildet, wobei jede Untereinheit aus zwei Kerndomänen und einer großen Schleifendomäne besteht. Zudem ist bekannt, dass die Aminosäurereste 119-254 eine Schleife bilden, welche mit dem Coenzym A eines Substrates in Interaktion treten kann (MODIS & WIERENGA, 1999; MODIS & WIERENGA, 2000). Die katalytische Aktivität der Thiolase arbeitet nach einem Zwei-Schritt-Mechanismus, dem sog. „Ping-Pong-Mechanismus“. Durch den Entzug von Protonen wird Cystein 89 (Cys89) durch Histidin 348 (His348) aktiviert. Anschließend formen die beiden Aminosäuren ein kovalent gebundenes Acyl-Intermediat. Durch Acetyl-CoA (Kondensationreaktion) oder CoA-SH (Thiolytische Spaltung) bewirkt Cystein 378 (Cys378) eine Kondensation und eine Produktfreilassung. Desweiteren zeigten Analysen, dass Thiolasen eine Allosterische Domäne besitzen, so dass freies CoA-SH zu einer Inhibition dieser führt. Bisher wurde keine Domäne gefunden, die diesem Vorgang entgegen wirken könnte (KURSULA *et al.*, 2002; MERILÄINEN *et al.*, 2008; MERILÄINEN *et al.*, 2009). Wie auch andere Thiolasen, ist auch die von *C. acetobutylicum* sehr sensitiv gegen freies CoA-SH, so dass es schon im mikromolaren Bereich zu einer Inhibierung kommt. Weiterhin konnte auch eine Inhibierung, jedoch weitaus geringer, durch Butyryl-CoA und ATP detektiert werden

(HARTMANIS & GATENBECK, 1984; WIESENBORN *et al.*, 1988). Die hohe Sensitivität der Thiolase aus *C. acetobutylicum* gegenüber freiem CoA ist ein weiterer Forschungsgegenstand dieser Arbeit. Durch die Kondensationsreaktion der Thiolase entsteht gleich zum Beginn des clostridiellen Gärungsstoffwechsels bereits CoA-SH, welches eine inhibierende Wirkung auf die Thiolase ausübt (CoA-SH Freisetzung: siehe Abb. 1.2). Aus diesem Grund sollte die CoA-Bindestelle der Thiolase durch AS-Substitution mittels zufälliger Mutationen so verändert werden, dass die CoA-SH Sensitivität verringert wird. Hierbei lag das Augenmerk auf der Veränderung des Aminosäurenbereichs 119-254, da dieser eine Schleife bilden und so mit dem CoA eines Substrates in Interaktion treten kann. Um einen Thiolase-Klon mit geringerer CoA-Sensitivität zu detektieren, wurde ein Enzymassay nach WIESENBORN *et al.*, (1988, mod.) entwickelt welcher in einem neuartigen High-Throughput-Screening Verfahren angewendet werden konnte. Positiv veränderte Plasmide sollten anschließend in *C. acetobutylicum* co-exprimiert werden, so dass diese zu einem Stamm mit verbesserter Butanolausbeute führen. Hierbei beruht die Annahme darauf, dass eine geringere CoA-Sensitivität zu einer erhöhten Aktivität der Thiolase führt und es somit zu einem verstärkten Fluss, im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum*, in Richtung Butanol kommt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 2.1, Vektoren in Tabelle 2.2, rekombinante Plasmide in Tabelle 2.3 und die sequenzspezifischen Primer in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tab. 2.1: Bakterienstämme

Organismus	Besondere Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	Laborsammlung Nr. 258
<i>C. acetobutylicum</i> pT	pT-Vektor ohne Insert (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 287
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>groESL</i>	pT:: <i>groESL</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 288
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>htpG</i>	pT:: <i>htpG</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 289
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>grpE</i>	pT:: <i>grpE</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 290
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>thIA</i>	pT:: <i>thIA</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 291
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>hbd</i>	pT:: <i>hbd</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 292
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>crt</i>	pT:: <i>crt</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 293
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>bcd_etfA_etfB</i>	pT:: <i>bcd</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 294
<i>E. coli</i> Turner_ pET-15b- <i>phaB1</i>	Enthält ein Plasmid zur Expression von <i>phaB1</i> (NADPH abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase aus <i>Ralstonia eutropha</i> H16) mit N-terminalen His-tag (Ap <sup>R</sup> )	Laborsammlung Nr. 295/ (BUDDE <i>et al.</i> , 2010)

<i>E. coli</i> BL21-DE3 pASK-IBA3_ <i>thIA</i>	Enthält das Plasmid pASK-IBA3 zur Expression der Thiolase A (C_AC2873) aus <i>C. acetobutylicum</i> mit C-terminalen Strep-tag (Ap <sup>R</sup> )	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 296
<i>E. coli</i> BL21-DE3 pASK-IBA3_ <i>thIA</i> <sup>MUT</sup>	pASK-IBA3:: <i>thIA</i> mit AA-Substitution: R133G, H156N und G222V	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 324
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ <i>thIA</i> <sup>MUT</sup>	pT:: <i>thIA</i> (Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> ) mit AA-Substitution: R133G, H156N und G222V	vorliegende Arbeit/ Laborsammlung Nr. 325
<i>E. coli</i> BL21-DE3	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Laborsammlung Nr. 206/ (STUDIER und MOFFATT, 1986)
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , (Φ8 <i>lacZ</i> Δ2.15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Laborsammlung Nr. 272/ (HANAHAN, 1983)
<i>E. coli</i> ER2275 pANII	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , <i>el4<sup>-</sup></i> , Δ( <i>lac</i> )U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(zbgZ10::Tn10) Tc <sup>S</sup> , Δ( <i>mcr-hsd-mrr</i> )114::1510, [F <sup>-</sup> , <i>proAB</i> , <i>laqI</i> <sup>Δ</sup> ZΔ2.15 zzf::mini-Tn10 (Km <sup>r</sup> )]	Laborsammlung Nr. 271/ (BERMEJO <i>et al.</i> , 1998)

Tab. 2.2: Plasmide

Vektor	relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pAN-II	Tc <sup>r</sup> , Φ3 <i>tl</i> ; p15A oriR	Laborsammlung/ (HEAP <i>et al.</i> , 2007)
pASK-IBA3	<i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>t<sub>lpp</sub></i> , P <sub>tetA</sub> , ATG, Faktor Xa- Schnittstelle, C-term. <i>Strep</i> -tagII, Ap <sup>R</sup> , cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung/ (www.iba-go.de)
pT_ <i>HydA</i>	P <sub>thiolase</sub> , ATG, <i>ori</i> , <i>repL</i> ; C-term. <i>Strep</i> -tag, Em <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , cytoplasmatische Expression in <i>E. coli</i>	Laborsammlung/ (GIRBAL <i>et al.</i> , 2004)

Tab. 2.3: Rekombinate Plasmide

Plasmid	relevante Merkmale	Insertgröße	Herkunft/Referenz
pT:: <i>groESL</i>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>groESL</i> ( <i>cac2703/04</i> ), cytoplasmatisch	1920 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>htpG</i>	pT, 5' <i>Bcl</i> I, 3' <i>Kas</i> I, <i>htpG</i> ( <i>cac3315</i> ), cytoplasmatisch	1875 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>grpE</i>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>grpE</i> ( <i>cac0471</i> ), cytoplasmatisch	573 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>thIA</i>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>thIA</i> ( <i>cac2873</i> ), cytoplasmatisch	1179 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>hbd</i>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>hbd</i> ( <i>cac2708</i> ), cytoplasmatisch	898 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>crt</i>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>crt</i> ( <i>cac2712</i> ), cytoplasmatisch	786 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>bcd-etfAB</i>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>bcd-etfAB</i> ( <i>cac2709-2711</i> ), cytoplasmatisch	2979 Bp	vorliegende Arbeit
<i>pASK-IBA3::thIA</i>	<i>pASK-IBA3</i> , 5' <i>Eco</i> RI, 3' <i>Kpn</i> I, <i>thIA</i> ( <i>cac2873</i> ), cytoplasmatisch	1179 Bp	vorliegende Arbeit
<i>pASK-IBA3::thIA</i> <sup>MUT</sup>	<i>pASK-IBA3</i> , 5' <i>Eco</i> RI, 3' <i>Kpn</i> I, <i>thIA</i> ( <i>cac2873</i> ), cytoplasmatisch ( <i>thIA</i> mit AA-Austausche: R133G, H156N und G222V)	1179 Bp	vorliegende Arbeit
pT:: <i>thIA</i> <sup>MUT</sup>	pT, 5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Kas</i> I, <i>thIA</i> ( <i>cac2873</i> ), cytoplasmatisch ( <i>thIA</i> mit AA-Austausche: R133G, H156N und G222V)	1179 Bp	vorliegende Arbeit

**Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide.** Die „fett“ geschriebenen Buchstaben stellen Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI: GGATCC; *Kas*I: GGCGCC; *Bcl*I: TGATCA) für die Klonierung in den pT-Vektor dar, die „normal“ geschriebenen Buchstaben zeigen die jeweils homologen Bereiche der Amplifikate nach der Schnittstelle. Die „A-Sequenz“ vor den Restriktionsschnittstellen erleichtern der Polymerase das Anknüpfen an die DNA. Das Codon ATG bzw. TTG stellt den jeweiligen Start des entsprechenden Offenen Leserahmens dar. Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt.

Name	Sequenz (5' → 3')	Funktion
<i>groESL_fw_Bam</i> HI <i>groESL_rv_Kas</i> I	AAAA <b>GGATCC</b> ATGGCAAAGCAAATATTATACG AAAA <b>GGCGCC</b> TTATTCTTCTACAATTCC	<i>groESL</i> -spez. Primer (ÜE)
<i>grpE_fw_Bam</i> HI <i>grpE_rv_Kas</i> I	AAAA <b>GGATC</b> CTTGAAAAGGAACTTTAG AAAA <b>GGCGCC</b> CTATTCCTCCTGCTCC	<i>grpE</i> -spez. Primer (ÜE)
<i>htpG_fw_Bcl</i> I <i>htpG_rv_Kas</i> I	AAAA <b>ATGATCA</b> ATGGCTGTAAACAG AAAA <b>GGCGCC</b> TTATTTTCATCAAACCTTGC	<i>htpG</i> -spez. Primer (ÜE)
<i>thIA_fw_Bam</i> HI <i>thIA_rv_Kas</i> I	AAAA <b>GGATCC</b> ATGAAAGAAGTTG AAAA <b>GGCGCC</b> CGCACTTTTCTAGCAATATTG	<i>thIA</i> -spez. Primer (ÜE)
<i>hbd_fw_Bam</i> HI <i>hbd_rv_Kas</i> I	AAAA <b>GGATCC</b> ATGAAAAGGTATGTG AAAA <b>GGCGCC</b> TTATTTTGAATAATCGTAG	<i>hbd</i> -spez. Primer (ÜE)
<i>crt_fw_Bam</i> HI <i>crt_rv_Kas</i> I	AAAA <b>GGATCC</b> ATGGAACTAAACAATG AAAA <b>GGCGCC</b> CTATCTATTTTTGAAGCC	<i>crt</i> -spez. Primer (ÜE)
<i>bcd_etfAB_fw_Bam</i> HI <i>bcd_etfAB_rv_Kas</i> I	AAAA <b>GGATCC</b> ATGGATTTTAATTTAACAAG AAAA <b>GGCGCC</b> TTAATTATTAGCAGCTTTAAC	<i>bcd</i> -spez. Primer (ÜE)
pT_fw pT_rv	GGGATAAACTATGGAACCTTATGAAA TGCAAGAATGTGAGAGCTAGAAA	pT-spez. Primer
<i>thIA_fw_Eco</i> RI <i>thIA_fw_Kpn</i> I	AAAA <b>GAATTC</b> ATGAAAGAAGTTG AAAA <b>AGTACC</b> CTAGCACTTTTCTAGC	pASK-IBA3- spez. Primer

## 2.2 Zellanzucht

Alle hitzestabilen Nährmedien bzw. Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden mit Hilfe von Einwegfiltern (Porengröße: 0,2 µm; Sarstedt) steril filtriert.

### 2.2.1 Nährmedien für *C. acetobutylicum*

Die Medienkomponenten wurden, soweit nicht anders vermerkt, in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst und bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration im Medium: 0,0001 % [w/v]) in der Mikrowelle aufgeköcht. Dadurch konnte der gelöste Luftsauerstoff ausgetrieben werden. Einem erneuten Lösen von Sauerstoff wirkte die Begasung mit molekularem Stickstoff entgegen. Nach dem Abkühlen wurden die befüllten Hungate Röhrrchen (OCHS GmbH) und Müller&Krempel-Serumflaschen (MÜLLER & KREMPEL AG) mit gasundurchlässigen Gummistopfen und Edelstahldeckeln luftdicht verschlossen und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Medien, die nach dem Autoklavieren nicht ausreichend anaerob waren, konnte vor der Verwendung niedervalentes Titan (Ti-III-NTA) als Reduktionsmittel bis zum wiederholten Farbumschlag des Redoxindikators zugetropft werden.

#### **CGM (clostridial growth medium)** (WIESENBORN *et al.*, 1988)

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

\* Die Zugabe erfolgte erst direkt vor dem Beimpfen aus einer anaeroben und sterilen Glukosestammlösung (50 % [w/v]).



**MS-MES-Medium (medium synthétique)** (MONOT *et al.*, 1982)

Glukose x H <sub>2</sub> O*	60	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,55	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,55	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,22	g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	11	mg
Acetat (konz.)	2,3	ml
p-Aminobenzoessäure (1,6 g/l)**	5	ml
Biotin (0,02 g/l)**	4	ml
MES	21,3	g
Resazurin (0,1 % [w/v])	1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000
		ml

\* Die Zugabe der Glukose erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums aus einer 50%igen [w/v] sauerstofffreien und sterilen Stammlösung.

\*\* Diese Komponenten wurden vor dem Autoklavieren aus einer sterilen Stammlösung hinzu gegeben.

Der pH-Wert wurde mit NH<sub>4</sub>OH auf 6,6 eingestellt.

**RCA-Medium (reinforced clostridial agar)** (Oxoid GmbH)

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

### 2.2.2 Nährmedien für *E. coli*

Nach Bedarf wurden *E. coli*-Zellen in LB-Flüssigmedium bzw. auf Nähragarplatten bei 37 °C über Nacht angezogen. Falls nötig erfolgte eine Zugabe von Medienzusätzen.

#### **LB-Medium (Luria-Bertani)** (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)

Hefeextrakt	5	g
Trypton	10	g
NaCl	10	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

Für Festmedien wurden vor dem Autoklavieren noch 1,5 % [w/v] Agar-Agar zugesetzt.

### 2.2.3 Medienzusätze

Im Bedarfsfall erfolgte die Zugabe von Medienzusätzen (Tab. 2.5). Alle Zusätze, die nicht in Ethanol gelöst werden konnten, mussten sterilfiltriert werden (Einwegfilter; Porengröße 0,2 µm; Sarstedt). Die Zugabe der Antibiotika zu den Nährmedien erfolgte direkt vor dem Animpfen (Flüssigmedium) oder nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Festmediums unter 50 °C.

Tab. 2.5: Medienzusätze

Medienzusätze	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration im Medium	
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100	µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 96 %igem Ethanol	25	µg/ml
Erythromycin	50 mg/ml in 96 %igem Ethanol	40	µg/ml
IPTG	40 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	40	µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in 96 %igem Ethanol	10	µg/ml
Anhydrotetrazyklin	200 µg/ml in 96 %igem Ethanol	20	µg/ml

### 2.2.4 Herstellung von Titan-(III)-NTA-Lösung

Für die Herstellung von 235 ml einer Titan-(III)-NTA-Lösung (100 mM) wurden 17,19 g Nitrilotriessigsäure (400 mM) in 90 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 60 ml 5 M NaOH gelöst. Um den vorhandenen Sauerstoff in der Lösung zu entfernen, fand eine Durchgasung mit Stickstoff

statt. Unter ständigem Schütteln erfolgte in der Anaeroben-Werkbank die gleichzeitige Zugabe von 19,2 ml einer 15 %igen [w/v]  $\text{TiCl}_3$ -Lösung und 30 ml einer anaeroben  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (2 M). Anschließend wurde die fertige Lösung mit anaerobem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  aufgefüllt und in sterile und anaerobe Müller&Krempel-Serumflaschen steril filtriert.

### **2.3 Stammkulturen und Reinheitskontrolle**

Die Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen erfolgte dadurch, dass 1 ml einer exponentiell wachsenden Kultur mit 500  $\mu\text{l}$  LB-Glycerin-Lösung (Glycerin 60 % [v/v], LB-Medium 40 % [v/v]) gemischt wurde. Die Stammkulturen befinden sich Doppelansatz in der Allgemeinen Laborsammlung bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . Für alle *C. acetobutylicum*-Stämme fand eine Anzucht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  unter anaeroben Bedingungen in MS-MES bis zur Sporulation statt. Die so erzeugten Sporensuspensionen wurden anschließend bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  für mehrere Jahre gelagert und konnten im Bedarfsfall für die Inokulation frischer Zellkulturen verwendet werden. Regelmäßig erfolgte eine Reinheitskontrolle durch Ausplattieren auf Festmedium und eine Untersuchung unter dem Lichtmikroskop.

### **2.4 Statische Kulturen von *C. acetobutylicum***

Die anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* erfolgte anaerob unter abgeschlossener Gasatmosphäre bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in Hungate-Röhrchen oder in 500-ml-Müller&Krempel-Serumflaschen für Wachstumsanalysen. Dabei dienten als Inokulum 0,02 – 0,1 Vol. einer MS-MES-Sporensuspension zum Animpfen einer 10 ml Batch-Kultur. Die Pasteurisierung der Sporensuspension (15 min,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ) diente der Inaktivierung von restlichen vegetativen Zellen und der Aktivierung der Sporen. Nach dem Animpfen fand eine Inkubation bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad statt. Am darauf folgenden Tag konnten diese Vorkulturen zur Inokulation von „Batch“-Kulturen mit unterschiedlichen Volumina (50 ml, 100 ml, 200 ml oder 500 ml) eingesetzt werden. Im Falle eines notwendigen Medienwechsels ließen sich die Komponenten des Komplexmediums CGM durch zwei Passagen in dem jeweils neuen Nährmedium ausdünnen. Vor jeder Probenentnahme mussten die statischen Kulturen

mittels einer sterilen Kanüle entgast werden. Aufgrund des zu erwartenden Druckerstiegs durch die Gasentwicklung während des Wachstumsverlaufes wurden die Müller&Krempel-Serumflaschen nur zu maximal 60 % des Fassungsvermögens gefüllt.

## 2.5 Anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

*C. acetobutylicum* konnte ebenfalls auf RCA-Festmedium (2.2.1) kultiviert werden. Dies erfolgte bei 37 °C in einer Anaeroben-Werkbank unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Zur Reduktion von eingetragendem Sauerstoff wurde eine maximale Konzentration von 5 % [v/v] an Wasserstoff zugegeben. Die Kontrolle der Sauerstoffkonzentration erfolgte regelmäßig mit Indikatorpapier (Anaerobic Indicator BR55, Oxoid).

## 2.6 Bestimmung von physiologischen Parametern

### 2.6.1 Messung der optischen Dichte

Das Wachstum von Bakterienkulturen in klaren Flüssigmedien erfolgte durch die Trübungsbestimmung der Suspension (Optische Dichte [OD] bei 600 nm). Die Beurteilung des Zellwachstums wurde gegen einen Medienleerwert in einem Spektralphotometer (Ultrospec<sup>®</sup> 3000) durchgeführt. Dazu wurden Zellsuspensionsproben in einer Halb-Mikro-Küvette (Sarstedt) mit 1 cm Schichtdicke überführt und ab einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> ≥ 0,3 mussten die Zellsuspensionen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt und gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> als Leerwert vermessen werden.

### 2.6.2 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Wachstumsrate ( $\mu$ ) gibt massenabhängige Verdopplungen pro Stunde (h<sup>-1</sup>) an:

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log e \cdot (t_2 - t_1)}$$

**Gl. 2.1: Bestimmung der Wachstumsrate.**  $x_{1/2}$  = Messwert zu den Zeitpunkten 1 u. 2,  $t_{1/2}$  = Messwert zu den Zeitpunkten 1 u. 2,  $\log e = 0,43429$

### 2.6.3 Bestimmung des pH-Werts

Die Bestimmung des pH-Werts erfolgte extern in wässrigen Lösungen mit einem pH-Meter (ATCC 824W pH 526). Um Verunreinigungen des Diaphragmas der Elektrode zu vermeiden, erfolgte eine Zentrifugation ( $13.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 5 min) der Zellsuspension.

### 2.6.4 Bestimmung der gebildeten Gesamtgasmenge (HÖNICKE, 2009)

Um die gebildete Gasmenge während einer Batch-Kultur zu bestimmen, wurden 1000 ml Glaszylinder verwendet. Die 100-ml-Batch-Kulturen waren über einen Schlauch mit den wassergefüllten Glaszylindern verbunden. Das während des Wachstumsverlaufes produzierte Gas konnte somit über den Schlauch in den Glaszylinder strömen und das entsprechende Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  verdrängen. Das Verdrängte  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  wurde in Erlenmeyerkolben aufgefangen und zu bestimmten Zeitpunkten mit Hilfe eines Messzylinders bestimmt.



**Abb. 2.1: Modifizierte 1000-ml-Glaszylinder zur Bestimmung der Gesamtgasmenge.** Die aus vier modifizierten 1000-ml-Zylindern bestehende Gasmessapparatur wurde über Schläuche mit den 100-ml-Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* verbunden. Die Inkubation der Kulturen erfolgte im Wasserbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  (aus UHLIG, 2011).

### 2.6.5 Glukosebestimmung

Zur Messung des Glukoseverbrauchs während des Wachstumsverlaufs von *C. acetobutylicum* diente ein optisch-enzymatischer Test. Das Testprinzip basiert darauf, dass die Glukose mit Hilfe des Enzyms Hexokinase (EC 2.7.1.1) unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-Phosphat und ADP umgewandelt wird. Das entstandene Glukose-6-Phosphat wird anschließend durch das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) unter NADP<sup>+</sup>-Verbrauch zu 6-Phospho-D-Glukonat und NADPH umgesetzt. Die gebildete NADPH-Menge ist dabei direkt proportional zur Glukosemenge und kann photometrisch durch Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden.

$$c_{Glukose} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot MW_{Glukose}}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot VF \quad \left[ \frac{mg}{l} \right]$$

**Gl. 2.2: Berechnung der Glukosekonzentration.** c=Konzentration; V=Volumen des Ansatzes; v=Volumen der Probe; ΔE=Extinktionsänderung; ε<sub>340</sub>=Extinktionskoeffizient = 6,3 l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>; d=Schichtdicke der Küvette (1cm); MW=Molekulargewicht (198,17 g/mol)

Für die Glukosebestimmung mussten während des Wachstumsversuchs kontinuierlich Proben genommen und diese in 2-ml-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4 °C) werden. Danach erfolgte ein Dekantieren des klaren Überstands in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß mit anschließender Lagerung bei -20 °C. Für die optisch-enzymatische Bestimmung der Glukosemenge wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 10 µl Probe zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Sowohl die Messung des Blindwerts gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> als auch die Messung der Leerwerte erfolgten bei 340 nm. Anschließend wurden 10 µl Enzymgemisch (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Roche) zugegeben und die Ansätze für 5 min bei RT inkubiert. Die abschließende Bestimmung der Extinktionsänderung fand ebenfalls bei einer OD von 340 nm statt.

#### Reaktionsansatz

Reaktionspuffer	900	ml
NADP <sup>+</sup> (44 mg/ml)	10	µl
ATP (96 mg/ml)	10	µl
Probe	10	µl

Die NADP<sup>+</sup>- und ATP-Lösung wurde frisch in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt.

**Reaktionspuffer**

Tris		6	g
MgSO <sub>4</sub>		0,12	g
anaerobes H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	250	ml

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt.

**2.6.6 Laktatbestimmung**

Die Bestimmung des während des Wachstums von *C. acetobutylicum* produzierten Laktats wurde mit Hilfe des Kits „D-Lactic Acid (D-Lactate) and L-Lactic Acid (L-Lactate)“ von Megazyme International durchgeführt. Zur Quantifizierung von D-Laktat bzw. L-Laktat sind zwei Enzymreaktionen notwendig. In der ersten Reaktion wird das vorhandene D-Laktat bzw. L-Laktat durch eine D-Laktatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) bzw. L-Laktatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) in Anwesenheit von NAD<sup>+</sup> zu Pyruvat oxidiert. In der zweiten Reaktion wird das entstandene Pyruvat durch das Enzym D-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2) zu D-Alanin und 2-Oxoglutarat umgewandelt, womit einer Rückreaktion zum Laktat entgegengewirkt wird. Die gebildete Menge an NADH ist direkt proportional zur Laktatmenge und kann photometrisch durch Bestimmung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm nachgewiesen werden. Die Berechnung der Laktatmenge erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$c_{Laktat} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot MW_{Laktat}}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot VF \quad \left[ \frac{mg}{l} \right]$$

**Gl. 2.2: Berechnung der Glukosekonzentration.** c=Konzentration; V=Volumen des Ansatzes; v=Volumen der Probe; ΔE=Extinktionsänderung; ε<sub>340</sub>=Extinktionskoeffizient = 6,3 l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>; d=Schichtdicke der Küvette (1cm); MW=Molekulargewicht (90,1 g/mol)

Für die Laktatbestimmung mussten während des Wachstumsversuchs kontinuierlich Proben genommen und diese in 2-ml-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4 °C) werden. Danach erfolgte ein Dekantieren des klaren Überstands in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß mit anschließender Lagerung bei -20 °C. Für die optisch-enzymatische

Bestimmung der Laktatmenge wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 50  $\mu\text{l}$  Probe zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Sowohl die Messung des Blindwerts gegen  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  als auch die Messung der Leerwerte erfolgten bei 340 nm. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  Enzymgemisch (D-Laktatdehydrogenase bzw. L-Laktatdehydrogenase) zugegeben und die Ansätze für 10 min bei RT inkubiert. Die abschließende Bestimmung der Extinktionsänderung fand ebenfalls bei einer OD von 340 nm statt.

### **Reaktionsansatz**

$\text{H}_2\text{O}_{dest.}$	750	ml
Glycylglycin Puffer	250	$\mu\text{l}$
$\text{NAD}^+$	50	$\mu\text{l}$
D-GTP	10	$\mu\text{l}$
Probe	50	$\mu\text{l}$

### **2.6.7 Gaschromatographische Analyse flüssiger Gärungsprodukte**

Die Analyse und Quantifizierung flüssiger Gärungsprodukte (Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol und Butanol) erfolgte nach THORMANN *et al.* (2002) mit einem Gaschromatographen (Agilent Technologies, 7890A GC-System, SIM GmbH) unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID).  $\text{N}_2$  diente als Trägergas, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Dadurch konnten neben Feuchtigkeit und Sauerstoffresten 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 Chromosorb 101 (80-100 mesh) fertiggerpackten Säule ermöglichte die gleichzeitige Analyse von geringkettigen C-Verbindungen wie den Alkoholen Butanol, Ethanol und Aceton und den Carbonsäuren Acetat und Butyrat.

#### **2.6.7.1 Probenvorbereitung**

Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C) und 100  $\mu\text{l}$  des zellfreien Überstandes in ein Rollrandgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  Wasser (UV-Clear) und 100  $\mu\text{l}$  interner Standard (55 mM Isobutanol und 1,5 M Acetoin in 2 M HCl). Nachdem



das Gefäß mit einer Bördekkappe gasdicht verschlossen wurde, konnten 0,5 µl dieser Probe über einen automatisierten Probengeber zur Analyse in das System injiziert werden.

#### **2.6.7.2 Quantifizierung**

Mit Hilfe einer Eichlösung, die jeweils 5 mM der zu analysierenden Produkte einschließlich des internen Standards Isobutanol enthielt, wurde ein Eichchromatogramm erstellt. Die gesamte GC- und Probengebersteuerung sowie die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm EZ Chrom Elite (Agilent Technologies, SIM GmbH).

#### **2.6.7.3 Analysebedingungen**

Die Substanzen Aceton, Butanol, Isobutanol, Butyrat, Acetat, Ethanol und Acetoin konnten unter folgenden Analysebedingungen detektiert werden:

Chromatographiesäule	:	2 m x 2 mm Chromosorb 101 (80-100 mesh)
Säulentemperatur	:	155-197 °C, 9 °C/min
Trägergas	:	N <sub>2</sub> (30 ml/min)
Injektor	:	195 °C
Detektor	:	FID, 230 °C
Probenvolumen	:	5 µl

### **2.6.8 Gaschromatographische Analyse gasförmiger Gärungsprodukte**

Die Analyse und Quantifizierung gasförmiger Gärungsendprodukte erfolgte mit einem Gaschromatographen (Agilent Technologies, 7820A GC-System, SIM GmbH) unter Verwendung eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors (WLD).

#### **2.6.8.1 Probenvorbereitung**

Um die prozentualen Anteile an Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zu bestimmen, musste eine Eichgerade am Gaschromatographen erstellt werden. Hierfür wurden Eichgase (Westfalen AG) mit 10 % CO<sub>2</sub> (90 % H<sub>2</sub>), 50 % CO<sub>2</sub> (50 % H<sub>2</sub>) und 80 % CO<sub>2</sub> (20 % H<sub>2</sub>) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der gasförmigen Produkte durch manuelles Einspritzen von 100 µl Probe, die aus dem Gasraum über der Kultur genommen wurden.

### 2.6.8.2 Quantifizierung

Mit Hilfe der Eichgeraden konnten die Flächen der jeweiligen gemessenen Produkte aus den Proben mit den prozentualen Anteilen der Eichgase in Bezug gesetzt werden. Die gesamte Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm EZ Chrom Elite (Agilent, Waldbronn).

### 2.6.8.3 Analysebedingungen

Unter folgenden Analysebedingungen konnten die Substanzen Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff detektiert werden:

Chromatographiesäule	:	60 m x 0,53 mm Chromosorb 101 (80-100 mesh)
Säulentemperatur	:	155-197 °C, 9 °C/min
Trärgas	:	N <sub>2</sub> (30 ml/min)
Injektor	:	195 °C
Detektor	:	WLD
Probenvolumen	:	100 µl

### 2.6.9 Butanolstress (*n*-Butanol)

Für die Butanoltoleranz- und Adaptionsexperimente wurden 200 ml CGM (2.2.1) mit 0,1 Vol. [v/v] einer CGM-Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ~1,0 angezogen. Daraufhin wurde die Kultur in 10-ml-Aliquots in sterile und anaerobe Hungates aufgeteilt und mit Butanol (1 Vol% oder 2 Vol%) versetzt. Als Kontrolle diente eine Hungate-Kultur ohne Butanolzugabe. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl anhand von Koloniebildung (colony forming units [CFU]) wurden in regelmäßigen Abständen verschiedene Verdünnungen (10 µl) auf RCA Festmedium (2.2.1) anaerob ausplattiert und für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgezählt.

### 2.6.10 Lichtmikroskopie

Zur Bestimmung der Zellmorphologie von *C. acetobutylicum* wurde ein Phasenkontrastmikroskop (Olympus CHS-Mikroskop) bei einer 400fachen Vergrößerung (Objektiv: A40LP) verwendet.

## 2.7 Nukleinsäure-Standardmethoden

### 2.7.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Bei allen nicht autoklavierbaren Geräten erfolgte eine Sterilisation durch Abflammen oder Behandlung mit 96 %igem [v/v] Ethanol. Weiterhin wurden hitzestabile Geräte und Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen hingegen wurden steril filtriert (Porengröße: 0,2 µm; Sarstedt) und Arbeitsflächen wurden mittels 70 %igem Ethanol [v/v] sterilisiert und anschließend getrocknet.

### 2.7.2 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte aus einer 5-ml-ÜN-Kultur:

1. Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (5.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Suspendieren des Zellpellets in 300 µl Puffer P1, Inkubation auf Eis für 5 min
3. Zugabe von 300 µl Puffer P2, vorsichtiges Schwenken und Inkubation bei RT
4. Zugabe von 300 µl Puffer P3, vorsichtiges Schwenken, erneute Inkubation bei RT für 5 min
5. Zentrifugation: 20 min, 13.000 x g, 4 °C
6. Überführung des Überstands in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß
7. Zentrifugation: 10 min, 13.000 x g, 4 °C
8. Überführung des Überstands in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß unter Zugabe von 0,75 Vol. Isopropanol mit anschließender Durchmischung
9. Zentrifugation: 30 min, 13.000 x g, 4 °C
10. Dekantieren des Überstands
11. Waschen des Pellets mit 550 µl Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
12. Zentrifugation: 10 min, 13.000 x g, 4 °C
13. Dekantieren des Überstands
14. Trocknen des Pellets mit anschließender Aufnahme in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
15. Überprüfung der Qualität der isolierten Plasmid-DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel

**Puffer P1**

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)		10	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)		4	ml
RNase A (10 mg/ml)*		2	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	200	ml

\* Diese Komponente wurde nach dem Autoklavieren zugegeben, die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C (max. 6 Monate).

**Puffer P2**

SDS (10 % [w/v])		10	ml
NaOH (1 M)		2	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml

Der Puffer wurde nicht autoklaviert und bei RT gelagert.

**Puffer P3**

Kaliumacetat		58,88	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml

Zur Einstellung des pH-Werts auf 5,5 diente Eisessig. Nach dem Autoklavieren konnte der Puffer bei RT gelagert werden.

**RNase A-Lösung**

RNase A (Roth)		10	mg
Tris-HCl (pH 7,5)		100	µl
NaCl		2	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1	ml

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

**2.7.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. acetobutylicum***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte anhand des Protokolls von CATONIE & HARRIES:

1. Sedimentation von 2 ml Zellsuspensionen einer 10-ml-ÜN-Kultur (5000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Waschen des Pellets mit 750 µl Waschpuffer mit anschließender Zentrifugation (13000 x g, 2 min, 4 °C)

3. Wiederholung von Schritt 2
4. Waschen des Pellets mit 750 µl SET-Puffer
5. Zentrifugation: 13.000 x g, 2 min, 4 °C
6. Aufnehmen des Pellets in 450 µl SET-Puffer und Zugabe von Lysozym (5 mg/ml) sowie 10 µl RNase A, vorsichtig mischen
7. Inkubation für 25 min bei 37 °C
8. Zugabe von 350 µl alkalischem SDS, mischen durch Invertieren bis die Suspension sich klärt
9. Zugabe von 350 µl Puffer P3 (2.8.2.1) und mischen durch invertieren
10. Zentrifugation: 16.000 x g, 4 °C, 5 min
11. Überführen des Überstands in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß
12. Zugabe von 900 µl eiskaltem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v]) und anschließendes Vortexen für 30 s
13. Zentrifugation: 16.000 x g, 4 °C, 2 min
14. Wiederholen der Punkte 8-10
15. Überführen des Überstands in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß
16. Zugabe von 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) u. anschließendes Vortexen für 30 s
17. Zentrifugation: 16.000 x g, 4 °C, 2 min
18. Überführen des Überstands in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß
19. Zugabe von 1 Vol. eiskaltem Isopropanol, mischen und Inkubation bei -20 °C
20. Zentrifugation: 16.000 x g, 4 °C, 20 min
21. Waschen des Pellets mit 500 µl Ethanol (70 %)
22. Trocknen des Pellets bei 50 °C im Heizblock mit anschließender Aufnahme in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
23. Überprüfung der Qualität der isolierten Plasmid-DNA (2 µl) in einem 0,8 %igen Agarosegel

#### **Waschpuffer**

EDTA (0,5 M, pH 8,0)	200	ml
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	50	ml
KCl (1 M)	125	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

#### **SET-Puffer**

Saccharose 50 % [w/v]	50	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	10	ml
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	5	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100	ml

Die Einstellung des pH-Wert auf 7,5 erfolgte mit HCl. Anschließend wurde der Puffer mittels Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt) steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

**Alkalines SDS**

NaOH (10 M)		20	µl
SDS (20 %)		50	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	µl

**2.7.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum***

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* wurden 10-20 ml Zellkultur aus statischen Kulturen entnommen und die Zellen durch Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C für 5 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde nach Entfernung des Kulturüberstandes dreimal mit 10 ml 1x TAE-Puffer (10 % Saccharose [w/v]) gewaschen und bei Bedarf bei -20 °C gelagert.

Die zur Isolierung notwendigen Teilschritte sind anschließend aufgeführt

(BERTRAM *et al.*, 1989; mod.):

1. Resuspendieren des gefrorenen Zellpellets in 1 ml Waschpuffer
2. Zentrifugation: 5 min, 6.000 x g, 4 °C
3. Verwerfen des Überstands und Wiederholung von Schritt 1-2
4. Suspendieren des Zellpellets in 1 ml Lysispuffer
5. Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (200 mg/ml) und 5 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml)
6. Schwenken des Ansatzes
7. Inkubation: 15 min, 37 °C (Heizblock, Eppendorf)
8. Zugabe von 30 µl SDS-Lösung (20 % [w/v]) und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml)
9. Inkubation: 60 min, 37 °C (Heizblock, Eppendorf)
10. Zugabe von 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (23:24:1 [v/v])
11. Zentrifugation: 10 min, 9.000 x g, 4 °C
12. Abnahme der oberen, wässrigen Phase
13. Zweimalige Wiederholung der Schritte 10-12
14. Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) zur Phenolentfernung
15. Zentrifugation: 5 min, 9.000 x g, 4 °C und Abnahme der oberen, wässrigen Phase
16. Fällung der DNA mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
17. Inkubation: 5 min bei RT
18. Zentrifugation: 15 min, 6.000 x g, 4 °C
19. Dekantieren des Überstands und Trocknen des Pellets, anschließende Aufnahme in 60 µl TE-Puffer
20. Zugabe von 30 µl RNase A (10 mg/ml)
21. Inkubation: 15 min, 37 °C
22. Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml)
23. Inkubation: über Nacht, 37 °C
24. Erhöhung des Volumens mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 400 µl
25. Zugabe von 60 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2)

26. Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Schritt 10.-12.)
27. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol
28. Fällung der DNA mit 1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst)
29. Zentrifugation: 15 min, 16.000 x g, 4 °C
30. Zweimaliges Waschen des Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst)
31. Zentrifugation: 15 min, 6.000 x g, 4 °C
32. Aufnahme des Pellets in 50 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
33. Überprüfung der Qualität der isolierten chromosomalen DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel

**Waschpuffer**

EDTA (0,5 M, pH 8,0)		80	ml
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)		20	ml
KCl (1 M)		50	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	400	ml

**Lysispuffer**

NaCl (5 M)		4	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)		20	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	200	ml

Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 erfolgte mit HCl.

**Lysozymbilösung**

Lysozym		400	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1	ml

Die Lysozym-Lösung wurde für jede Isolation frisch angesetzt.

**RNase A-Lösung**

RNase A		10	mg
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)		100	µl
NaCl		9	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1	ml

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

**20 % [w/v] SDS-Lösung**

SDS		10	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	50	ml

**TE-Puffer**

EDTA (0,5 M, pH 8,0)		10	ml
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)		2	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml

Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl auf 8,0 eingestellt.

**Proteinase K-Lösung**

Proteinase K		20	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1	ml

Die Proteinase K-Lösung wurde für jede Isolation frisch angesetzt.

**2.7.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren****2.7.3.1 Natriumacetatfällung**

Nukleinsäuren konnten durch die Natriumacetatfällung aufkonzentriert und gereinigt werden, dabei wurde nach dem Protokoll von SAMBROOK & RUSSEL, 2001 gearbeitet:

1. Volumenerhöhung auf 300 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
2. Zugabe von 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2)
3. Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt)
4. Inkubation für 30 min bei -70 °C
5. Zentrifugation: 20 min, 13.000 x g, 4 °C
6. Abnehmen des Überstands
7. Waschen des Nukleinsäure-Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
8. Zentrifugation: 5 min, 13.000 x g, 4 °C
9. Trocknen des Pellets und anschließende Aufnahme in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
10. Überprüfung der Qualität der aufkonzentrierten und aufgereinigten DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel

**2.7.3.2 Ammoniumacetatfällung**

Um PCR-Produkte von Salzen und Oligonukleotiden zu reinigen, wurde die Methode der Ammoniumacetatfällung nach SAMBROOK & RUSSEL, 2001 verwendet.

1. Zugabe von 1 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M, pH 7,5)
2. Zugabe von 2,5 bis 3 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst, eiskalt)
3. Inkubation bei -70 °C für 10 min
4. Zentrifugation: 30 min, 16.000 x g, 4 °C
5. Verwerfen des Überstands
6. zweimaliges Waschen des Pellets mit 500 µl Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt)
7. Trocknen des Pellets und Aufnahme in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
8. Überprüfung der Qualität der aufgereinigten DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel



### **2.7.3.3 Isopropanolfällung**

Diese Methode wurde vor allem bei der Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* verwendet. Dabei wurden zur vorhandenen DNA-Lösung 0,8 Vol. Isopropanol hinzugegeben. Daran schloss sich ein Mischen durch Vortexen und eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 x g; 4 °C an. Nach Abnahme des Überstands erfolgte ein Waschen des Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst, eiskalt). Das getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen.

### **2.7.3.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von DNA (PCR-Produkte, Vektor-DNA) aus Agarosegelen wurden das „peqGOLD Gel Extraction Kit“ (peqLab, Erlangen) verwendet. Die mittels Gelelektrophorese in einem 0,8-2 % Agarosegel aufgetrennten DNA-Banden konnten nach dem Färben im Ethidiumbromidbad unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Nach Angaben des Herstellers folgte anschließend eine DNA-Extraktion. In einem Kontrollgel konnte abschließend die erfolgreiche Isolierung mittels Gelelektrophorese überprüft werden.

## **2.7.4 Agarosegelelektrophorese**

### **2.7.4.1 Standard-Gelelektrophorese (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)**

Horizontale Agarosegelelektrophoresen dienen zur analytischen Auftrennung von DNA. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden Agarose-Mini-Kammern (Wathman, Biometra, Göttingen) verwendet. Die eingesetzte Agarosekonzentration von 0,8 % bis 2,0 % in 1x TAE variierte dabei in Abhängigkeit von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt, um ein möglichst vollständiges Einsinken in die Taschen und eine Markierung der Lauffront zu gewährleisten. Für die Bestimmung der Größe der Gen-Fragmente wurden die Längenstandards der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) genutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70-90 V (Power Pack P 25; Biometra), wobei 1x TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet wurde. Anschließend wurde das Agarosegel 15-45 min im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H<sub>2</sub>O) inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren und absorbiert UV-Licht. Diese Eigenschaften ermöglichten die Visualisierung und Dokumentierung bei Licht einer Wellenlänge von 254 nm in einer Photodokumentationsanlage.

**50x TAE-Puffer**

Tris		20	mg
Eisessig		57	ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)		100	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml

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

**2.7.4.2 Größenbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Größenbestimmung wurde folgender Längenstandard der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet:

<b>GeneRuler™</b>
<b>1 kb DNA</b>
<b>Ladder plus</b>
<b>[Bp]</b>
10000
8000
<b>6000</b>
5000
4000
3500
<b>3000</b>
2500
2000
1500
<b>1000</b>
750
500
250

**Abb. 2.2: Nukleinsäure-Längenstandard**

**2.7.5 Enzymatische Modifikationen von DNA****2.7.5.1 Restriktion von DNA**

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Fermentas; St. Leon-Rot) verwendet, die sequenzspezifisch Nukleinsäuren schneiden. Hierbei konnten linearisierte DNA-Fragmente mit spezifischen Enden erzeugt werden. Die entstandenen DNA-Fragmente konnten mittels Agarosegelelektrophorese (2.7.4) analysiert oder für eine Ligation (2.7.5.3) verwendet werden. Die Restriktion wurde mit dem empfohlenen Puffer des Herstellers und

mindestens einem Volumen von 10 µl für die Restriktion von 1 µg DNA durchgeführt. Die Restriktion von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgt in der Regel für 2-14 h, im Falle von chromosomaler DNA für bis zu 24 h bei 37 °C. Bei Kontrollrestriktionen (10 µl) wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x Loading Dye beendet, andernfalls konnte die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (20 min, 80 °C) gestoppt werden (gemäß den Herstellerangaben). Die verwendeten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen und Puffer sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen.

**Tab. 2.6: Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Puffersystem
<i>Bam</i> HI	5`-G <sup>^</sup> GATCC-3' 3'-CCTAG <sup>^</sup> G-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>
<i>Bcl</i> I	5`-T <sup>^</sup> GATCA-3' 3'-ACTAG <sup>^</sup> T-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>
<i>Eco</i> RI	5`-G <sup>^</sup> AATTC-3' 3'-CTTAA <sup>^</sup> G-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>
<i>Fnu</i> 4HI	5`-GC <sup>^</sup> NGC-3' 3'-CGN <sup>^</sup> CG-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>
<i>Kpn</i> I	5`-G <sup>^</sup> GATCC-3' 3'-CCTAG <sup>^</sup> G-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>
<i>Sac</i> I	5`-GAGCT <sup>^</sup> C-3' 3'-C <sup>^</sup> TCGAG-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>
<i>Kas</i> I ( <i>Ssp</i> DI)	5`-GGTAC <sup>^</sup> C-3' 3'-C <sup>^</sup> CATGG-5'	1-fach Tango <sup>TM</sup>

#### 2.7.5.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Verhinderung einer Selbstligation von linearisierten Vektoren konnte eine Dephosphorylierung durchgeführt werden (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Zu einem Ansatz mit 10 µg linearisierter Vektor-DNA wurden 1 U/µl „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP, Fermentas, St. Leon-Rot) und 1x SAP-Puffer (10x konzentriert) gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Dephosphorylierung erfolgte durch eine Hitzebehandlung bei 80 °C für 10 min. Eine anschließende Natriumacetatfällung (2.7.3.1) wirkte einer eventuellen Restaktivität der SAP entgegen.

#### 2.7.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationen wurden mit Hilfe des „Rapid DNA Ligation Kit“ von Fermentas, St. Leon-Rot durchgeführt. Um eine optimale Ligationseffizienz vorliegen zu haben, wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 eingesetzt. Das Standardvolumen der Ligation

(5 U/ $\mu$ l) betrug 20  $\mu$ l, wobei die T<sub>4</sub>-DNA-Ligase mit einer Konzentration von 5 U/ $\mu$ l im entsprechenden Reaktionspuffer verwendet wurde. In einem nächsten Schritt erfolgte eine Hitzeinaktivierung der T<sub>4</sub>-DNA-Ligase zur Erhöhung der Transformationseffizienz bei 65 °C für 20 min. Die Ligationen erfolgten für 5 min bei 22 °C. Anschließend konnten sie direkt für die Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt werden (2.8.1.3).

### **2.7.6 In vitro Amplifikation von DNA mittels PCR**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde gezielt eingesetzt, um Fragmente für Klonierungen zu gewinnen. Die Amplifikation fand in PCR-Cyclern mit Deckelbeheizung (PCR-Cycler, Biozym) statt.

#### **2.7.6.1 Primerdesign**

Zur Klonierung spezifischer Gene wurden Primer aus der Sequenz des annotierten Genoms von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (NÖLLING *et al.*, 2001) abgeleitet. Hierbei wurde beachtet, dass sich am 5'- und 3'-Ende des Amplifikats die Restriktionsstellen befanden, die eine spätere Klonierung der PCR-Fragmente in den entsprechenden Vektor gewährleisten. Bei den Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) der Primer eines Paares wurde darauf geachtet, dass sie nicht mehr als 1-3 °C voneinander abweichen, um während des Annealings nahezu gleichartige Bedingungen zu schaffen. Nach der Formel von CHESTER & MARSHAK (1993) wurden die Schmelztemperaturen der Primer berechnet

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

**Gl. 2.3: Bestimmung der Schmelztemperatur;** GC%= prozentualen Anteil an Guanin und Cytosin in der Oligonukleotidsequenz; L=Länge der Sequenz.

**2.7.6.2 Standard-PCR**

Für Standard-PCRs wurde die *Pwo*-Polymerase von peqLab genutzt. Aufgrund ihrer 3`-5`-Proofreading-Exonukleaseaktivität konnte eine Amplifikation mit einer 10-mal geringeren Fehlerrate (ca.  $10^{-6}$ /Base) als mit der Taq-Polymerase durchgeführt werden.

**Standard-PCR**

Template DNA		10	ng
dNTP-Gemisch (10 mM)		1	μl
10x Pwo-Puffer (complete)		5	μl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)		2	μl
Primer (10 μM)	je	2	μl
<i>Pwo</i> -Polymerase (1 U/μl)	1 μl	1	μl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	50	μl

\* Template DNA: isolierte chromosomale DNA aus *C. acetobutylicum* (2.7.2.3) oder DNA für eine sog. „Colony PCR“. Hierfür wird eine Kolonie vom Festmedium (2.2.1) in 50 μl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> abgeimpft und für 5 min. bei 100 °C aufgekocht. 10 ng dienen als Template DNA für eine PCR.

**Reaktionsschema**

Denaturierung	94 °C	2	min	
Denaturierung	94 °C	30	s	
Annealing	48 °C	1	min	} 10 x
Amplifikation	72 °C	1	min/kBp Fragment	
Denaturierung	94 °C	30	s	
Annealing	51 °C	1	min	} 20 x
Amplifikation	72 °C	1	min/kBp Fragment	
Abschlussynthese	72 °C	5	min	
Lagerung	4 °C	∞	unendlich	

Nach erfolgreicher Amplifikation wurden alle PCR-Ansätze bei -20 °C gelagert. Die Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation erfolgte mittels der Agarosegelelektrophorese (2.7.4).

## 2.8 Erzeugung rekombinanter Organismen

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

#### 2.8.1.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation müssen *E. coli*-Zellen zuerst in einen Zustand versetzt werden, der es ihnen ermöglicht, von außen zugefügte Fremd-DNA aufzunehmen (kompetente Zellen). Bei der Methode nach HANAHAN (1983; mod.) wurde die Kompetenz durch eine CaCl<sub>2</sub>-Behandlung erzeugt.

1. Ausstreichen des *E. coli*-Akzeptorstammes aus der -70 °C Stammkultur auf LB-Agar und Anzucht über Nacht bei 37 °C.
2. Überimpfen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium und Inkubation über Nacht bei 37 °C und 250 Upm.
3. Animpfen von 100 ml Hauptkultur mit 1 ml der Vorkultur. Inkubation bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD600~ 0,5.
4. Abkühlen auf Eis und Sedimentation der Zellen bei 4.000 x g für 5 min und 4 °C
5. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und Suspendieren der Zellen in 30 ml kaltem TFB 1 Puffer. Inkubation der Suspension für 90 min auf Eis
6. Zentrifugation für 5 min bei 4.000 x g und 4 °C.
7. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und Suspendieren der Zellen in 4 ml TFB 2 Puffer und anschließende Aliquotierung von jeweils 200 µl in sterile Reaktionsgefäße. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### TFB1-Puffer

RbCl		4,84	g
MnCl <sub>2</sub>		3,96	g
Ka-Acetat		1,18	g
CaCl <sub>2</sub>		0,59	g
Glycerin (86 % [v/v])		70	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	400	ml

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt, anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

#### TFB2-Puffer

MOPS		0,42	g
RbCl		0,24	g
CaCl <sub>2</sub>		2,21	g
Glycerin (86 % [v/v])		35	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	200	ml

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt, anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

### 2.8.1.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Elektrokompente Zellen werden für die Transformation von Plasmiden eingesetzt.

1. Ausstreichen des *E. coli*-Akzeptorstammes aus der -70 °C Stammkultur auf LB-Agar und Anzucht über Nacht bei 37 °C.
2. Überimpfen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium und Inkubation über Nacht bei 37 °C und 250 Upm.
3. Animpfen von 250 ml LB-Hauptkultur mit 5 ml der Vorkultur. Inkubation bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub>~ 0,5-1,0.
4. Abkühlen auf Eis (15-30 min) und Sedimentation der Zellen bei 4.000 x g für 5 min und 4 °C
5. Zweimaliges Waschen des Zellpellets mit kaltem H<sub>2</sub>Odest. und mit 10 % (v/v) Glycerinlösung. Zentrifugation für 10 min bei 9.000 x g, 4 °C.
6. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und Suspendieren der Zellen in 10 ml Glycerinlösung und anschließende Aliquotierung von jeweils 40 µl in sterile Reaktionsgefäße. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### Glycerinlösung (10 %)

Glycerin (86 % [v/v])		10	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml

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

Zur Herstellung von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen wurde das Protokoll von HANAHAN (1983 mod.) verwendet. Der Vorteil der chemischen Transformation liegt darin, dass die kompetenten Zellen relativ unempfindlich gegen hohe Salzkonzentrationen im Ligationsansatz sind. Die Transformation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Auftauen der CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen auf Eis
2. Zugabe des Ligationsansatz (20 µl) zu den kompetenten Zellen
3. Inkubation des Transformationsansatzes für 20 min auf Eis
4. Inkubation: 42 °C, 90 s (Hitzeschock)
5. Zugabe von 500 µl LB-Medium
6. Inkubation: 60 min, 37 °C, 500 Upm (Thermomixer 5436, Eppendorf)
7. Ausplattieren von 20, 50 und 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar mit den benötigten Medienzusätzen (2.2.3)
8. Inkubation über Nacht bei 37 °C

Die erfolgreiche Transformation wurde durch Überimpfen einer Einzelkolonie in 5-ml-Kulturen und anschließender Plasmid-Minipräparation (2.7.2.1) überprüft.

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

Als standardisierte Methode zur Transformation von *E. coli*-Zellen mit der Plasmid-DNA wurde die Elektroporation genutzt (DOWER et al., 1988). Die Elektroporation erfolgte in einem Gene PulserTMII (Biorad Laboratories GmbH, München).

1. Vorkühlen der Elektroporationsküvette für 1 h (0,2 cm Elektrodenabstand) bei -20 °C, anschließende Lagerung auf Eis
2. Auftauen elektrokompetenter Zellen auf Eis
3. Zugabe von 38 µl kompetenten Zellen zu 2 µl Plasmidsuspension
4. Elektroporation: 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV (Zeitkonstante 4,5 – 5,2 ms)
5. Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium
6. Inkubation: 60 min, 37 °C
7. Ausplattieren von 20, 50, 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar mit entsprechenden Medienzusätzen (2.2.3)

Eine erfolgreiche Transformation wurde durch Abimpfen einer Einzelkolonie und einer folgenden Plasmid-Minipräparation (2.7.2.1) bestätigt.

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

Die Transformation von *C. acetobutylicum* erfolgte nach (MERMELSTEIN & PAPOUTSAKIS, 1993). Für die Transformation wurden die *in vivo* methylierten Plasmide durch die Elektroporation in einem GenePulserTMII (Bio-Rad Laboratories, München) unter anaeroben Bedingungen in *C. acetobutylicum* transformiert. Zunächst wurde eine 50 ml Hauptkultur mit 5-10 ml einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie folgt (auf Eis) behandelt:

1. Inkubation für 30 min auf Eis
2. Zentrifugation: 5 min, 5.000 Upm, 4 °C (3K30, Rotor 12150)
3. Aufnahme des Zellpellets in 10 ml Elektroporationspuffer (vorgekühlt bei 4 °C)
4. Zentrifugation: 5 min, 5.000 Upm, 4 °C
5. Aufnahme des Zellpellets in 2 ml Elektroporationspuffer
6. Überführung von 25 µl Plasmid-DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand)
7. Zugabe von 350 µl resuspendierten *C. acetobutylicum*-Zellen
8. Inkubation der Küvette für 5 min auf Eis
9. Elektroporation bei einer Kapazität von 50 µF, bei einem Widerstand von 600 Ω und einer Spannung von 1,8 kV (Zeitkonstante: 14,8-29,4 ms)
10. Inkubation der Zellen für 3-4 h in 800 µl vorgewärmtem (37 °C) CGM-Medium
11. Ausplattieren von 100 µl und 200 µl Zellsuspension sowie Auftropfen von bis zu 500 µl auf RCA-Agar mit Erythromycin (40 µg/ml)
12. Inkubation anaerob für mindestens 48 h bei 37 °C



**Elektroporationspuffer**

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

**2.9 Arbeiten mit Proteinen****2.9.1 Gesamtproteingewinnung aus *E. coli***

Zur Gewinnung des Gesamtproteingehalts aus *E. coli*-Überexpressionsstämmen wurden 5 ml LB-Medium (mit Medienzusätzen: 2.2.3) mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die so entstandenen Vorkulturen konnten nun zum Animpfen einer Hauptkultur mit einem Volumen von 200-500 ml verwendet werden. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> ~0,6 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG (24 mg/ml) oder bei *E. coli* mit *pASK-IBA3* Vektoren durch 20 µg/ml Anhydrotetrazyklin (DEGENKOLB *et al.*, 1991). Anschließend wurden die induzierten Kulturen über Nacht bei 20 °C; 180 Upm inkubiert und am nächsten Tag erfolgte der Zellaufschluss mit dem 10x BugBuster® Protein Extraction Reagent von Novagen®. Die Zellen wurden in dem Reagenz nach dem vorgegebenen Protokoll mit dem jeweils benötigten Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min bei RT und die Zelltrümmer konnten zuletzt bei 13000 x g; 30 min bei 4 °C abzentrifugiert werden. In dem Zellüberstand war das lösliche Gesamtproteinextrakt von *E. coli* enthalten.

**2.9.2 Gesamtproteingewinnung aus *C. acetobutylicum***

Für die Gewinnung löslicher Gesamtproteinextrakte aus *C. acetobutylicum*-Kulturen wurde 10 ml CGM-Medium (bei Bedarf mit 40 µg/ml Erythromycin) mit einer Sporensuspension inokuliert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Vorkultur diente als Inokulum für eine 200 ml CGM-Hauptkultur und nach weiteren 24 h Inkubation erfolgte die Zellernte (20 min, 13000 x g, 4 °C; Biofuge 28 RS, Rotor 3746). Das Zellpellet wurde daraufhin in 2 ml Aufschlusspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10 mM EDTA, 5 mM PMSF) aufgenommen und sofort unter Kühlung 6 Mal für je 3 min bei einer Intensität von 30 W und einer Frequenz von

20 kHz mit einem Ultraschallgerät (Ultraschall Homogenisator Sonopuls HD60) 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 (2.9.3.2) bestimmt.

### 2.9.3 Protein-Standardmethoden

#### 2.9.3.1 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA Agarose

Die Methode der Affinitätschromatographie mittels Nickel-NTA (Ni-NTA) Agarose (Quiagen, Düsseldorf) diente der nativen Aufreinigung von 6xHis-Tag-Fusionsproteinen. Die Anzucht der Überexpressionsstämme und die darauf folgende Isolierung des Gesamtproteins erfolgten wie unter 2.9.1 beschrieben. Bei der anschließenden Aufreinigung wie folgt vorgegangen:

1. Dekantieren des klaren Überstands aus 2.9.1 in ein 15-ml-Becherglas
2. Zugabe von 1 ml 50 % (w/v) Nickel-NTA Agarose zu 4 ml Überstand
3. Inkubation des Ansatzes für 60 min bei 4°C und 200 Upm
4. Befüllen einer leeren Säule (Poly-Prep, Chromatography Columns, BioRad)
5. 2-maliges Waschen mit 4 ml Waschpuffer
6. Elution des Proteins mit 4 x 0,5 ml Elutionspuffer

Alle Fraktionen wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen und bis zu einer Proteinbestimmung nach BRADFORD (2.9.3.2) oder einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.9.3.3) bei 4 °C gelagert.

#### Waschpuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (50 mM)	6,9	g
NaCl (300 mM)	17,54	g
Imidazol (20 mM)	1,36	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf 8,0

#### Elutionspuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (50 mM)	6,9	g
NaCl (300 mM)	17,54	g
Imidazol (250 mM)	17	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf 8,0

**2.9.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmung (BRADFORD, 1976; mod.)**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung wurden die aus dem Zellaufschluss (2.9.1) gewonnenen Überstände bzw. die Fraktionen der Affinitätschromatographie falls nötig mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verdünnt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  davon zu 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm (Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg) gegen einen Leerwert (50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  und 1 ml Bradford-Reagenz) in einer Plastikkuvette (Schichtdicke: 1 cm; Sarstedt) bestimmt. Mit Hilfe einer mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichgerade im Bereich von 0-0,15 mg/ml konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben berechnet werden. Alle Proteinbestimmungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

**Bradford-Reagenz**

Serva-Blau G-250		70	mg
Ethanol (96 % [v/v], reinst)		50	ml
$\text{H}_3\text{PO}_4$ (85 % [v/v])		100	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad	1000	ml

Die Reagenz wurde filtriert und lichtgeschützt bei RT gelagert.

**2.9.3.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970; mod.)**

Die eindimensionale Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in Trenngelen mit einem Acrylamidgehalt von 12 % (v/v) und Sammelgelen mit 4% Acrylamid (v/v).

**4x Trenngelpuffer**

Tris-HCl (pH 8,8)		18,2	g
SDS (20 % [w/v])		2	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad	100	ml

**4x Sammelgelpuffer**

Tris-HCl (pH 8,8)		6,06	g
SDS (20 % [w/v])		2	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad	100	ml

**10x SDS-Laufpuffer**

Tris		30	g
Glycin		144	g
SDS		10	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml

**Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)**

Ammoniumpersulfat (w/v) 10 %

**SDS-Probenpuffer**

SDS		4,6	g
Bromphenolblau		0,2	g
Glycin		20	ml
DTE		4	ml
Tris-HCl (pH 6,8)		12,5	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	50	ml

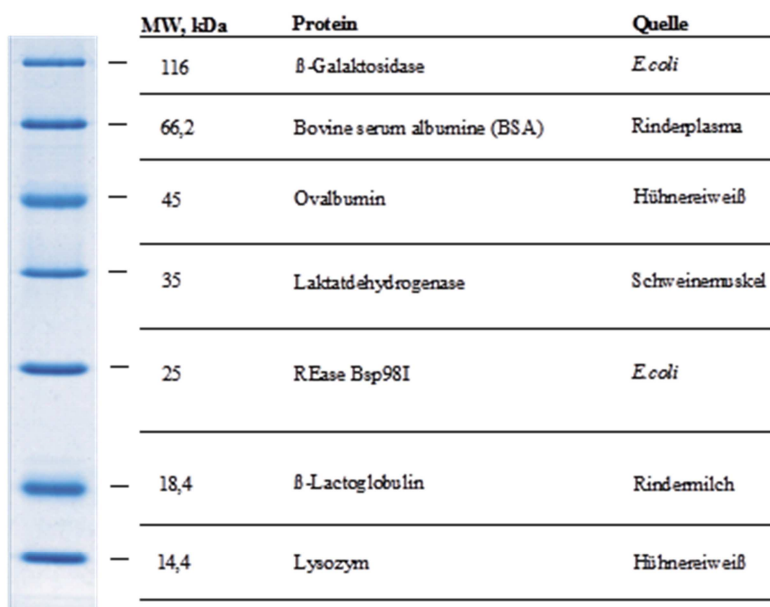
Die Lagerung des Puffers erfolgte in 2 ml Aliquots bei -20 °C.

**Tab. 2.7: Zusammensetzung von SDS-Page-Gelen**

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

Zuerst wurde die Trenngellösung nach dem oben aufgeführten Schema zusammen pipettiert und direkt nach der Zugabe des TEMED kurz geschwenkt und zwischen die zusammengesetzten Gelplatten gegossen. Anschließend erfolgte eine Überschichtung des Gels mit Isopropanol, um eine gerade Gelkante zu gewährleisten. Nach einer 30 minütigen Inkubation war das Gel polymerisiert, das Isopropanol konnte dekantiert und das Sammelgel darüber gegossen werden. Zur Bildung der Taschen wurde sofort nach dem Gießen der Kamm in die noch flüssige Sammelgellösung gesetzt. Die SDS-PAGE erfolgte in Mini-

Gelelektrophoresekkammern (Biometra, Göttingen), welche mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt waren. Die Proteinproben wurden zuvor mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99 °C denaturiert. Die Proteinauftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10 mA pro Gel bis die Lauffront das Ende des Sammelgels erreicht hatte. Daraufhin wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Wenn die Lauffront das Gelende erreicht hatte, wurden die Gele mittels kolloidalem Coomassie gefärbt (2.9.3.4). Zur Größenabschätzung von Proteinen in der SDS-PAGE dienten 5 µl eines Proteinmarkers (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, St. Leon-Rot).



**Abb. 2.3: SDS-Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, MBI Fermentas).**  
Quelle: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/marksm0431.htm>, 17.02.2012. (Bearbeitet mit PhotoImpact®X3)

#### 2.9.3.4 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie diente der Färbung von Proteingelen. Mit dieser Methode konnten schon geringe Proteinmengen von bis > 10 ng detektiert werden. Dazu wurden die SDS-Polyacrylamidgel für mindestens 60 min in der Fixierlösung geschwenkt und danach erfolgte eine Färbung der Gele mittels Kolloidaler Coomassie-Färbelösung für 24 h bei RT unter ständigem Schütteln. Das Entfärben der SDS-Polyacrylamidgele fand ebenfalls unter Schwenken in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> statt, bis sich der Hintergrund ausreichend entfärbt hatte.

**Kolloidale Coomassie-Färbelösung**

Ortho-Phosphorsäure (85 % [v/v])	23,5	ml
Ammoniumsulfat	100	g
Coomassie Stammlösung	20	ml
Methanol (96 %, reinst)	200	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

**Stammlösung Coomassie**

Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva)	50	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

**Fixierlösung**

Essigsäure	100	ml
Ethanol (96 % [v/v], reinst)	520	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000	ml

## 2.10 Enzymassays

### 2.10.1 Thiolase-Assay (HARTMANIS & GATENBECK, 1984)

Der Assay nach HARTMANIS und GATENBECK (1984) bestimmt die Thiolaseaktivität [(Acetyl-CoA : Acetyl-CoA C-Acetyltransferase, EC 2.3.1.9)], indem die Spaltung des CoA-abhängigen Acetoacetats aerob bei 303 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000) bei 20 °C gemessen wird. Die Messung der Thiolaseaktivität erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Zentrifugation einer 2-ml-Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (10.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Einsatz des zellfreien Überstandes für den Thiolase-Assay
3. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Präzisions-Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke:

Puffer (100 mM Tris-HCl, 1mM DTT, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,0)	450	µl
Acetoacetyl CoA (10 mM)	2,5	µl
CoA (10 mM)	10	µl
4. Mischen des Ansatzes und Bestimmung der Steigung in einem Photometer (Ultrospec 3000) bei 303 nm
5. Zugabe von 5-10 µl des zellfreien Extrakts (ggf. verdünnen) und erneute Bestimmung der Acetoacetyl CoA-Steigung

$$\text{Spez. Akt. (U/mg)} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot (-1000)}{v \cdot \varepsilon \cdot C_{\text{Protein}}} \cdot VF$$

**Gl. 2.4: Bestimmung der Thiolase-Aktivität.**  $\Delta E$ = Enzymaktivität (Steigung);  $V$ = Volumen des Ansatzes;  $v$ =Volumen der Probe;  $\varepsilon$ = 14000 l \* mmol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>=  $C_{\text{Protein}}$ =Proteinmenge in mg

### 2.10.2 $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay (MADAN *et al.*, 1973)

Um die Aktivität der  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase [(L(+)-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, EC 1.1.1.35)] nachzuweisen, wurde der  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay nach MADAN *et al.* (1973) angewandt. Bei diesem Assay wurde die NADH-Abnahme aerob bei 340 nm photometrisch (Ultrospec®3000, AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) und bei 20 °C wie folgt gemessen:

1. Zentrifugation der 2-ml-Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (10.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Einsatz des zellfreien Überstandes für den  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay
3. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Präzisions-Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke:

Puffer (100 mM MOPS, pH 7,0)	480	µl
NADH (10 mM)	5	µl
Acetoacetyl CoA (10 mM)	5	µl
4. Mischen des Ansatzes, Bestimmung des Nullwerts und starten der Reaktion durch Zugabe von 5 µl zellfreien Extrakts.
5. Photometrische Bestimmung (Ultrospec® 3000, AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) der Steigung bei 263 nm
6. Berechnung der spezifischen Aktivität (2.10.1.1) mit dem Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon = 6220 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.10.3 Crotonase-Assay (HARTMANIS und GATENBECK, 1984)

Die Crotonase-Aktivität (L-3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase, EC 4.2.1.17) wurde nach dem Protokoll von HARTMANIS und GATENBECK (1984) bestimmt. Bei diesem Assay wird die Hydratation der konjugierten Doppelbindungen des Crotonyl-CoAs photometrisch

(Ultrospec<sup>®</sup> 3000, AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) bei 263 nm und RT bestimmt:

1. Zentrifugation einer 2-ml-Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (10.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Einsatz des zellfreien Überstandes für den Crotonase-Assay
3. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Präzisions-Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke:
 

Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,6)	480	µl
Crotonyl CoA (10 mM)	7,5	µl
4. Mischen des Ansatzes, Bestimmung des Nullwerts und starten der Reaktion durch Zugabe von 5-10 µl zellfreien Extrakts.
5. Photometrische Bestimmung (Ultrospec<sup>®</sup> 3000, AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) der Steigung bei 263 nm
6. Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Formel von 2.10.1.1. Anpassung des Extinktionskoeffizienten auf  $\epsilon = 6700 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.10.4 Butyryl-CoA Dehydrogenase-Assay (Li *et al.*, 2008)

Die enzymatischen Assays zur Bestimmung der Butyryl-CoA Dehydrogenase-Aktivität (Butanoyl-CoA:Acceptor 2,3-Oxidoreduktase, EC 1.3.99.2) wurden unter strikt anoxischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde die Butyryl-CoA Dehydrogenase-Aktivität mit Ferricenium Hexafluorophosphat (FcPF6) als artifiziellen Elektronenakzeptor bestimmt (Li *et al.*, 2008).



1. Zentrifugation der Zellsuspension (10.000 x g, 60 min, 4 °C)
2. Einsatz des zellfreien Überstandes für den Butyryl-CoA Dehydrogenase-Assay
3. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Präzisions-Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke:
 

Puffer (100 mM Phosphat, pH 7,0)
Butyryl CoA (0,1 mM)
FcPF6* (0,2 mM)
4. Mischen des Ansatzes, Bestimmung des Nullwerts und starten der Reaktion durch Zugabe von 10 µl zellfreien Extrakts.
5. Photometrische Bestimmung der Steigung bei 300 nm (Das Ergebnis muss mit zwei multipliziert werden, weil während der Umsetzung von Butyryl-CoA zu Crotonyl-CoA zwei Elektronen für die Bildung von 2 Ferrocene zur Verfügung stehen)



6. Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Formel von 2.10.1.1. Anpassung des Extinktionskoeffizienten auf  $\epsilon = 4300 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

\* FcPF6 wurde mit 10 mM HCl auf eine Endkonzentration von 2 mM eingestellt.

Aus technischen Gründen führte die Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biochemie“ - unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Buckel - an der Philipps Universität Marburg die Enzymassays durch.

## 2.10.2 Charakterisierung einer *ThiA*-Mutanten-Bibliothek

### 2.10.2.1 Acetoacetyl-CoA Reduktase Aktivität (HAYWOOD *et al.*, 1988)

Das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* H16 synthetisiert natürlicherweise eine Acetoacetyl-CoA Reduktase. BUDDE *et al.* (2010) stellten ein Plasmid zur Überexpression der Acetoacetyl-CoA Reduktase (*phaB1*; GeneID, 4249784) aus *R. eutropha* H16 her. Das Plasmid pET-15b-*phaB1*, welches die Acetoacetyl-CoA Reduktase zur Expression enthält, besitzt zur Aufreinigung dieses Proteins einen N-terminalen His-tag. pET-15b-*phaB1* wurde von BUDDE *et al.* (2010) heterolog in *E. coli* Turner exprimiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei dem Enzymassay zur Bestimmung der Acetoacetyl-CoA Reduktase Aktivität (EC 1.1.1.36) nach HAYWOOD *et al.* (1988) wurde die NADPH-Abnahme photometrisch (Ultrospec3000) im Rohextrakt (2.9.1) bei 340 nm wie folgt bestimmt:

1. Zentrifugation der 2-ml-Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (10.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Einsatz des zellfreien Überstandes für den Acetoacetyl-CoA Reduktase-Assay
3. Zugabe folgender Komponenten in eine Halb-Mikro-Präzisions-Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke:

Puffer (50 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0)	480	µl
NADPH (10 mM)	10	µl
4. Mischen des Ansatzes, Bestimmung des Nullwerts und starten der Reaktion durch Zugabe von 5-10 µl zellfreien Extrakts.
5. Photometrische Bestimmung (Ultrospec<sup>®</sup> 3000, AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) der Steigung bei 340 nm
6. Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Formel von 2.10.1.1. Anpassung des Extinktionskoeffizienten auf  $\epsilon = 6300 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.10.2.2 Gekoppelter Mikrotiterplatten-*ThIA/phaB*-Assay

Die Aktivitätsbestimmung der Thiolase erfolgte indirekt durch die *phaB*-katalysierte Oxidation von NADPH nach WIESENBORN *et al.* (1988). Hierfür wurden Einzelkolonien aus 2.11 in je 200 µl LB + Amp in 96-Well-Mikrotiterplatten überimpft, bei einer OD<sub>600</sub> ~0,6 mit Anhydrotetrazyklin (20 µg/ml) induziert und über Nacht bei 20 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte das Gesamtprotein der Zellpellets mittels 10x BugBuster® Protein Extraction Reagent (2.9.1) isoliert und für den gekoppelten *ThIA/phaB*-Assay eingesetzt werden:

1. Zentrifugation der Zellsuspension in 96-Well-Mikrotiterplatten (4.000 x g, 30 min, 4 °C)
2. Isolierung des Gesamtproteins (2.9.1)
3. Zugabe folgender Komponenten in 96 well-Mikrotiterplatten:
 

Puffer (50 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0, 0,2 mM NADPH, 1 mM DTT)	150	µl
<i>ThIA</i> -Rohextrakt	10	µl
2 U <i>phaB</i> (Acetyl CoA Reduktase)	20	µl
4. Starten der Reaktion durch Zugabe von 20 µl Acetyl CoA (20 mM).
5. Photometrische Bestimmung der Steigung bei 340 nm  
 Gerät: SpectraMax M2e Multi-Mode Microplate Reader  
 Software: SoftMax® Pro Software v 5.4.1  
 Programm: Kinetik; Meßlänge: 3 min.; Intervall: 3 sec.
6. Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Formel von 2.10.1.1. Anpassung des Extinktionskoeffizienten auf  $\epsilon = 6300 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Um die Inhibierung der Thiolase-Aktivität von mutagenisierten Derivaten durch freies CoA-SH zu testen, wurden den Enzymassays 10-50 µM freies CoA-SH hinzugeführt. *thIA*-Derivate mit erhöhter Thiolase-Aktivität in Gegenwart von CoA-SH wurden einem weiteren Enzymassay im Küvettenformat unterzogen, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

1. Zentrifugation der Zellsuspension (50 ml Flüssigkultur) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (10.000 x g, 10 min, 4 °C)
2. Isolierung des Gesamtproteins (2.9.1)
3. Zugabe folgender Komponenten in 96 well plates:
 

Puffer (50 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0, 0,2 mM NADPH, 1 mM DTT)	600	µl
<i>ThIA</i> -Rohextrakt	40	µl
2 U <i>phaB</i> (Acetyl CoA Reduktase)	80	µl
CoA-SH (10-50 µM)		

4. Starten der Reaktion durch Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  Acetyl CoA (20 mM).
5. Photometrische Bestimmung (Ultrospec<sup>®</sup> 3000, AMERSHAM Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig) der Steigung bei 340 nm
6. Berechnung der spezifischen Aktivität nach der Formel von 2.10.1.1. Anpassung des Extinktionskoeffizienten auf  $\epsilon = 6300 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 2.11 Herstellung der *thIA*<sup>MUT</sup>-Bibliothek

Aus der Struktur von *Z. ramigera* ist bekannt, dass die Aminosäurereste 119-254 eine Schleife bilden, welche mit dem CoA eines Substrates in Interaktion treten kann (MODIS & WIERENGA, 1999; MODIS & WIERENGA, 2000). Daher sollte nur genau diese genannte Region in *C. acetobutylicum* mutagenisiert werden. Somit wurde auch das Risiko der Erzeugung inaktiver Mutanten minimiert. Die Mutagenisierungsstrategie beruhte darauf, dass im Bereich der Aminosäuren 119-254 durchschnittlich 2,5 Aminosäuren pro Konstrukt ausgetauscht wurden. Die Konstruktion der *thIA*-Mutanten-Bibliothek wurde ohne eine Amplifikation des Gens durchgeführt (GeneArt<sup>®</sup> Controlled Randomization Service). Stattdessen wurden die Oligonukleotide direkt synthetisiert, so dass die Variation der Bibliothek mit der Menge der produzierten DNA-Moleküle korrelierte (Geneart AG, Regensburg, Germany). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass keine Kontamination mit Wildtyp-DNA auftreten kann. Nach der Herstellung der linearen *thIA* Derivate, wurden diese mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *KpnI* in den pASK-IBA3-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21-DE3 transformiert. Die Gesamtzahl der Transformaten lag bei  $>10^4$  /  $\mu\text{g}$  DNA, welche als Glycerin-Stock vor ( $3,9 \times 10^{10}$  CFU/ml) vorlagen. Bei Bedarf konnten die Zellen auf LB-Festmedium+100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin ausgestrichen werden. Somit waren die Einzelkolonien für das Screening mit dem gekoppelten *ThIA/phaB*-Assay (2.10.2.2) verwendbar. Um die Richtigkeit der *thIA*-Mutanten-Bibliothek zu überprüfen, wurde die DNA von 48 zufällig gepickten Klonen sequenziert (siehe Anhang, Abb. A1).

## 2.12 Bezugsquellen

Alle 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. Dabei hatten sie in der Regel den Reinheitsgrad

„reinst“ oder „zur Analyse“. Die in dieser Arbeit verwendeten „reinst“ Gase und Gasgemische wurden von der Westfalen AG (Münster) geliefert. Weitere Bezugsquellen sind in der Tab. 2.8 und der Tab. 2.9 aufgeführt.

**Tab. 2.8: Bezugsquellen der Chemikalien**

Bezugsquelle	Chemikalien
AppliChem GmbH, Darmstadt www.applichem.de	EDTA, Acrylamid (40 %, [w/v]), RNase A, NADP, NAD, NADPH, NADH, Coenzym A, Acetoacetyl CoA, CoA, Erythromycin, Trypton, Hefeextrakt, Phenol pH 4,0, MOPS, Tris, DTT
Difco Laboratories, Hamburg	Agar-Agar
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot www.fermentas.de	Restriktionsenzyme und Puffer, Protein Molekular Weight Marker (SM0431, SM0441), GeneRuler 1kb DNA Ladder (SM0311), GeneRuler 100 bp DNALadder (SM0248), MassRuler (SM403), dNTPs, SAP, T4-DNA-Ligase, T4 DNA Ligase Puffer, 6x Loading Dye
Fluka, Taufkirchen www.sigma-aldrich.de	TEMED, Crotonyl CoA
OXOID GmbH, Wesel www.oxid.com	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
peqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen www.peqlab.de	peqGOLD Gel Extraction Kit, peqGOLD Cycle Kit, <i>Pwo</i> -Polymerase, 10x <i>Pwo</i> Puffer
CARL ROTH GMBH+CO.KG, Karlsruhe www.carlroth.com	Agarose, Ethidiumbromid, Brilliant Blue G-250, Brilliant Blue R-250, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, BSA (Albumin Fraktion V)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen www.sigmaaldrich.com	Ampicillin, NH <sub>2</sub> OH-Lösung, Oligonukleotide

**Tab. 2.9: Bezugsquellen der Geräte und Materialien**

Bezugsquelle	Produkte
AMERSHAM Buchler GmbH&Co.KG, Braunschweig www.amershamhealth.de	Ultrospec 3000
Analytik Jena AG, Jena www.analytik-jena.de	Spekol 1100
Biometra GmbH, Göttingen www.biometra.com	Power Pack P 25, Mini-Gelkammern
BIORAD GmbH, München	Poly-Prep Chromatography Columns,

www.bio-rad.de	GenePulserTMII
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf www.biozym.com	PCR-Cycler
B. Braun Melsungen AG, Melsungen www.bbraun.de	sterile Spritzen
Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	Thermomixer 5436, Pipetten, Spitzen, Reaktionsgefäße
CARL ROTH GmbH &Co. KG, Karlsruhe www.carlroth.com	Spritzen, Kanülen
Fisher Scientific GmbH, Schwerte www.de.fishersci.com/	Vortex Gene-2
Heraeus Instruments GmbH, Osterode www.heraeus.de	28 RS, Rotor 3746
HIELSCHER Ultrasonics GmbH, Teltow www.hielscher.com	Ultrasonic Processor UP200S
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold www.kendro.com	Sorvall RC 5C Plus Zentrifuge, Rotor SLA 3000, Sterilbank Herasafe, Sigma 3K30 Zentrifuge Mettler Brutschrank
Molecular Devices, Ismaning	SpectraMax M2e Multi-Mode Microplate Reader
Müller-Krempel AG, Bülach www.muellerundkrempel.ch	Müller&Krempel-Serumflaschen
OCHS Laborfachhandel e. K., Bovenden www.labor-ochs.de	Hungaterörchen, Olympus, Hamburg CH2-Lichtmikroskop
SARSTEDT AG&Co, Nürnberg www.sarstedt.com	Petrischalen, 15-ml-Röhrchen, 50-ml-Röhrchen, Einmal-impföse, Einmalspatel
Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen www.schuett-biotec.de	Wasserbad
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen www.sigmaaldrich.com	Chemie Rotor 121500
TECHNE AG, Jahnsdorf Techne www.biostep.de	CL-508 UV-Illuminator
ATCC 824W Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim www.ATCC824w.de	pH Meter pH526

### 3 Experimente und Ergebnisse

#### 3.1 Homologe Expression mit Hilfe des pT-Vektors

*C. acetobutylicum*-Stämme mit erhöhter Expression eines beliebigen Gens lassen sich mit Hilfe des pT-Vektors herstellen (Abb. 3.1).

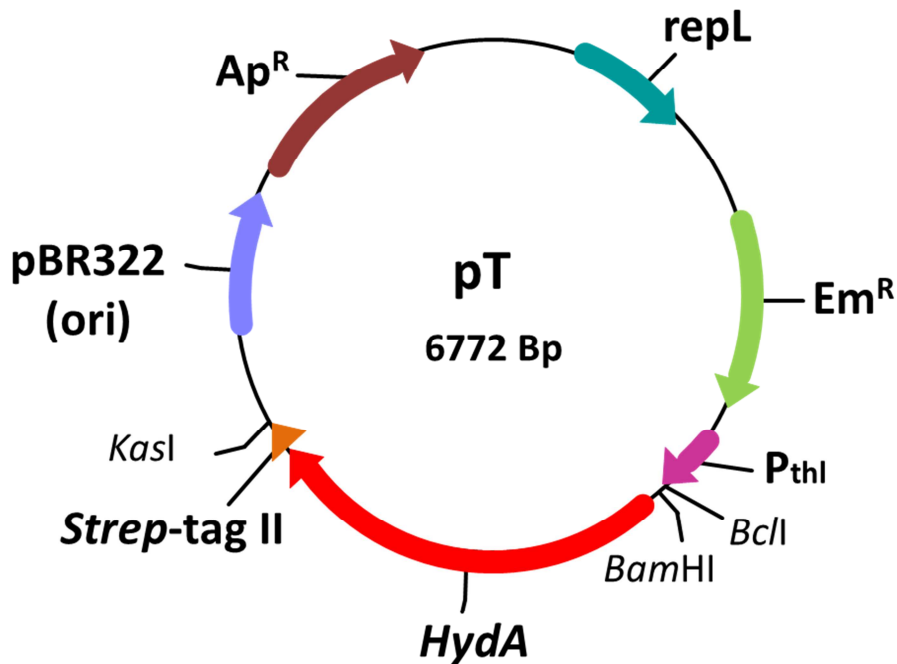


Abb. 3.1: Vektorkarte vom pT-Vektor (Erläuterung siehe Text).

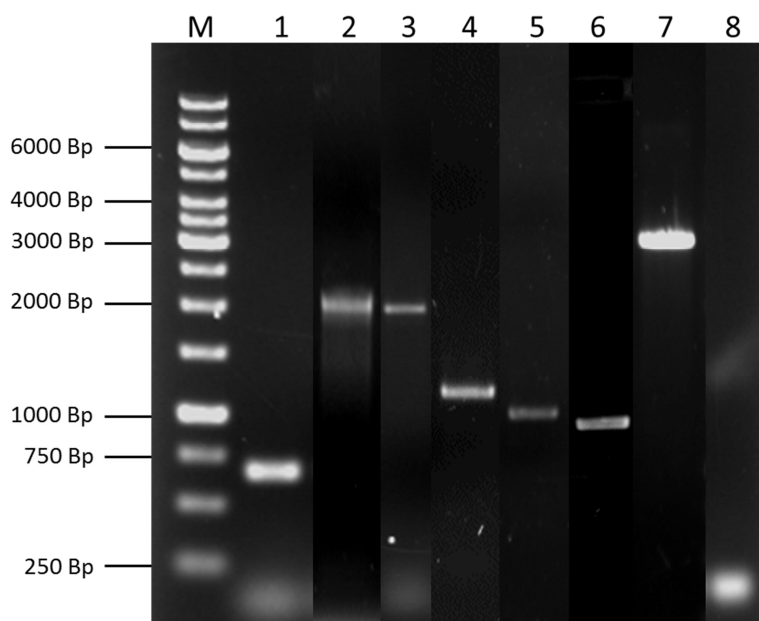
Der pT-Vektor (GIRBAL *et al.*, 2004) besitzt sowohl für gram<sup>+</sup>-Bakterien (*repl*) als auch für gram<sup>-</sup>-Bakterien (*pBR322*) einen „origin of replication“ (ORI). Diese genetische Ausstattung bietet die Möglichkeit Proteine homolog in *C. acetobutylicum* als auch heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Dieses macht es möglich den pT-Vektor als einen *E. coli*-*C. acetobutylicum*-Shuttle-Vektor zu verwenden. Weiterhin besitzt der pT-Vektor einen Thiolase-Promotor (*P<sub>thl</sub>*), der eine starke Expression in der exponentiellen Wachstumsphase bedingt (TUMMALA *et al.*, 1999) und als idealer Expressionsvektor für Clostridien beschrieben wird (SILLERS *et al.*, 2008). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Kas*I war es möglich die vorhandene Fe-Hydrogenase (*HydA*) aus dem Vektor zu restriktieren und durch ein beliebiges Gen von Interesse zu ersetzen (Tab. 3.1). Der Kontrollvektor (Vektorkontrollstamm pT) wurde generiert, indem wie oben beschrieben das *HydA*-Gen entfernt und nach

einer Behandlung mit Klenow-Fragmenten (DNA Polymerase I [Fermentas, St. Leon-Rot]) re-ligiert wurde.

**Tab. 3.1: Gene die mit Hilfe des pT-Vektors in *C. acetobutylicum* co-exprimiert wurden.**

Name	ORF	Größe (Bp)	Funktion	Referenz
HSP60 Co-Protein <i>grpE</i>	CA_C0471	573	Bindet ans molekulare Chaperon <i>dnaK</i> (CA_C1282) und sorgt dort für die Energiegewinnung	RÜNGELING <i>et al.</i> 1999
HSP90 Protein <i>htpG</i>	CA_C3315	1875	Faltung und Aktivierung von Substratproteinen	THOMAS <i>et al.</i> , 2003
HSP60 Chaperon <i>groESL</i>	CA_C2703/04	1920	Schließt AS-Ketten ein damit sie ihre physiologische Struktur annehmen können	THOMAS <i>et al.</i> , 2003
Thiolase	CA_C2873	1179	Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu einem Molekül Acetoacetyl-CoA	HARTMANIS & GATENBECK, 1984; WIESENBORN <i>et al.</i> , 1988
$\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase	CA_C2708-10	2640	Reduktion von Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA	HARTMANIS & GATENBECK, 1984
Crotonase	CA_C2712	786	Dehydratations von 3-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA	HARTMANIS & GATENBECK, 1984
Butyryl-CoA Dehydrogenase	CA_C2711	1140	Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA	HARTMANIS & GATENBECK, 1984

Um den Nachweis der korrekten Insertion vom Gen in den Vektor zu erbringen zu, wurde eine Colony-PCR (2.7.6.2) durchgeführt. Dafür wurden ein Gen- und ein Plasmid-spezifischer Primer verwendet (Tabelle 2.4). Im Falle einer korrekten Integration des DNA-Fragments in den pT-Vektor wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, welches zum ursprünglichen Fragment um 100 Bp vergrößert war (Abb. 3.2). Abbildung 3.2 zeigt den erbrachten Nachweis der Insertion des jeweiligen offenen Leserahmens der untersuchten Gene (Tab. 3.1) in den pT-Vektor.



**Abb. 3.2: Plasmid-Nachweis mittels Colony-PCR mit Plasmid- und Gen-spezifischen Primern.** M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Spur 1: pT\_*grpE*, Spur 2: pT\_*groESL*, Spur 3: pT\_*htpG*, Spur 4: pT\_*thlA*, Spur 5: pT\_*hbd*, Spur 6: pT\_*crt*, Spur 7: pT\_*bcd\_etfA\_etfB* und Spur 8: Vektorkontrolle pT.

### 3.2 Stabilitätserhöhung von in *C. acetobutylicum* exprimierten Proteinen durch Co-Expression von Chaperonen

Bereits TOMAS *et al.* (2003) konnte zeigen, dass die vermehrte Expression des *groESL*-Operons in *C. acetobutylicum* sowohl zu einer deutlich verbesserten Butanoltoleranz und als auch zu einer erhöhten Butanolproduktion führte. Basierend auf diesen Informationen wurden das Operon *groESL* (Positivkontrolle) und jeweils einzeln die Chaperone *GrpE* und *HtpG* homolog co-exprimiert und hinsichtlich ihrer Butanolproduktion, als auch auf ihre Butanolresistenz unter ausgewählten Wachstumsbedingungen untersucht. Vergleichend sind die Kontrollstämme *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm pT mit analysiert worden.

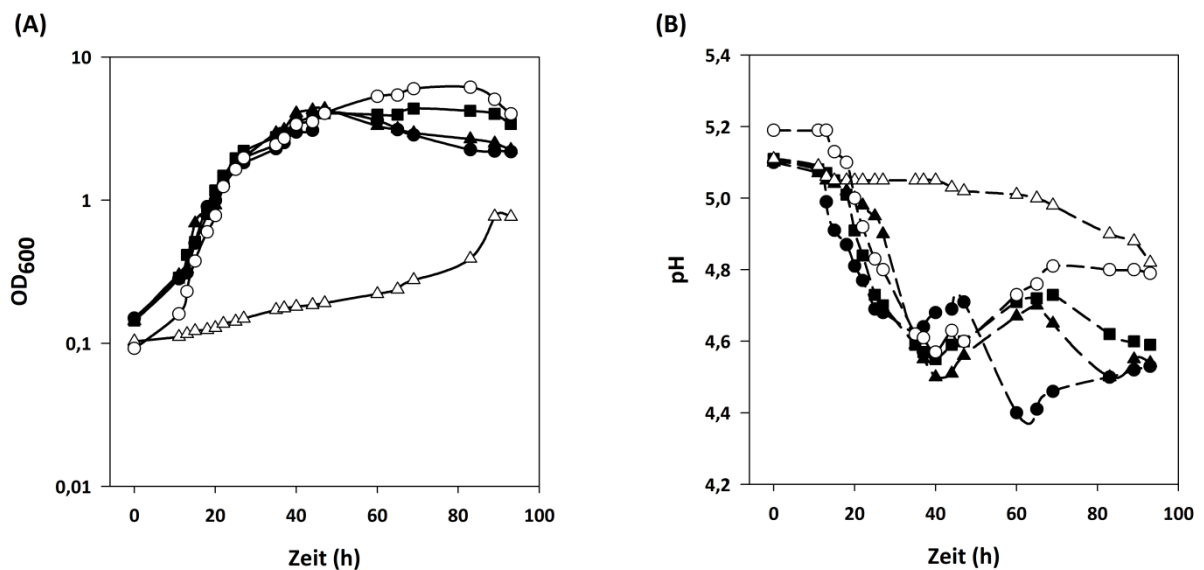
#### 3.2.1 Butanolproduktion

Um die Butanolproduktion der einzelnen Expressionsstämme näher bestimmen zu können, wurde eine physiologische Wachstumscharakterisierung durchgeführt. Hierzu erfolgte während eines Wachstumsverlaufes sowohl die kontinuierliche Messung der optischen Dichte und des pH-Wertes (Abb. 3.3), als auch die gaschromatographische Bestimmung der



gebildeten Gärungsprodukte (Abb. 3.4) in einer 200-ml-Batch-Kultur unter der Verwendung eines Minimalmedium (MS-MES).

Vergleichend beim Verlauf der optischen Dichte war ersichtlich, dass die homologen Expressionsstämme *C. acetobutylicum* pT\_groESL und *C. acetobutylicum* pT\_htpG ein ähnliches Wachstumsverhalten vergleichend zum Vektorkontroll-Stamm pT und zum Typstamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 aufwiesen (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Vergleichende Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pT\_grpE (△), *C. acetobutylicum* pT\_groESL (○), *C. acetobutylicum* pT\_htpG (●) im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm pT (□) und zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (▲). Dargestellt ist der Verlauf der Optischen Dichte bei 600 nm (A) und des pH-Wertes (B). Die Kultivierung erfolgte im 200 ml-Maßstab, gezeigt sind die Mittelwerte von zwei Experimenten.

Die Kulturen erreichten nach einer kurzen lag-Phase die exponentielle Wachstumsphase, welche nach ca. 40 h von der stationären Wachstumsphase abgelöst wurde. Während der exponentiellen Wachstumsphase wiesen die genannten Stämme einen typischen pH-Abfall auf, der auf die gebildeten Säuren Acetat und Butyrat zurückzuführen sind (Abb. 3.4 A und B). Ebenso wiesen diese Stämme den klassischen Lösungsmittelshift auf. Dabei wurden die gebildeten Säuren in die Lösungsmittel Ethanol, Aceton und Butanol umgewandelt, was einen leichten Anstieg des pH-Werts zur Folge hat (Abb. 3.4 C, D und E). Lediglich der Stamm *C. acetobutylicum* pT\_grpE wies ein stark verändertes Wachstum, im Vergleich zu allen anderen Stämmen auf. Der Wachstumsverlauf von *C. acetobutylicum* pT\_grpE konnte nicht in die typischen Wachstumsphasen eingeteilt werden. *C. acetobutylicum* pT\_grpE wies ein

langsames und limitiertes Wachstum auf, mit einer maximalen  $OD_{600}$  von  $\sim 0,7$ . Aufgrund dieses untypischen Wachstumsverhaltens konnte auch ein stark abweichender Verlauf des pH-Wertes festgestellt werden. Bei *C. acetobutylicum* pT\_*grpE* zeigte sich lediglich eine langsame und geringe Abnahme des pH-Wertes. Dieses Wachstumsverhalten spiegelte sich auch in der Produktion der organischen Säuren und Lösungsmitteln wieder. *C. acetobutylicum* pT\_*grpE* war in der Lage Acetat und Butyrat zu synthetisieren, konnte diese nicht vollständig in Lösungsmittel umwandeln. Daher kam es während des Wachstumsverlaufes zu einer Anhäufung der organischen Säuren. So wurden 90 % mehr an Acetat und Butyrat detektiert als bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT. Bei den Lösungsmitteln war *C. acetobutylicum* pT\_*grpE* nur in der Lage ca. 50 % Butanol, 50 % Ethanol und 75 % Aceton verglichen mit den Werten von *C. acetobutylicum* ATCC 824 zu bilden. Bei den anderen untersuchten Stämme konnte festgestellt werden, dass die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* pT\_*htpG* nur bei ca. 70 % im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 lag (Tab. 3.2). Ansonsten war das Wachstumsverhalten und die Bildung der Gärungsprodukte von *C. acetobutylicum* pT\_*groESL* und pT\_*htpG* annähernd gleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT. Eine übersichtliche Zusammenfassung der Gärungsendprodukte von den untersuchten Expressionsstämmen ist aus Tabelle A1 (Anhang) zu entnehmen. Abschließend anzumerken ist, dass in keinem der untersuchten homologen Expressionsstämmen die Säure Laktat nachzuweisen war.

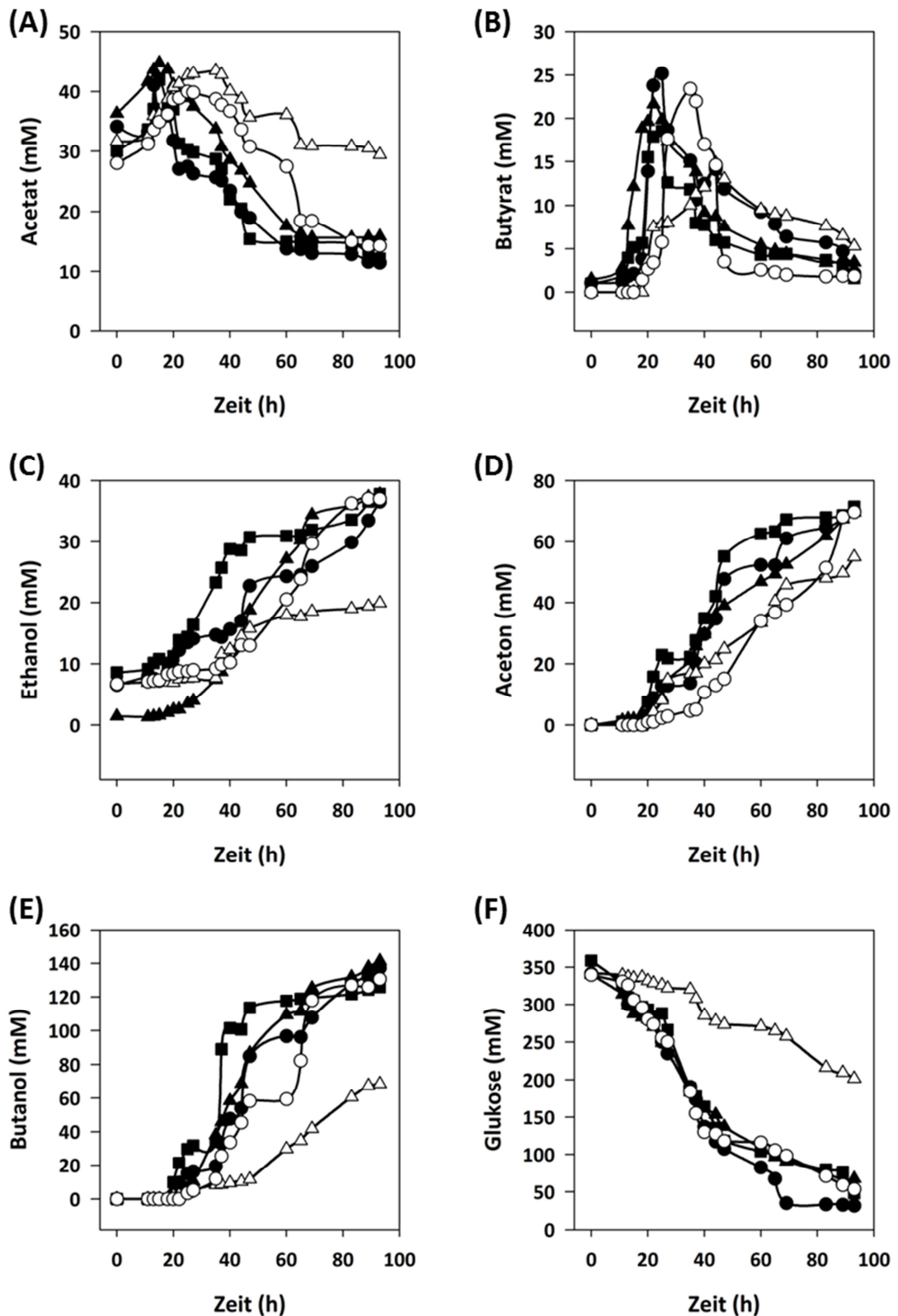
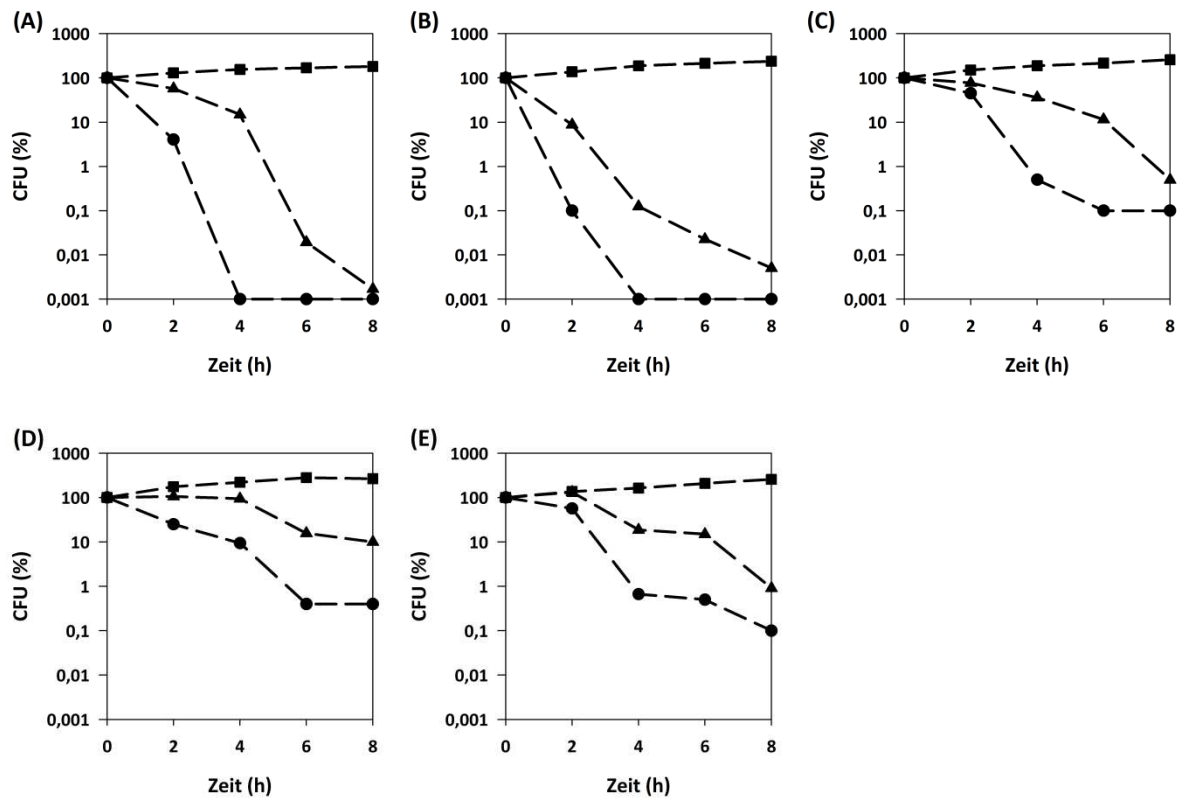


Abb. 3.4: Gärungsprodukte der Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pT<sub>grpE</sub> (Δ), *C. acetobutylicum* pT<sub>groESL</sub> (○), *C. acetobutylicum* pT<sub>htpG</sub> (●) im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm pT (■) und zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (▲). Dargestellt sind die Konzentrationen von Acetat (A), Butyrat (B), Ethanol (C), Aceton (D), Butanol (E) und der Glukoseverbrauch (F). Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. Außer bei *C. acetobutylicum* ATCC 824, wurde allen Kulturen, Erythromycin, für die Sicherung der Plasmid-vermittelten Resistenz, zugegeben. Dies entsprach einer Konzentration von ca. 10 mM Ethanol zu Beginn des Wachstumsversuchs.

### 3.2.2 Butanoltoleranz

Da in den vorangegangenen Wachstumsversuchen keinerlei erhöhte Butanolkonzentrationen in den Expressionsstämmen zu beobachten war, galt es nun mehr direkt die Butanoltoleranz mittels Butanolstress-Experimente zu untersuchen. Hierfür sind die Zellen in CGM (2.2.1) bis zur einer optischen Dichte  $\sim 1,0$  gewachsen, anschließend mit 1 Vol% und 2 Vol% Butanol versetzt und danach in regelmäßigen Abständen auf RCA-Festmedium ausplattiert worden (2.6.9). CGM diente als Kulturmedium, da dort alle clostridiellen Expressionsstämme die exponentielle Wachstumsphase erreichten (nicht wie in den Kultivierungsexperimenten in MS-MES [Abb. 3.4]). Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte *C. acetobutylicum*-Expressionskultur des jeweiligen Stammes und als Positivkontrolle *C. acetobutylicum* pT\_ *groESL*. Die clostridiellen co-exprimierten Stämme zeigen eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber Butanol im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT (Abb. 3.5). Die Expressionsstämme überlebten eine mehr als zweistündige Exposition mit 1 Vol% Butanol und waren daher noch in der Lage, eine gleichbleibende Anzahl an Butanol-behandelte Colony-forming-Units (CFUs) auf RCA zu bilden, wohingegen die CFUs der Kontrollen binnen kurzer Zeit abnehmen. Sowohl *C. acetobutylicum* ATCC 824 als auch der Vektorkontroll-Stamm pT wiesen  $< 0,1$  % CFU nach 6 stündiger Inkubation mit 1 Vol% Butanol auf. Bei einer Inkubation mit 2 Vol% Butanol sind bereits nach 4 stündiger Inkubation  $< 0,1$  % CFU nur noch nachweisbar. Nach 6 h Butanolexposition sind bei *C. acetobutylicum* pT\_ *groESL* noch 12 %, bei *C. acetobutylicum* pT\_ *groESL* noch 16 % und bei *C. acetobutylicum* pT\_ *htpG* noch 15 % CFUs in Relation zu den Ausgangswerten ermittelbar.



**Abb. 3.5:** Butanoltoleranz von *C. acetobutylicum* pT\_groESL (C), *C. acetobutylicum* pT\_grpE (D) und *C. acetobutylicum* pT\_htpG (E) im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (A) und zum Vektorkontroll-Stamm pT (B). Die *C. acetobutylicum* Stämme wurden mit 1 Vol% (▲) und 2 Vol% (●) Butanol versetzt. Anschließend wurden nach 2, 4, 6 und 8 h die CFUs, vergleichend zur Negativkontrolle [(■) 0 Vol% Butanol] bestimmt. Die CFUs wurden in Relation zum Ausgangswert in Prozent dargestellt.

Ein Vergleich der Butanoltoleranz nach 6 stündiger Inkubation mit 1 Vol% und 2 Vol% Butanol zeigt, dass deutlich mehr Butanol-behandelte CFUs bei den Expressionsstämmen nachweisbar sind, als bei den beiden Kontrollstämmen (Abb. 3.6).

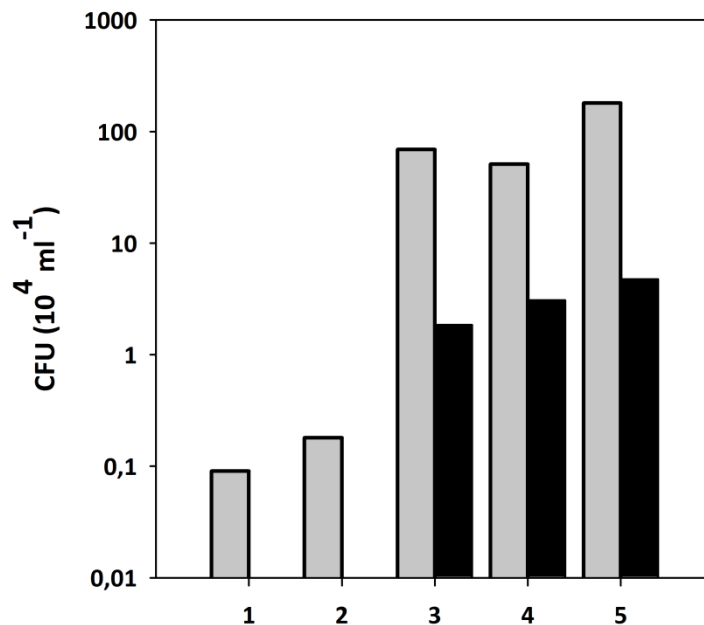
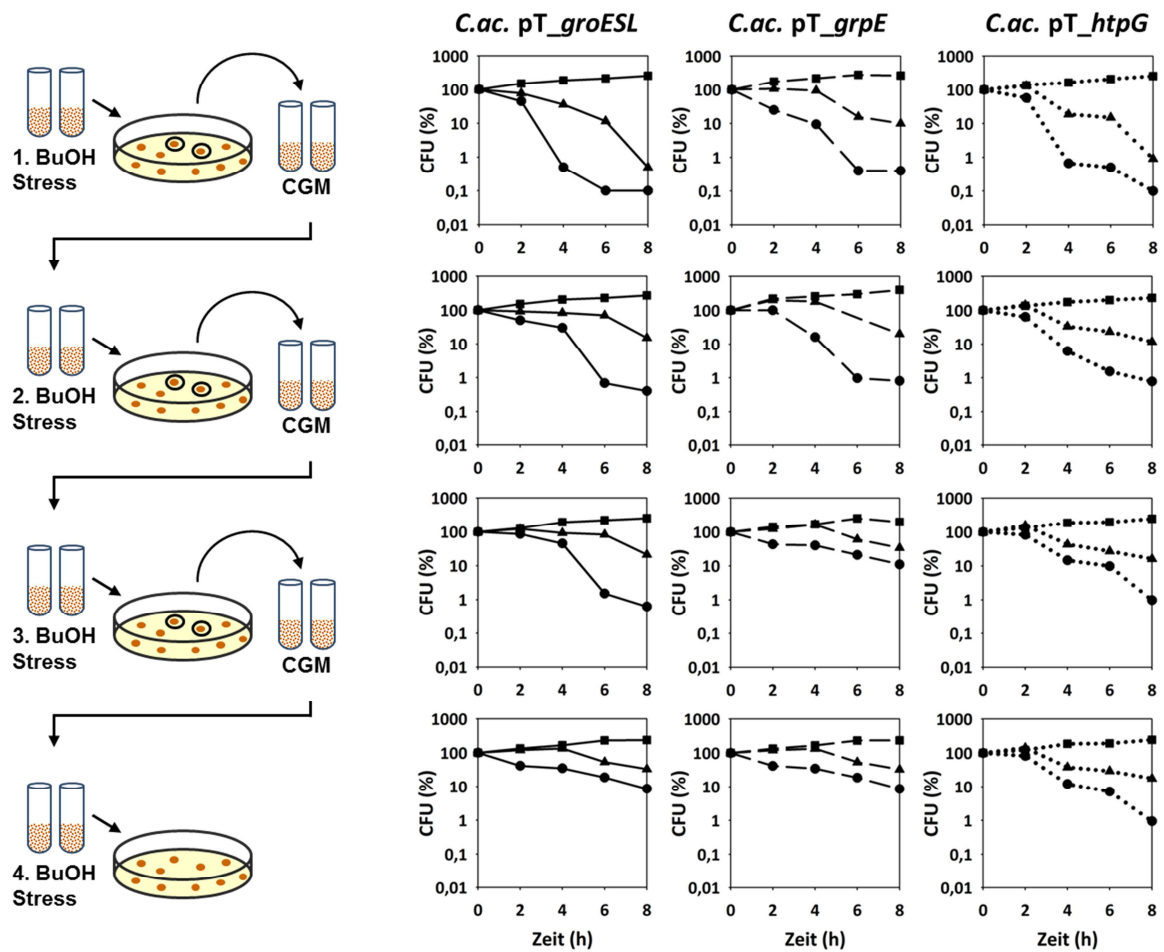


Abb. 3.6: Butanoltoleranz von *C. acetobutylicum* pT\_groESL (3), *C. acetobutylicum* pT\_grpE (4) und *C. acetobutylicum* pT\_htpG (5) im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (1) und zum Vektorkontroll-Stamm pT (2). Dargestellt sind die ausgezählten CFUs von Proben die nach 6 stündiger Butanolinkubation [1 Vol% (●) und 2 Vol% (●)] genommen wurden.

### 3.2.3 Butanoladaption

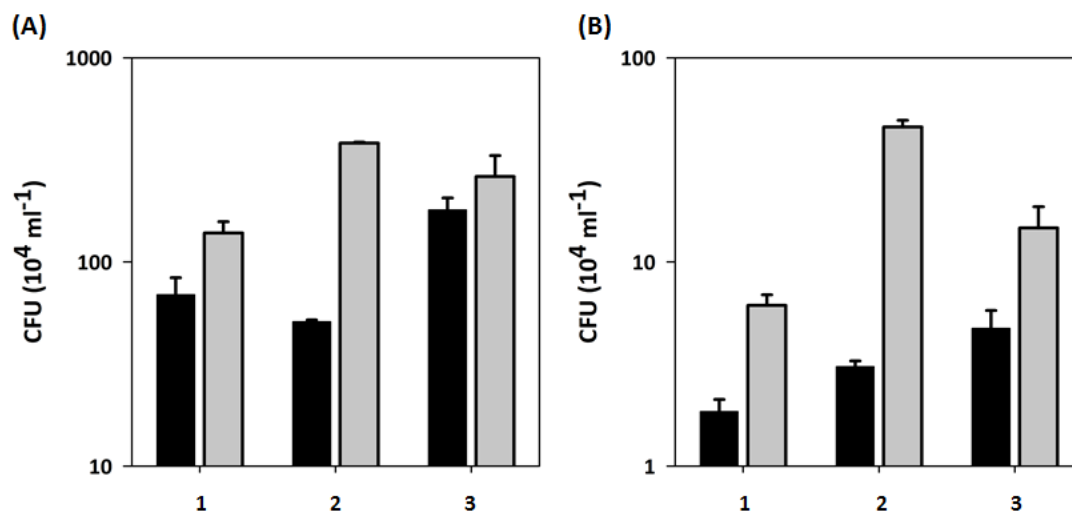
Wie in 3.2.2 beschrieben, sind die clostridiellen ÜE-Stämme im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT deutlich besser in der Lage, eine Exposition mit Butanol zu überleben. Daher stellte sich die Frage, ob die Plasmide durch die Butanolexposition mutieren oder ob sich die gesamte Zelle als eine Antwort auf den Selektionsdruck verändert. Um dies nachzuvollziehen, wurden sich wiederholende Butanolstress-Experimente mit einem einzelnen Ausgangsstamm durchgeführt. Hierfür wurden jeweils einzelne Kolonien der verschiedenen Stämme, die nach der Butanolexposition (6 h bei 2 % Butanol) auf RCA-Festmedium anwuchsen, in Flüssigmedium überführt (CGM) und einem erneuten Butanolstress-Experiment (2.6.9) mit 1 Vol% und 2 Vol% Butanol unterzogen (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Butanoladaption von *C. acetobutylicum* pT\_groESL, *C. acetobutylicum* pT\_grpE und *C. acetobutylicum* pT\_htpG.** Auf der linken Seite ist das experimentelle Schema dargestellt: für jedes Butanolstress-Experiment wurden zwei Kolonien genommen, die eine 6 stündige 2 Vol%ige Butanolexposition überlebten, in frisches CGM überimpft und erneut mit Butanol [1 Vol% (▲) und 2 Vol% (●) Butanol] versetzt. Alle 2 h wurden die CFUs vergleichend zur Negativkontrolle [(■) 0 Vol% Butanol] bestimmt. Die CFUs sind in Relation zum Ausgangswert in Prozent gesetzt worden.

Die Butanolstress-Experimente zeigen, dass die clostridiellen Expressionstäme in der Lage sind, sich an eine Butanolexposition schrittweise adaptieren zu können. Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich ist, ist es den co-exprimierenden Stämmen möglich, auf jedes Butanolstress-Experiment mit einer erhöhten Anzahl an Butanol-behandelten CFUs zu reagieren. So sind die Expressionstäme in der Lage, bis zu 50 % mehr CFUs nach dem dritten Butanolstress-Experiment zu bilden, als nach dem ersten Stress-Experiment. Nach einem vierten Butanolstress-Experiment jedoch stagniert die Anzahl der überlebenden Zellen. Eine fortlaufende Adaption war ab diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich. Die absoluten CFU-Werte, die in Abb. 3.8 dargestellt sind, zeigen eine verbesserte Butanoltoleranz bei allen drei Expressionstämmen. Besonders hervorzuheben ist *C. acetobutylicum* pT\_grpE, da dieser

bereits nach dem ersten Stress-Experiment die höchste Anzahl an CFUs zeigt. Nach 2 %iger Butanolexposition (Abb. 3.8, B) konnten fast genauso viele lebende Zellen wie nach 1 %iger Butanolexposition nachgewiesen werden.



**Abb. 3.8: Verbesserte Überlebensraten von *C. acetobutylicum* pT\_groESL (1), *C. acetobutylicum* pT\_grpE (2) und *C. acetobutylicum* pT\_htpG (3) nach Butanolexposition.** Die Expressionsstämme wurden für 6 h mit 2 Vol% Butanol behandelt und auf RCA-Festmedium ausgestrichen [Butanol-behandelte Probe (●) und unbehandelte Kontrolle (●)]. Für jeden Stamm wurden wahllos 2 Kolonien gepickt und einem weiteren Butanolstress-Experiment unterzogen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach einer 6 stündigen Inkubation mit 1 Vol% (A) und 2 Vol% (B) Butanol. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Plasmide aller drei Expressionsstämme wurden nach jedem Butanolstress-Experiment isoliert und sequenziert. Ein Austausch von Aminosäuren im Bereich der entsprechenden Stressproteine konnte nicht detektiert werden. Eine Re-Transformation der isolierten Plasmide in *C. acetobutylicum* ATCC 824 führte zu keiner Veränderung des ursprünglichen Phänotyps.



### **3.3 Co-Expression zentraler Schlüsselenzyme in *C. acetobutylicum* zur Verbesserung der Butanolproduktion durch Beeinflussung des Stoffflusses**

Um die Produktion von Butanol zu verbessern wurden die Schlüsselenzyme des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* näher analysiert. Hierfür sind die folgenden Enzyme homolog in *C. acetobutylicum* co-exprimiert worden: Thiolase (Acetyl-CoA:Acetyl-CoA C-Acetyltransferase, EC 2.3.1.9),  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (L(+)-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, EC 1.1.1.35), Crotonase (L-3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolyase, EC 4.2.1.17) und Butyryl-CoA Dehydrogenase (Butanoyl-CoA:Acceptor 2,3-Oxidoreduktase, EC 1.3.99.2). Zur Überprüfung der funktionellen Expression schlossen sich Enzymaktivitätsbestimmungen an.

#### **3.3.1 Enzymassays**

Mit Hilfe von Enzymassays (2.10.1) sollte überprüft werden, ob die zentralen Gärungsstoffwechsel-Enzyme (Thiolase,  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, Crotonase und Butyryl-CoA Dehydrogenase) in den jeweiligen Clostridien-Stämmen (*C. acetobutylicum* pT\_ThIA, *C. acetobutylicum* pT\_hbd, *C. acetobutylicum* pT\_crt und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB) exprimiert und dadurch eine erhöhte spezifische Aktivität aufweisen. Vergleichend dazu wurden die jeweiligen spezifischen Aktivitäten in *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT gemessen. Dazu sind die einzelnen Stämme unter den Wachstumsbedingungen einer Batch-Kultur (Kapitel 2.4) in 200 ml MS-MES angezogen und beim Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet worden. Spezifische Aktivitäten wurden photometrisch im Rohextrakt gemessen, wobei sowohl die durchschnittlichen Werte, als auch die Standardabweichungen von je drei Replikaten ermittelt wurden. Der Butyryl-CoA Dehydrogenase-Assay wurde von der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biochemie“ - unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Buckel (Philipps Universität Marburg) angefertigt. Die Assays wurden pro Stamm einmal durchgeführt, so dass in diesem Fall keine Standardabweichung angegeben werden kann (Tab. 3.3).

**Tab. 3.3:** Enzymaktivitäten von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA, *C. acetobutylicum* pT\_hbd, *C. acetobutylicum* pT\_crt und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT. Eine Unit pro mg Protein (U/mg) ist definiert als der Umsatz von einem Millimol Substrat pro Minute in Bezug auf den Proteingehalt im Rohextrakt.

Stamm	Thiolase-Assay	$\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase-Assay	Crotonase- Assay	Butyryl- CoA Dehydrogenase- Assay
	spezifische Aktivität (U/mg)			
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	31,46 $\pm$ 1,24	10,29 $\pm$ 0,46	94,92 $\pm$ 4,48	k. A.
Vektorkontroll-Stamm pT	29,87 $\pm$ 0,57	10,83 $\pm$ 0,64	97,79 $\pm$ 7,14	0,07
<i>C. acetobutylicum</i> pT_ThIA	54,00 $\pm$ 0,77	11,55 $\pm$ 0,19	90,91 $\pm$ 0,87	0,07
<i>C. acetobutylicum</i> pT_hbd	29,66 $\pm$ 1,33	19,03 $\pm$ 0,79	100,87 $\pm$ 2,51	0,07
<i>C. acetobutylicum</i> pT_crt	31,94 $\pm$ 0,39	11,53 $\pm$ 0,32	160,23 $\pm$ 4,35	0,06
<i>C. acetobutylicum</i> pT_bcd_etfA_etfB	34,22 $\pm$ 1,98	9,86 $\pm$ 0,76	91,40 $\pm$ 2,23	0,39

Die biochemischen Analysen zeigen, dass in den jeweiligen Expressionsstämmen die entsprechenden Enzymaktivitäten, im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT signifikant erhöht sind (Tab. 3.3). So weist *C. acetobutylicum* pT\_ThIA eine um ~ 80 % erhöhte spezifische Aktivität auf, während eine Co-Expression von hbd eine um ~ 90 % erhöhte, crt um ~ 66 % erhöhte und bcd sogar eine um ~ 550 % erhöhte spezifische Aktivität gegenüber *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT aufwies. Auf diesem Wege konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der jeweiligen Enzyme in den clostridiellen Stämmen durchgeführt und somit zu einer erhöhten Enzymaktivität führen. Weiterhin zeigt kein untersuchter Expressionsstamm eine erhöhte spezifische Aktivität der anderen Stoffwechsel-relevanten Enzyme. Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Co-Expression aller Enzyme erfolgreich war, wurden die Stämme hinsichtlich des Wachstums (OD und pH) und der Gärungsendprodukte näher analysiert.

### 3.3.2 Physiologische Charakterisierung

Um die in dieser Arbeit erzeugten homologen Expressionsstämme näher charakterisieren zu können, wurden physiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu erfolgte während des Wachstumsverlaufes sowohl die kontinuierliche Messung der optischen Dichte und des pH-Wertes (Abb. 3.11), als auch die Bestimmung der gebildeten Gärungsprodukte

(Abb. 3.12) in einer 100-ml-Batch-Kultur unter der Verwendung eines Minimalmedium (MS-MES). Zudem sind die Menge des produzierten Gasvolumens bestimmt und die daraus resultierenden Wasserstoff- bzw. Kohlenstoffdioxidanteile genauer untersucht worden (Abb. 3.10). Im Folgenden werden die Stämme *C. acetobutylicum* pT\_ThIA, *C. acetobutylicum* pT\_hbd, *C. acetobutylicum* pT\_crt und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB vergleichend zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT analysiert.

### 3.3.2.1 Quantifizierungen der Gasbildung

Die während eines Wachstumsverlaufes produzierten Gase, Wasserstoff und Kohlendioxid, wurden wie unter 2.6.4. über einen Schlauch in einen wassergefüllten Glaszylinder geleitet, so dass diese das entsprechende Volumen  $H_2O_{dest}$  verdrängten. Daher war eine Bestimmung des gebildeten Gasvolumens möglich.

Mit dem Beginn der exponentiellen Wachstumsphase beginnen sowohl die clostridiellen Expressionsstämme, als auch *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm pT mit der Gasproduktion. Während dieser Phase produzieren die o.g. Stämme durchschnittlich je 20 ml Gas pro Stunde. Mit dem Erreichen der stationären Phase nimmt die Gasproduktion ab und sinkt auf durchschnittlich 10 ml pro Stunde. Mit dem Eintreten der Absterbephase nimmt auch die Produktion der Gase signifikant ab. Vergleicht man die Menge der produzierten Gesamtgase (Wasserstoff und Kohlendioxid) miteinander, wird deutlich, dass *C. acetobutylicum* pT\_ThIA (791 ml) und *C. acetobutylicum* pT\_hbd (802 ml) eine höhere Gasproduktion aufweisen, als *C. acetobutylicum* ATCC 824 (730 ml) und der Vektorkontroll-Stamm pT (555 ml). *C. acetobutylicum* pT\_crt (534 ml) und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB (617 ml) produzieren von den untersuchten Stämmen das geringste Gasvolumen. Unter Einbeziehung der ermittelten Gasvolumina können die Anteile an Wasserstoff und Kohlendioxid ermittelt werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass während der exponentiellen Wachstumsphase alle o.g. clostridiellen Stämme etwa eine gleich große Menge an Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2:H_2$ -Verhältnis: 1:1) produzieren. Mit dem Eintreten des „Lösungsmittelshifts“ nahm jedoch die Wasserstoffproduktion ab, was an deutlich abgeflachten Kurven erkennbar ist (Abb. 3.10). Nun verändert sich das  $CO_2:H_2$ -Verhältnis auf 2:1 zum Ende des Wachstums, welches bei fast allen untersuchten

Stämmen vorkam. *C. acetobutylicum* pT<sub>crt</sub> zeigte ein leicht erhöhtes CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>-Verhältnis von 3:1 und *C. acetobutylicum* pT<sub>bcd\_etfA\_etfB</sub> von 2,7:1.

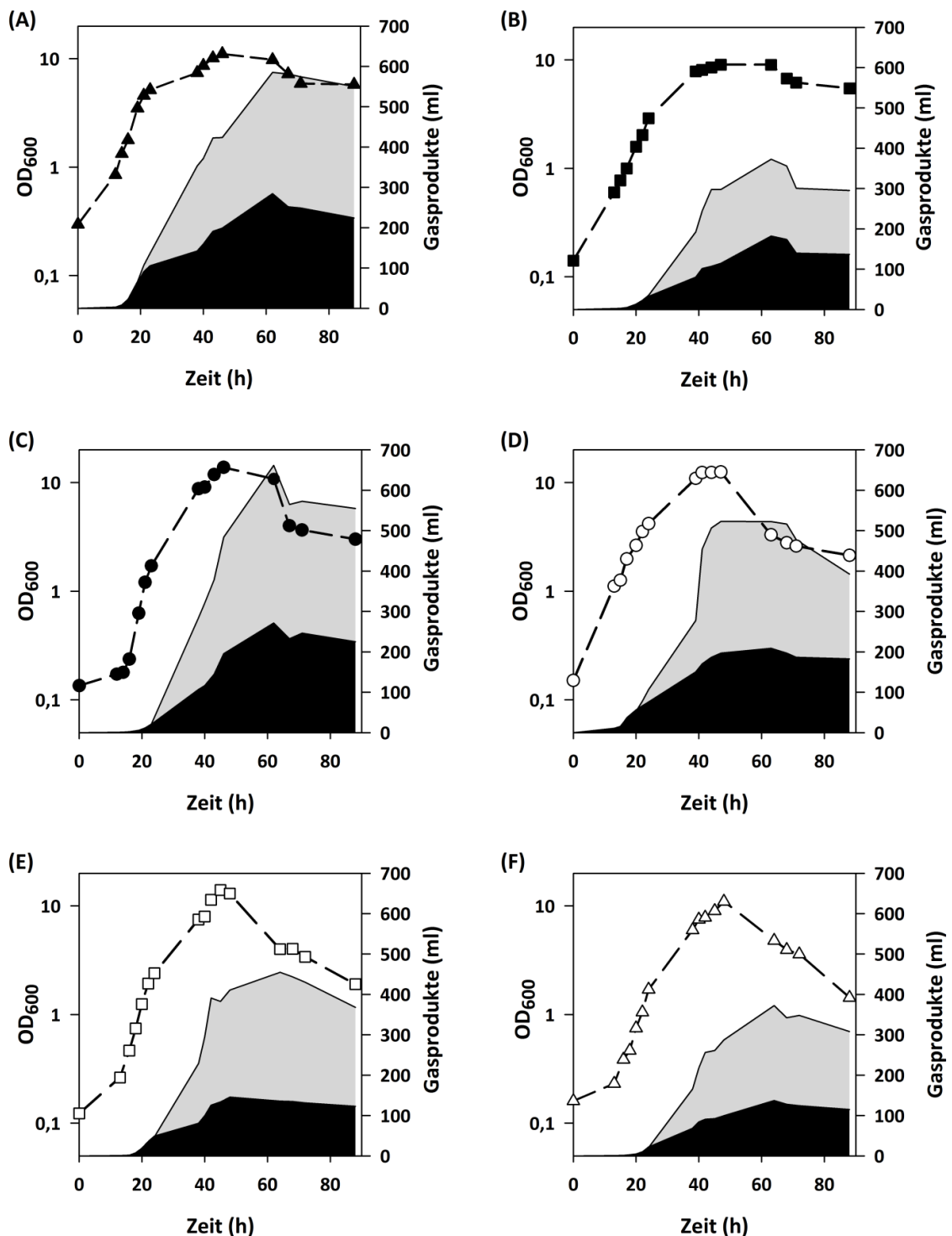
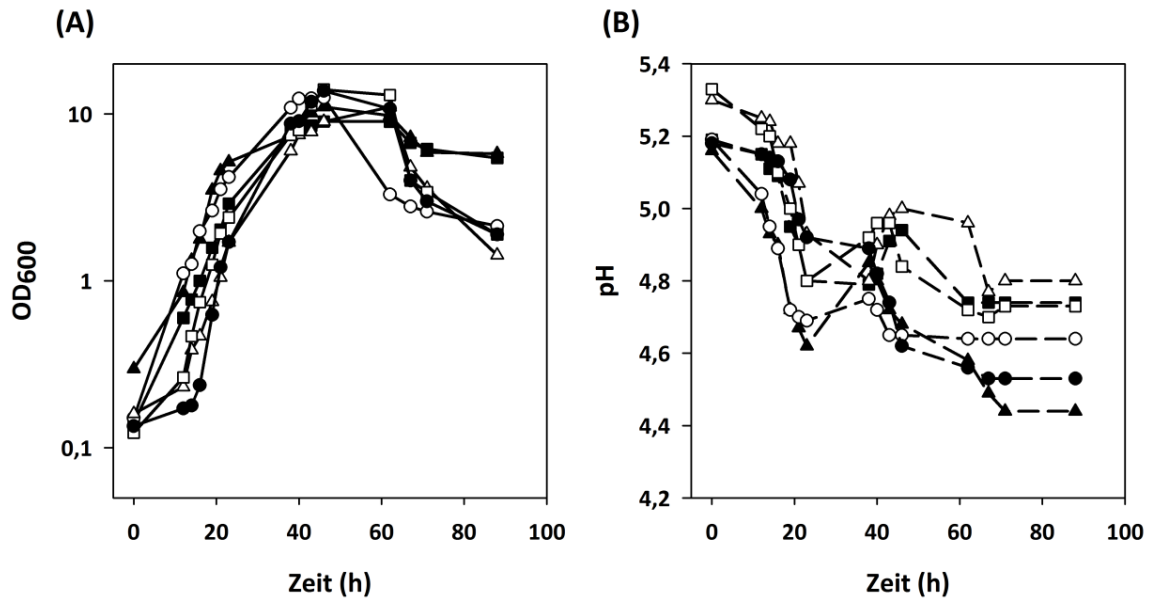


Abb. 3.10: Wachstumsabhängige H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> Produktion von *C. acetobutylicum* pT<sub>thIA</sub> (C;[●]), *C. acetobutylicum* pT<sub>hbd</sub> (D;[○]), *C. acetobutylicum* pT<sub>crt</sub> (E;[□]) und *C. acetobutylicum* pT<sub>bcd\_etfA\_etfB</sub> (F;[Δ]) im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm pT (B;[■]) und zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (A;[▲]). Die Kultivierung erfolgte anaerob bei 37 °C in 100 ml MS-MES. Die gasförmigen Produkte wurden mit Hilfe der Gaschromatographie analysiert. Das Wachstum konnte mit Hilfe der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt werden. H<sub>2</sub> ist als schwarze und CO<sub>2</sub> als graue Fläche dargestellt.

### 3.3.2.2 Wachstum und Produktbildung

Bei der kontinuierlichen Analyse der optischen Dichte wird ersichtlich, dass alle clostridiellen Expressionsstämme ein ähnliches Wachstumsverhalten in 100 ml MS-MES im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm pT zeigten. Die untersuchten Stämme erreichen nach einer kurzen lag-Phase die exponentielle Wachstumsphase, welche nach ca. 40 h von der stationären Wachstumsphase abgelöst wird. Auffallend ist, dass die Expressionsstämme in der Lage sind, eine deutlich höhere optische Dichte zu erreichen im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT. *C. acetobutylicum* pT\_ThIA und *C. acetobutylicum* pT\_crt erreichen eine maximale optische Dichte von  $OD_{600} = 14$ , wohingegen *C. acetobutylicum* ATCC 824 nur eine optische Dichte von  $OD_{600} = 10$  und der Vektorkontroll-Stamm pT eine optische Dichte von  $OD_{600} = 9$  erreicht. Die maximalen optischen Dichten von *C. acetobutylicum* pT\_hbd ( $OD_{600}=12$ ) und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB ( $OD_{600}=11$ ) sind geringer als die der anderen beiden Expressionsstämme, aber signifikant höher als bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Absterbephase bei den clostridiellen Expressionsstämmen deutlich drastischer als bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT ausfällt. Es kann eine starke Abnahme der Zellzahl nach Erreichen der maximalen optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) ermittelt werden. Die Zellzahlen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT bleiben nach dem Erreichen der maximalen optischen Dichte konstant (Abb. 3.11, A).

Beim Vergleich der pH-Werte sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Bei allen untersuchten clostridiellen Stämmen nahm der pH-Wert in der exponentiellen Wachstumsphase aufgrund der gebildeten Säuren ab. Durch die Re-assimilation der organischen Säuren zur Bildung der Lösungsmittel steigt der pH-Wert in allen Fällen geringfügig wieder an. Auffällig ist, dass die pH-Endwerte bei den clostridiellen Expressionsstämmen deutlich höher ausfallen, als bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Abb. 3.11, B).



**Abb. 3.11:** Vergleichende Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA (●), *C. acetobutylicum* pT\_hbd (○), *C. acetobutylicum* pT\_crt (□) und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB (Δ) im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm pT (▪) und zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (▲). Dargestellt ist der Verlauf der Optischen Dichte bei 600 nm (A) und des pH-Wertes (B). Die Kultivierungen erfolgten im 100 ml-Maßstab, gezeigt sind die Mittelwerte von drei Experimenten.

Bei der Analyse der in exponentiellen Wachstumsphase produzierten organischen Säuren Acetat und Butyrat können sowohl bei den clostridiellen Expressionsstämmen, als auch bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Butyrat wird in der stationären Wachstumsphase von allen clostridiellen Stämmen vollständig re-assimiliert (Abb. 3.12, B). Acetat hingegen wird nicht vollständig re-assimiliert, so dass zum Ende des Wachstumsverlaufes noch jeweils 6-20 mM Acetat in der Kultur verbleiben (Abb. 3.12, A). Bei den in der stationären Phase gebildeten Lösungsmitteln Ethanol, Aceton und Butanol können hingegen relevante Unterschiede identifiziert werden. Die Menge an produziertem Ethanol bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT liegt zwischen 29-52 mM, wohingegen die clostridiellen Expressionsstämme deutlich mehr Ethanol produzieren. Bei *C. acetobutylicum* pT\_ThIA ( $113 \text{ mM} \pm 2,1 \text{ mM}$ ) und bei *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB ( $99 \text{ mM} \pm 2,5 \text{ mM}$ ) kann die 2,5 fache Menge an Ethanol im Gegensatz zu den Kontrollstämmen detektiert werden. *C. acetobutylicum* pT\_hbd ( $162 \text{ mM} \pm 2,5 \text{ mM}$ ) und *C. acetobutylicum* pT\_crt ( $178 \text{ mM} \pm 3,9 \text{ mM}$ ) sind sogar in der Lage, die 3,5 fache Menge an Ethanol zu produzieren (Abb. 3.12, C). Bei der Produktion von Aceton ist ersichtlich, dass *C. acetobutylicum* pT\_crt ( $87 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ ) und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB

(82 mM $\pm$ 1,5 mM) durchschnittlich 10-20 mM mehr Aceton als *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm pT produzierten. Eine noch höhere Ausbeute kann bei *C. acetobutylicum* pT\_ *thl* (125 mM $\pm$ 1,2 mM) und *C. acetobutylicum* pT\_ *hbd* (104 mM $\pm$ 3,8 mM) detektiert werden. Hier liegt die Ausbeute durchschnittlich 30-50 mM höher als bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT (Abb. 3.12, D). Die Ausbeute an Butanol konnte durch die clostridiellen Expressionsstämmen um 20-40 mM gegenüber *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT gesteigert werden. Die durchschnittlichen und reproduzierbaren Butanolwerte liegen bei *C. acetobutylicum* pT\_ *thl*: ~185 mM, bei *C. acetobutylicum* pT\_ *hbd*: ~182 mM, bei *C. acetobutylicum* pT\_ *crt*: ~177 mM und bei *C. acetobutylicum* pT\_ *bcd\_etfA\_etfB*: ~163 mM (Abb. 3.12, E). Bei dem Verbrauch der Glukose ist ersichtlich, dass zum Ende der Lag-Phase alle clostridiellen Stämme mit der kontinuierlichen Glukosevergärung begonnen hatten. Kurz vor dem Erreichen der Absterbephase ist bei allen beschriebenen Stämmen nahezu die gesamte Glukose verbraucht. Es kann eine Restmenge von durchschnittlich 10 mM-15 mM detektiert werden (Abb. 3.12, F). Eine Zusammenfassung der Wachstumsparameter und der Gärungsendprodukte ist in Tabelle A2 (Anhang) dargestellt. Abschließend ist zu erwähnen, dass in keinen der untersuchten Stämme das Nebenprodukt Laktat enzymatisch nachgewiesen werden konnte.

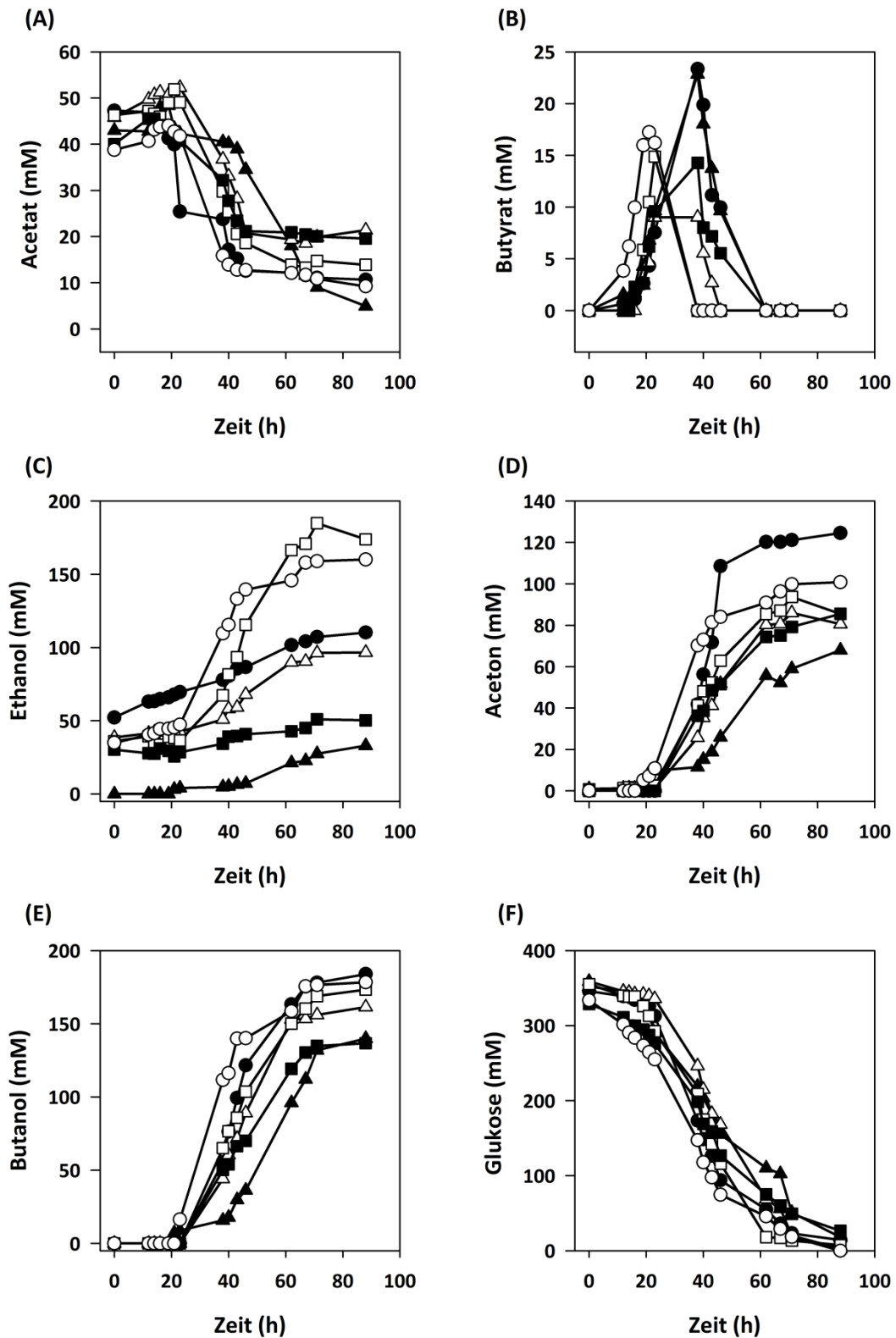


Abb. 3.12: Gärungsprodukte der Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pT\_thIA (●), *C. acetobutylicum* pT\_hbd (○), *C. acetobutylicum* pT crt (□) und *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB (△) im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm pT (■) und zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (▲). Dargestellt sind die Konzentrationen von Acetat (A), Butyrat (B), Ethanol (C), Aceton (D), Butanol (E) und der Glukoseverbrauch (F). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei Experimenten. Außer bei *C. acetobutylicum* ATCC 824, wurde allen Kulturen, Erythromycin, für die Sicherung der Plasmid-vermittelten Resistenz, zugegeben. Dies entsprach einer Konzentration von ca. 40 mM Ethanol zu Beginn des Wachstumsversuchs.



### 3.4 Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus *C. acetobutylicum*

Die Thiolase (Acetyl-CoA:Acetyl-CoA C-Acetyltransferase, EC 2.3.1.9) besitzt die Eigenschaft, die thermodynamisch ungünstige Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA durchzuführen. Durch geringe Konzentrationen von freiem CoA-SH wird eine Feedback-Inhibierung ausgelöst (WIESENBORN *et al.*, 1988). Um den Kohlenstofffluss durch den Acetoacetyl-CoA-abhängigen Übertragungsweg zu erhöhen, sollten optimierte Thiolaseenzyme generiert werden. Ziel war es, die Thiolaseaktivität so zu optimieren, dass die Inhibition durch freies CoA-SH gesenkt wird. Der traditionelle Antimetabolit-Ansatz zur Generierung von Feedback-Inhibitionsresistenten-Mutanten war nicht anwendbar, da keine adäquaten CoA-ähnlichen Moleküle an das Enzym binden (CHASE *et al.*, 1966; STRAUSS & BEGLEY, 2002). Ein weiterer Ansatz, die phänotypische Selektion wie das Thiolase-vermittelte Wachstum auf Buttersäure oder Nilrot-visualisierende Polyhydroxybutyrat-Akkumulation, konnte auf Grund von Ungenauigkeit nicht angewendet werden (SLATER *et al.*, 1992; RHIE & DENNIS, 1995; SPIEKERMANN *et al.*, 1999). Aus diesem Grund sollte die Thiolaseaktivität direkt gemessen werden, so dass ein Thiolase-Derivat mit einer verminderten CoA-SH Sensitivität ermittelbar war. Hierzu wurde eine *ThIA*-Mutanten-Bibliothek, welche in rekombinanten *E.coli*-Stämmen vorlag, enzymatisch untersucht.

#### 3.4.2 Charakterisierung von *E. coli* pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>WT</sup>

Um ein *ThIA*-Derivat mit einer verringerten Hemmbarkeit durch CoA-SH zu identifizieren, musste zunächst das Thiolase-WT-Gen biochemisch charakterisiert werden. Hierbei wurden die Charakterisierungen sowohl im Küvetten- als auch im Mikrotiterplattenformat (Kapitel 2.10.2.2) durchgeführt. Sowohl für die Charakterisierung, als auch für das Screening wurden *E. coli*-Stämme in Mikrotiterplatten mit 200 µl LB-Medium angezogen und 12 h nach Induktion mit Anhydrotetrazyklin geerntet. Die Expression ist mittels einer SDS-PAGE nachgewiesen worden (siehe Anhang, Abb. A4). Spezifische Aktivitäten sind photometrisch im Rohextrakt und in Mikrotiterplatten gemessen worden. Dieses Verfahren gewährleistete einen hohen Durchsatz an Enzymassays in kurzer Zeit. *thIA*-Derivate mit erhöhter Thiolase-Aktivität in Gegenwart von CoA-SH wurden einem weiteren Enzymassay im Küvettenformat

unterzogen. Dies diente dem Ausschluss von falsch-positiven Ergebnissen. Hierfür sind die *E. coli*-Stämme in 50 ml LB-Medium angezogen und wie oben beschrieben behandelt worden. Für das Screenings wurden die Thiolaseaktivitäten mittels der Kondensationsreaktion bestimmt (WIESENBORN *et al.*, 1988; mod.). Bei dieser Reaktion werden zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA und schließlich zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert, wobei die NADPH-Abnahme photometrisch ermittelt wird (Abb. 3.13).

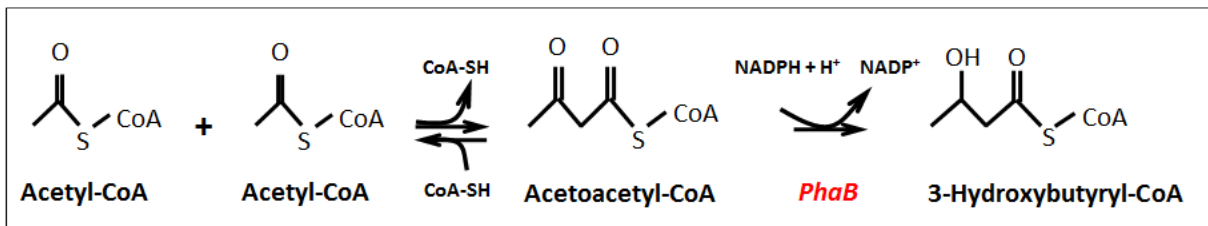


Abb. 3.13: Reaktionsschema des gekoppelten *phaB* / Thiolase-Assays

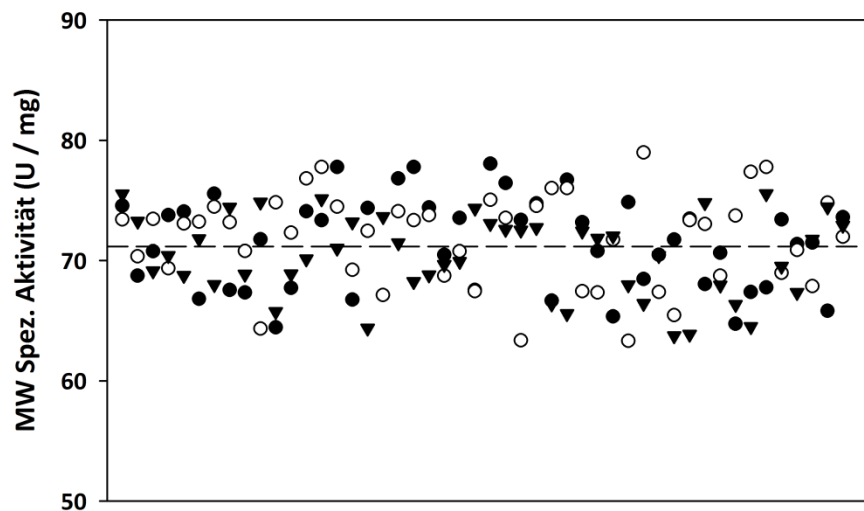
Eine Acetoacetyl-CoA Reduktase, welche für den Enzymassay notwendig ist, ist kommerziell nicht erhältlich. Daher fand die *phaB*-kodierte Acetoacetyl-CoA Reduktase aus *R. eutropha* Anwendung (BUDDE *et al.*, 2010). Die spezifische Aktivität (U/mg) der Acetoacetyl-CoA Reduktase von *E. coli* Tuner (DE3) pET 15b\_ *phaB1* musste bestimmt werden, damit in den späteren Enzymassays eine definierte Menge an Enzym (2 Units) pro Reaktion eingesetzt werden konnte. Des Weiteren sollten mögliche natürliche Enzymaktivitäten in den *E. coli* Wirtszellen kontrolliert werden. Hierfür mussten sowohl *phaB*- als auch *thIA*-Aktivitäten in Rohextrakten von *E. coli* pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>WT</sup>, *E. coli* Tuner (DE3) pET15b\_ *phaB1* und dem Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3 bestimmt werden. Neben der Kondensationsreaktion wurde auch die thiolytische Spaltungsreaktion durchgeführt, um die *ThIA*-Aktivitäten zu bestimmen (WIESENBORN *et al.*, 1988). Anhand von Tabelle 3.5 ist ersichtlich, dass die Heterologe *phaB1*-Expression von *R. eutropha* in 34,3±1,4 U/mg Aktivität von der NADPH-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase aus Zellextrakten von *E. coli* Tuner (DE3) pET15b\_ *phaB1* resultiert. Von den anderen untersuchten Stämmen zeigte keiner eine spezifische Acetoacetyl-CoA Reduktase Aktivität. Bei dem Nachweis der Thiolase-Aktivität (Thiolytische Spaltung und Kondensationsreaktion) zeigt der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>WT</sup> bei der thiolytischen Spaltung eine spezifische Aktivität von 65,94±4,61 U/mg und bei der Kondensationsreaktion eine spezifische Aktivität von 65,94±4,61 U/mg. Eine spezifische Thiolase-Aktivität ist bei den anderen untersuchten Stämmen nicht nachweisbar.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die *E. coli* Wirtszellen weder eine Thiolase noch eine Acetoacetyl-CoA Reduktase Aktivität aufweisen. Dadurch ist eine adäquate Basis für das Rekombinante-Aktivitäts-Screening geschaffen worden.

**Tab. 3.5: Enzymaktivitäten in Rohextrakten von *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3\_ *thIA* und *E. coli* Tuner (DE3) pET-15b\_ *phaB1* im Vergleich zum Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3.** Zur Messung der Thiolase - Aktivität wurde sowohl die thiolytische Spaltung, als auch die Kondensationsreaktion durchgeführt (WIESENBORN *et al.*, 1988). Dargestellt sind die Mittelwerte von je drei Replikaten.

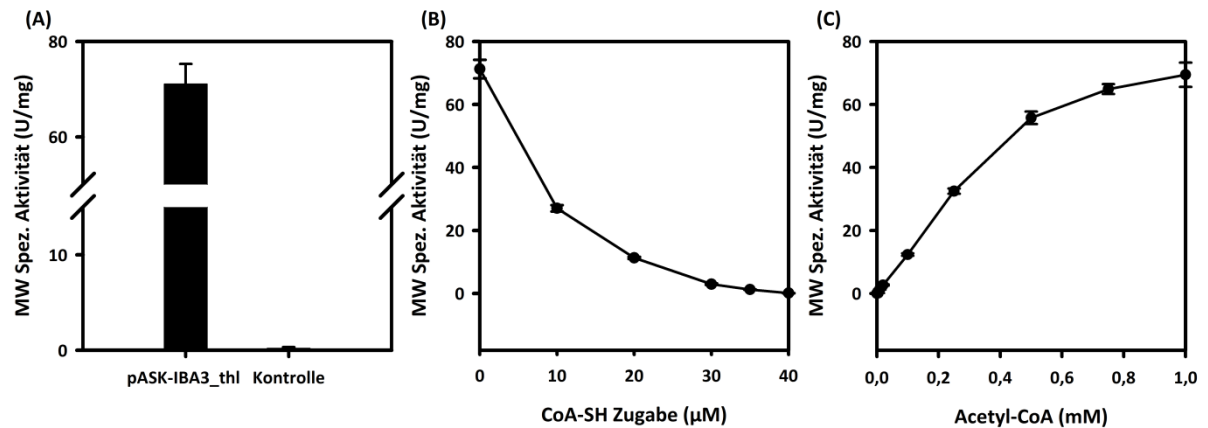
Stamm	Acetoacetyl-CoA Reduktase ( <i>PhaB</i> ) Aktivität (U/mg)		Thiolase ( <i>ThIA</i> ) Aktivität (U/mg)	
	NADH	NADPH	Thiolytische Spaltung	Kondensationsreaktion
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pASK-IBA3 (Kontrolle)	0,03±0,02	0,02±0,01	0,08±0,04	0,2±0,09
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pASK-IBA3_ <i>thIA</i> <sup>WT</sup>	0,05±0,03	0,73±0,09	65,94±4,61	59,84±3,79
<i>E. coli</i> Tuner (DE3) pET15b_ <i>phaB1</i>	0,15±0,02	34,27±1,43	0,02±0,003	0,3±0,11

Im weiteren Charakterisierungsverfahren wurde die Reproduzierbarkeit des gekoppelten *PhaB*/Thiolaseassay (Kondensationsreaktion der Thiolase) in 96-Well-Mikrotiterplatten untersucht (2.10.2.2). Hierfür wurden die Enzymtests in jeweils 48 einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Wie aus Abbildung 3.14 zu entnehmen ist, lässt sich der gekoppelte *PhaB*/Thiolaseassay sehr gut reproduzieren. Die spezifischen Aktivität von *E. coli* pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>WT</sup> lagen zwischen 64 und 77 U/mg, was einem Durchschnitt von 71±4 U/mg und einer Standardabweichung von nur 5,2 % ( $n=144$ ) entspricht. Es ist jedoch anzumerken, dass es auf Grund von Verdunstungserscheinungen in den randständigen Wells zu signifikant veränderten Ergebnissen kommen kann. Daher sollten bei der Beimpfung einer 96-Well-Mikrotiterplatte die peripheren Wells ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.14: Gekoppelter *PhaB*/Thiolaseassay in 96-Well-Mikrotiterplatten.** Die spezifische Aktivität (U/mg) wurde mit Hilfe der Extinktionsdifferenzen pro Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) und den entsprechenden Proteingehalten bestimmt. Die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert aller Proben dar. Definiert ist eine Einheit Thiolase-Aktivität als der Umsatz von einem Millimol NADPH pro Minute. Der Proteingehalt des Rohextrakts lag bei 0,8 mg/ml, für die Aktivitätsmessung wurden 2 U *PhaB* eingesetzt. Gezeigt sind die Ergebnisse von jeweils 48 einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte von drei unabhängigen Versuchen (●: 1. Versuch; ▼: 2. Versuch; ○: 3. Versuch).

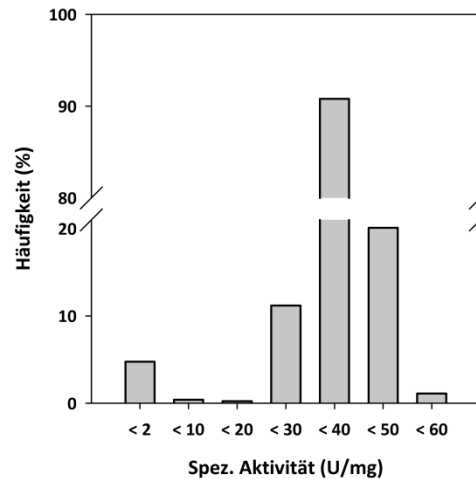
Basierend auf den durchgeführten Assays konnten die Testansätze mit steigenden Konzentrationen an freiem CoA-SH versetzt werden. Hierbei führt freies CoA-SH bereits im mikromolaren Bereich zu einer Inhibierung der Thiolaseaktivität. 10  $\mu\text{M}$  CoA-SH führt zu einer Inhibierung von über 50 % der Thiolaseaktivität, 30  $\mu\text{M}$  CoA-SH inhibiert die Thiolase nahezu vollständig (Abb. 3.15 B). Bei einer Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  CoA-SH zum Reaktionsansatz, lag die spezifische Aktivität bei  $27 \pm 1$  U/mg. Infolgedessen wird der Mittelwert von den *C. acetobutylicum* WT Thiolase-Aktivitäten aus den Zellextrakten der rekombinanten *E. coli* als Referenzwert für das nachfolgende Screening verwendet. Bei der Analyse der Substratabhängigkeit (Acetyl-CoA) werden antonyme Ergebnisse erzielt, denn mit zunehmender Acetyl-CoA-Konzentration steigt auch spezifische Aktivität (U/mg) der Thiolase. Mit einem 1 mM Acetyl-CoA erreicht man die maximale Aktivität der Thiolase (Abb. 3.16 C). Daher wird diese Menge an Acetyl-CoA im anschließenden Screening eingesetzt. Eine Thiolaseaktivität von dem Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3 konnte ausgeschlossen werden (Abb. 3.15, A).



**Abb. 3.15: Thiolaseaktivitäten in Rohextrakten von *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3\_ThIA.** (A) Vergleich zwischen pASK-IBA3\_ThIA und Vektorkontrolle (pASK-IBA3). Die Messungen erfolgten in 96-Well-Mikrotiterplatten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 48 Messungen und 12 Messungen der Vektorkontrolle. (B) Inhibierung der spezifischen Aktivität durch freies CoA-SH. (C) Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Substratkonzentration.

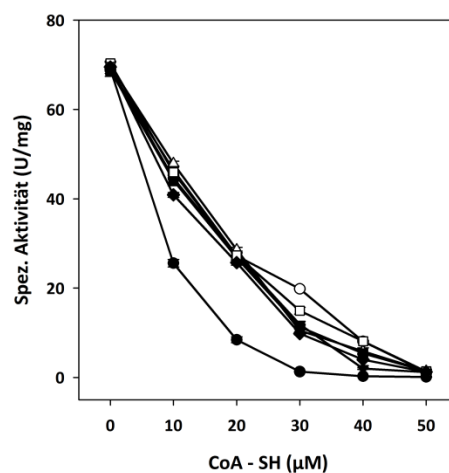
### 3.4.3 Charakterisierung von *E. coli* pASK-IBA3\_ThIA<sup>MUT</sup>

Die mutagenisierten *thIA*-Derivate (pASK-IBA3\_ThIA<sup>MUT</sup>) lagen in *E. coli* BL21-DE3 vor und sind mit Hilfe des gekoppelten photometrischen *PhaB*/Thiolaseassays in 96-Well-Mikrotiterplatten analysiert worden (2.10.2.2). Die Thiolase-Aktivitäten in den Rohextrakten wurden vergleichend ohne und mit 10 μM CoA-SH Zugabe bestimmt. Ziel hierbei war es pASK-IBA3\_ThIA-Klone mit einer reduzierten CoA-Sensitivität zu detektieren. Von insgesamt 1620 untersuchten pASK-IBA3\_ThIA<sup>MUT</sup>-Klonen konnten bei 14 pASK-IBA3\_ThIA<sup>MUT</sup>-Klonen eine signifikant erhöhte Thiolaseaktivität in Gegenwart von 10 μM CoA-SH festgestellt werden. In diesen Fällen liegt die spezifische Aktivität (U/mg) deutlich über den Durchschnittsaktivitäten von 30-40 U/mg und entspricht somit einer Erhöhung von > 150 % im Gegensatz zur Aktivität von ThIA<sup>WT</sup> in der Gegenwart von CoA-SH. Zudem konnten 60 pASK-IBA3\_ThIA<sup>MUT</sup>-Klone verifiziert werden, welche gar keine Thiolase-Aktivitäten mehr aufweisen (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Häufigkeitsverteilung der Thiolase-Aktivitäten (U/mg) in Gegenwart von 10 µM CoA-SH.** Insgesamt wurden 1620 *thIA*-Klonen untersucht. Die Messungen erfolgten in 96-Well-Mikrotiterplatten.

Um die Ergebnisse der 14 pASK-IBA3\_*thIA*<sup>MUT</sup>-Klone mit signifikant reduzierter CoA-Sensitivität zu bestätigen, sind die spezifischen Aktivitäten in den Rohextrakten der *ThIA*-Klone im Küvettenformat erneut bestimmt worden. Keine der *thIA*<sup>MUT</sup>-Varianten zeigten eine erhöhte allgemeine Thiolaseaktivität (ohne CoA-SH), jedoch konnten Unterschiede in der Gegenwart von 10 µM-50 µM CoA-SH festgestellt werden. 8 Klone zeigten eine ähnliche Aktivität bei den verschiedenen CoA-SH Konzentrationen wie *thIA*<sup>WT</sup> (siehe Anhang, Abb. A2). Die Klone 9G4, 13D7, 19C10, 21B8, 25C8 und 28C9 hingegen wiesen eine signifikant erhöhte Thiolaseaktivität in Gegenwart von CoA-SH auf (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Spezifische Thiolase-Aktivitäten (U/mg) in Gegenwart von 0 µM-50 µM CoA-SH.** Untersucht wurden pASK-IBA3\_*thIA*<sup>19C10</sup> (○), pASK-IBA3\_*thIA*<sup>25C8</sup> (◆), pASK-IBA3\_*thIA*<sup>21B8</sup> (▼), pASK-IBA3\_*thIA*<sup>28C9</sup> (Δ), pASK-IBA3\_*thIA*<sup>13D7</sup> (□), pASK-IBA3\_*thIA*<sup>9G4</sup> (▪) im Vergleich zu pASK-IBA3\_*thIA*<sup>ATCC 824</sup> (●). Die Messungen erfolgten in Küvetten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Messungen.

Eine anschließende Sequenzierung der Plasmide legte offen, dass alle 6 positiven Klone dieselben Genotypen aufwiesen, so dass nur ein neuer *thIA*<sup>MUT</sup>-Derivat isoliert wurde. Folgende AS-Substitutionen haben in allen sechs Fällen stattgefunden: R133G, H156N und G222V (siehe Anhang, Abb. A3). Klon 9G4 ist als repräsentativer Klon für nachfolgende Experimente ausgewählt worden und wird fortlaufend als *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>Derivat</sup> bezeichnet.

#### **3.4.4 Charakterisierung von *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA*<sup>Derivat</sup>**

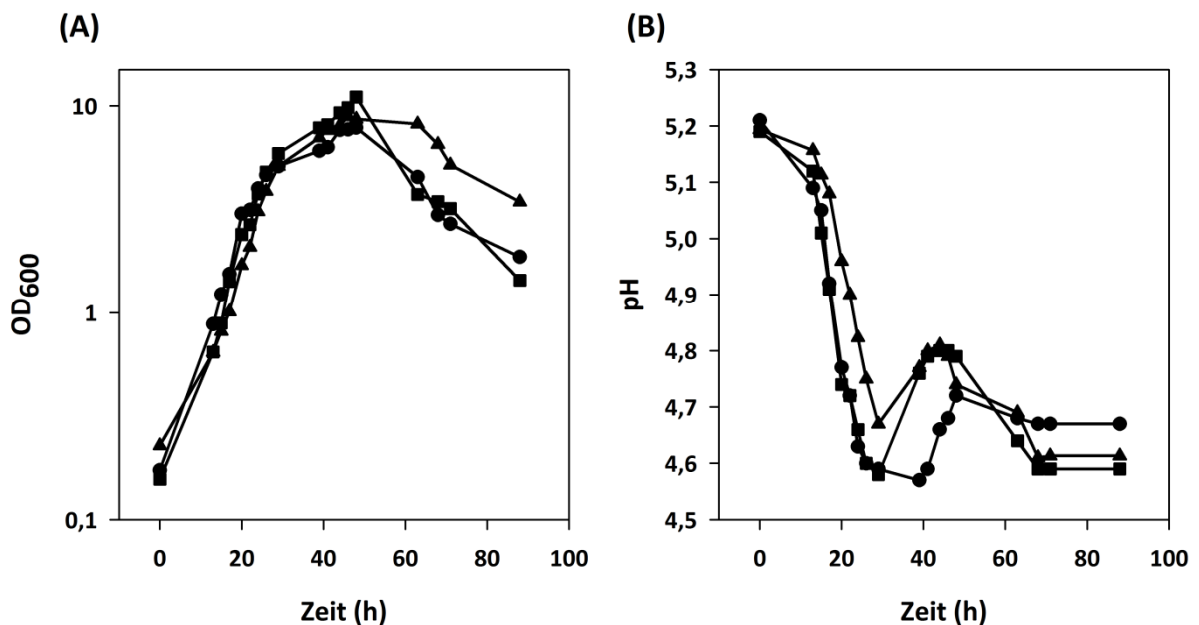
Um die Auswirkung der signifikant reduzierten CoA-SH Sensitivität von *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>Derivat</sup> zu untersuchen, wurde das *thIA*<sup>Derivat</sup>-Gen in den pT-Vektor kloniert und in *C. acetobutylicum* ATCC 824 re-transformiert. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *KpnI* konnten die *thIA*<sup>Derivate</sup> aus dem pASK-IBA3-Vektor restriktiert werden. Eine T4-Polymerase erstellte sog. „blunt-ends“ an den DNA Fragmenten. Mit Hilfe dieser konnten die *thIA*<sup>Derivat</sup>-Gene in den pT-Vektor kloniert werden. Um die Orientierung der Gene im Plasmid zu kontrollieren, wurden Kontrollrestriktionen mit der Restriktionsendonuklease *SacI* durchgeführt. Nach der Transformation in *C. acetobutylicum* ATCC 824 erhielt der Stamm die Bezeichnung *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA*<sup>Derivat</sup>. Er wies eine durchschnittliche Thiolase-Aktivität von  $53,03 \pm 0,63$  U/mg auf, wohingegen *C. acetobutylicum* ATCC 824 eine spezifische Aktivität von  $32,04 \pm 1,02$  und der Vektorkontroll-Stamm pT von  $28,22 \pm 0,68$  U/mg aufzeigte.

##### **3.4.4.1 Wachstum von *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA*<sup>Derivat</sup>**

Um die Auswirkung der AS-Substitution der clostridiellen Thiolase in Bezug auf die Produktbildung näher charakterisieren zu können, wurde der homologe Expressionsstamm einer physiologischen Charakterisierung unterzogen. Hierzu erfolgte während des Wachstumsverlaufes in MS-MES mit Glukose als Kohlenhydratquelle zuerst die kontinuierliche Messung der optischen Dichte und des pH-Wertes (Abb. 3.18).

Bei der Analyse der optischen Dichte konnte sowohl bei *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA*<sup>Derivat</sup> und *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA*<sup>WT</sup> ein ähnliches Wachstumsverhalten in 200 ml MS-MES wie beim

Vektorkontroll-Stamm pT festgestellt werden. In allen drei Fällen ist nach einer kurzen lag-Phase die exponentielle Wachstumsphase schnell erreicht, welche nach ~35 h von der stationären Wachstumsphase abgelöst wird. Hierbei ist auffallend, dass *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> (OD<sub>600</sub> = 11) eine deutlich höhere optische Dichte erreicht, als *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> (OD<sub>600</sub> = 7,8) und der Vektorkontroll-Stamm pT (OD<sub>600</sub> = 8,8). Weiterhin zeigen die beiden homologen ThIA-Expressions-Derivate eine deutlich stärkere Abnahme der optischen Dichte in der Absterbephase, als der Vektorkontroll-Stamm pT (Abb. 3.18, A). Hinsichtlich des Verlaufes des pH-Wertes sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Bei den untersuchten clostridiellen Stämmen kommt es aufgrund der Säurebildung in der exponentiellen Wachstumsphase zu einer deutlichen pH-Wert Abnahme. Die anschließende Lösungsmittelbildung in der stationären Wachstumsphase führte wiederum zu einem Anstieg des pH-Wertes. Der pH-Endwert von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> fällt geringfügig höher aus als bei den beiden clostridiellen Referenzstämmen (Abb. 3.18, B).



**Abb. 3.18:** Vergleichende Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> (●) im Vergleich zum *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> (■) und zum Vektorkontroll-Stamm pT (▲). Dargestellt ist der Verlauf der Optischen Dichte bei 600 nm (A) und des pH-Wertes (B). Die Kultivierung erfolgte im 200 ml-Maßstab, gezeigt sind die Mittelwerte von drei Experimenten.



#### 3.4.4.2 Produktbildung von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup>

Um die reduzierte CoA-SH Sensitivität in *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> näher charakterisieren zu können, sind neben der Wachstumsanalyse (3.4.4.1) auch eine Analyse der gebildeten Gärungsprodukte durchgeführt worden. Die Menge der Gärungsendprodukte sind Tabelle A3 (Anhang) zu entnehmen.

Beim Verlauf der Produktion der Gärungsprodukte ist zu erkennen, dass in der exponentiellen Phase die Säuren Acetat und Butyrat gebildet werden. Diese werden in der anschließenden stationären Phasen fast vollständig re-assimiliert. Zum Ende des Wachstumsversuches verbleiben bei *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> und dem Vektorkontroll-Stamm pT 10-12 mM Acetat im Medium (Abb. 3.19, A). Bei *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>MUT</sup> ist jedoch noch die doppelte Menge an Acetat detektierbar (24 mM). Bei Butyrat ist zu erkennen, dass dieses von allen Kulturen vollständig re-assimiliert wird (Abb. 3.19, B). Bei der Produktion der Lösungsmittel sind weitaus signifikantere Unterschiede vorhanden. Der Vektorkontroll-Stamm pT ist lediglich in der Lage, 89±1,0 mM Ethanol zu produzieren, wohingegen *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> deutlich mehr Ethanol (124±3,2 mM) produziert. Der veränderte ThIA-Stamm (*C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup>) produziert signifikant mehr Ethanol (109±2,5) als der Vektorkontroll-Stamm pT, jedoch weniger als *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> (Abb. 3.19, C). Daher produziert *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> ~8,4 % weniger Ethanol als *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup>. In der Produktion von Aceton liegen bei allen drei clostridiellen ÜE-Stämmen keine signifikanten Unterschiede vor (Abb. 3.19, D). Hier liegt die Gesamtmenge an Aceton zwischen 77-82 mM. Die Menge an produziertem Butanol variiert jedoch erheblich zwischen den untersuchten Stämmen. Der Vektorkontroll-Stamm pT ist in der Lage 142±1,9 mM Butanol zu produzieren, wohin gegen *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> bis zu ~13 % (161±0,5) mehr Butanol produzieren kann. *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> ist sogar in der Lage, bis zu ~18 % mehr Butanol als der Vektorkontroll-Stamm pT zu produzieren (Abb. 3.19, E). Das vorhandene Kohlenhydrat Glukose, welches als C-Quelle zur Verfügung steht, wird von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>WT</sup> und *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> während des Wachstumsverlaufs nahezu vollständig verbraucht. Beim Vektorkontroll-Stamm pT konnte zum Ende des Wachstumsversuches noch ~55 mM Glukose nachgewiesen werden (Abb. 3.19, F). Des Weiteren sind alle drei clostridiellen Stämme nicht in der Lage, die organische Säure Laktat zu bilden.

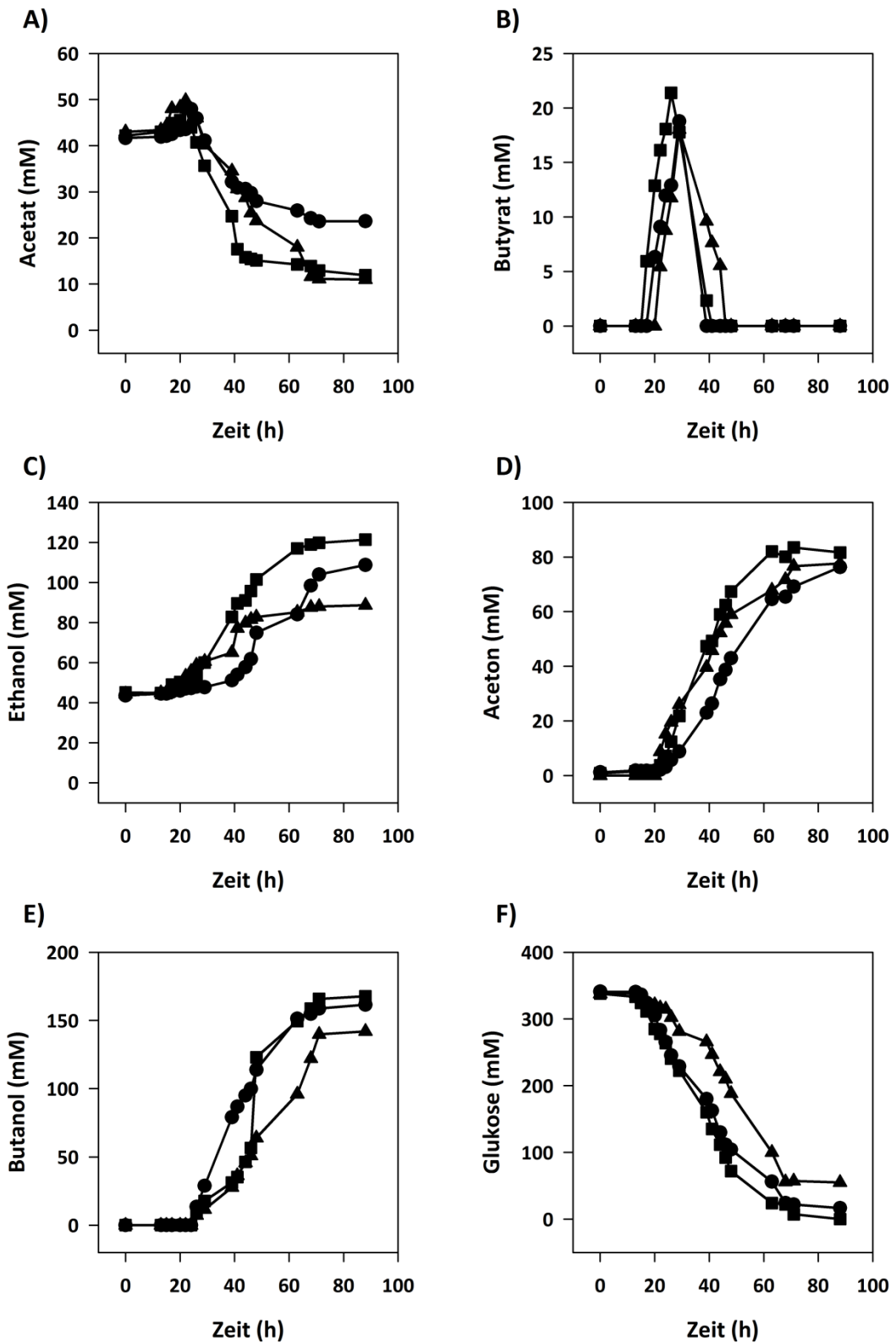


Abb. 3.19: Gärungsprodukte der Kultivierungsexperimente von *C. acetobutylicum* pT<sub>thIA</sub><sup>MUT</sup> (●) im Vergleich zum *C. acetobutylicum* pT<sub>thIA</sub><sup>ATCC 824</sup> (◻) und zum Vektorkontroll-Stamm pT (▲). Dargestellt sind die Konzentrationen von Acetat (A), Butyrat (B), Ethanol (C), Aceton (D), Butanol (E) und der Glukoseverbrauch (E). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei Experimenten. Allen Kulturen wurde Erythromycin, für die Sicherung der Plasmid-vermittelten Resistenz, zugegeben. Dies entsprach einer Konzentration von ca. 40 mM Ethanol zu Beginn des Wachstumsversuchs.

## 4 Diskussion

Das Bakterium *C. acetobutylicum* ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt und wird durch seine Fähigkeit Lösungsmittel zu bilden, aus ökonomischer und ökologischer Sicht immer wertvoller und ist somit jetzt schon zu einer der am besten untersuchten Clostridien-Arten geworden (DÜRRE, 2007). Gerade die Produktion von biologisch hergestelltem Butanol, welches Anwendung als Bio-Kraftstoff findet, rückt erneut wieder in den Fokus der Wissenschaft. Bis zum Ende der 60er Jahre wurde die billige petrochemische Herstellung von Butanol dem clostridiellen ABE Fermentationsprozess vorgezogen (NI & SUN, 2009). Erst durch den erhöhten Bedarf an Öl und den steigenden Erdölpreisen wächst das Interesse wieder. Biobutanol hebt sich aufgrund einiger klarer Vorteile gegenüber anderen alternativen Kraftstoffen deutlich ab. Es besitzt eine höhere Energiedichte als Ethanol, ist weniger korrosiv und weist einen niedrigeren Dampfdruck als Ethanol auf. Zudem ist es nicht mit Wasser mischbar, so dass keine Phasentrennung von Biokraftstoff und Benzin entstehen kann. Die genannten Eigenschaften machen es möglich Biobutanol direkt in der Raffinerie zuzusetzen und durch die bestehende Infrastruktur (Pipeline, Tanklager, Abfüllstationen) zu transportieren und zu liefern (DÜRRE, 2008). Aufgrund der positiven Eigenschaften von Biobutanol und stetig steigender Nachfrage wurde seit den letzten zwei Jahrzehnten durch genetische Modifikation versucht, die Lösungsmittelausbeute von *C. acetobutylicum* zu erhöhen (u.a. GIRBAL *et al.*, 1995; GIRBAL & SOUCAILLE, 1998; TUMMALA *et al.*, 1999; TUMMALA *et al.*, 2003; HEAP *et al.*, 2007; SILLERS *et al.*, 2008). Die hohe Toxizität von Butanol bedingt jedoch nur eine maximale Butanolausbeute von 13 g/l aus *C. acetobutylicum* (JONES & WOODS, 1986). Der gravierendste Einfluss von hohen Butanolkonzentrationen auf die Zelle, ist die Zerstörung der cytoplasmatischen Membran und anderen Makromolekülen, so dass die vitalen Funktionen des Organismus verloren gehen (BOWLES & ELLEFSON, 1985; TAYLOR *et al.*, 2008; EZEJI *et al.*, 2010). Auf molekularer Ebene führt die Produktion von Butanol zu Stress für den Organismus. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe des Metabolic Engineering clostridielle Stämme mit verbesserter Resistenz gegenüber Butanol erzeugt werden. Zudem zählte auch die Veränderung des metabolischen Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* in Bezug auf ein verbessertes Substrat:Produkt-Verhältnis. Diese Arbeiten wurden mit Hilfe des pT-Vektors durchgeführt, denn dieser stellt

eine ideale Methode zur homologen genspezifischen Expression dar (GIRBAL *et al.*, 2005; HILLMANN *et al.*, 2009).

## **4.1 Stabilitätserhöhung von in *C. acetobutylicum* exprimierten Proteinen durch die Co-Expression von Chaperonen**

### **4.1.1 Butanolresistenz**

Es konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die homologe Expression des polycistronischen *groESL*-Operons in *C. acetobutylicum* sowohl zu einer verbesserten Butanolresistenz, als auch zu einer erhöhten Butanolproduktion führt (TOMAS *et al.*, 2003). *C. acetobutylicum* pT\_*groESL* zeigte in den Arbeiten von TOMAS *et al.* (2003) eine 85%ig reduzierte Wachstumsinhibierung in Gegenwart von Butanol im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm. Diese Ergebnisse von TOMAS *et al.* (2003) sind allerdings mit der hier vorliegenden Arbeit nicht vollends vergleichbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass u.a. in der hier vorliegenden Arbeit weitaus höhere Butanolkonzentrationen verwendet wurden. Ebenso wurde die Überlebensrate mittels Butanol-behandelter CFUs als Parameter verwendet, während TOMAS *et al.* (2003) vergleichend dazu die Wachstumsrate nach der Butanolexposition bestimmten. Nichtsdestotrotz stellt *C. acetobutylicum* pT\_*groESL* einen sehr guten Vergleichsstamm dar, so dass dieser selbständig generiert und als Positivkontrolle für alle weiteren Experimente verwendet wurde. Transkriptomdaten offenbarten, dass nicht nur *groESL* sondern auch die Chaperone *grpE* und *htpG* nach Butanolstress signifikant induziert sind (TOMAS *et al.*, 2004). Interessantweise sind diese Chaperone auch in *C. acetobutylicum* Rh8, ein mutierter Stamm mit verbesserter Butanoltoleranz und -produktion, hoch reguliert (MAO *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Information, wurden in dieser Arbeit die Chaperone *grpE* und *htpG* in *C. acetobutylicum* homolog co-exprimiert und die Auswirkungen in Bezug auf die Butanolresistenz bzw. -produktion hin untersucht.

Interessanterweise wiesen auch die jeweiligen homologen Co-Expressionen von *grpE* und *htpG* eine signifikant erhöhte Butanolresistenz in *C. acetobutylicum* auf (Abb. 3.5). Diese verbesserte Resistenz gegenüber Butanol wird durch die vermehrte Expression der Stressproteine GrpE bzw. HtpG ausgelöst. Im Allgemeinen nehmen diese Genprodukte eine schützende Funktion gegenüber verschiedensten Stresseinflüssen ein. Es konnte bereits

gezeigt werden, dass eine Co-Expression verschiedener Chaperone (*hsp 18.5*, *hsp 18.55* und *hsp 19.3*) in *Lactobacillus plantarum* sowohl zu einer verbesserten Anpassung an Hitze und Kälte, als auch zu einer verbesserten Butanolresistenz führte (FIOCCO *et al.*, 2007). Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine lang anhaltende Butanolexposition zur Reduktion der Lebendzellzahlen der jeweiligen Co-Expressionsstämme führen. Hierbei wiesen jedoch die clostridiellen Expressionsstämme deutlich mehr lebende Zellen nach 6 stündiger Inkubation auf, als *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm pT (Abb. 3.6). Die Abnahme der überlebenden Zellen nach einer längeren Butanolexposition wird durch den chaotropischen Effekt des Butanols bedingt. Der Einfluss des inhibitorischen Effektes von Butanol auf die Zellmembran wurde schon früh postuliert. Die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Zellmembran werden durch Butanol zerstört, was zu einer veränderten Membran-Fluidität führt (GHESLAGHI *et al.*, 2009; EZEJI *et al.*, 2010). Dies bedingt eine veränderte Zusammensetzung der Membranlipide, was wiederum eine starke Veränderung der verzweigten und unverzweigten Fettsäuren nach sich zieht (VOLLHERBST-SCHNECK *et al.*, 1984; BOWLES *et al.*, 1985; BAER *et al.*, 1987). Bereits in *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass verzweigt-kettige Fettsäuren für die Stabilität der Membran verantwortlich sind (MANSILLA *et al.*, 2004). Zudem ist bekannt, dass der erste Schritt der Glukoseaufnahme durch eine Butanolzugabe inhibiert wird, was zu einer Schwächung der Glykolyse und somit zur Zellabnahme führt (HUTKINS & KASHKET, 1986).

#### **4.1.2 Butanolproduktion**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verbesserte Butanolresistenz durch die Co-Expression der Chaperone *GrpE* und *HtpG* in *C. acetobutylicum* erreicht werden kann. Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Co-Expression der genannten Chaperone auch auf die Butanolproduktion in *C. acetobutylicum* auswirkt. Um dies zu analysieren, ist das Mineralsalzmedium MS-MES für die Kultivierungsexperimente verwendet worden. Bei diesem Medium handelt es sich um ein synthetisches Minimalmedium mit einem Überschuss an Glukose und zusätzlichem Acetat (ca. 40 mM). In der Literatur wird beschrieben, dass dieses Medium zu einer verbesserten Lösungsmittelbildung und Sporulation in *C. acetobutylicum* führt (MONOT, 1982; RIEGER, 2006). Im Gegensatz zu den

Ergebnissen von TOMAS *et al.* (2003), führte die Co-Expression des polycistronischen Operons *groESL* in dieser Arbeit zu keiner erhöhten Lösungsmittelausbeute. Die Ergebnisse waren mit den Werten von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT vergleichbar. Eine mögliche Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse ist das Kultivierungsmedium, da TOMAS *et al.* (2003) „clostridial growth medium“ (CGM) verwendeten. Hierbei handelt es sich um ein Komplexmedium, welches auf Grund seiner Zusammensetzung für eine schnelle und hohe Wachstumsdichte der Zellen sorgt. Durch die hohe Zellzahl kommt es zu einer erhöhten Menge an GroES- und GroEL-Proteine, welche eine verbesserte Lösungsmittelbildung bedingen. Weiterhin auffällig war, dass *C. acetobutylicum* pT\_*grpE* ein deutlich verzögertes und limitiertes Wachstum in MS-MES, jedoch nicht in CGM, aufwies. Dies führt zu der Annahme, dass dem Stamm im MS-MES-Medium einer wesentlicher Bestandteil für eine hinreichende Zellteilung fehlte. Dieses Defizit wird in CGM durch das Hefeextrakt ausgeglichen. Die Kultivierungsexperimente wurden trotzdem in MS-MES-Medium durchgeführt, um eine vergleichbare Ebene zur Beurteilung der Butanolproduktion in den untersuchten Stämmen, zu schaffen. Neben dem langsamen Wachstum von *C. acetobutylicum* pT\_*grpE*, produzierte dieser Stamm nur geringe Mengen an Lösungsmittel (50 % Butanol, 50 % Ethanol und 75 % Aceton verglichen mit den Werten von *C. acetobutylicum* ATCC 824). Zudem häuften sich die organischen Säuren während des Wachstumsverlaufes an, so dass ca. 90 % mehr an Acetat und Butyrat, im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT, detektierbar waren. Dieses Produktionsverhalten lässt sich mit dem sog. Lösungsmittelshift erklären. Normalerweise führt die Produktion der organischen Säuren zu einem pH-Abfall in der exponentiellen Wachstumsphase. Während der stationären Wachstumsphase werden die gebildeten Säuren in die Lösungsmittel Ethanol, Aceton und Butanol umgewandelt, was einen leichten Anstieg des pH-Werts zur Folge hat. Wie an Abbildung 3.3 B erkennbar ist, sinkt der pH-Wert von *C. acetobutylicum* pT\_*grpE* während des gesamten Kultivierungsexperimentes. Da die Zellen aufgrund ihres langsamen Wachstums die stationäre Wachstumsphase nicht erreichen können, findet kein klassischer Lösungsmittelshift statt. Dies hat zur Folge, dass sich die vorhandenen organischen Säuren ansammeln, weil sie nicht vollständig in Lösungsmittel umgewandelt werden können. Interessanterweise führt trotz seiner verbesserten Resistenz gegenüber Butanol, der Stamm *C. acetobutylicum* pT\_*htpG* zu keiner erhöhten Butanolproduktion (ca. 25 % weniger als

*C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm pT) und das obwohl keine Abweichungen im Wachstum und im Verlauf des pH-Wertes erkennbar waren. Dieses Produktionsverhalten kann abschließend nicht geklärt werden.

#### 4.1.3 Butanoladaption

Im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT zeigten die clostridiellen Expressionsstämme (*C. acetobutylicum* pT\_htpG und *C. acetobutylicum* pT\_grpE) eine verbesserte Resistenz gegenüber Butanol. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die co-exprimierten Stämme eine erhöhte Überlebensrate bei sich wiederholenden Butanolstress-Experimenten aufwiesen (Abb. 3.7). Dieses Phänomen lässt die Hypothese zu, dass die clostridiellen Expressionsstämme einen Mechanismus haben, der zu einer effizienteren Adaption an Butanol führt. So entsteht die Frage, ob die Plasmide durch das Butanol mutiert oder sich die gesamten Zellen verändert haben. Daher wurden nach jedem Butanolstress-Experiment die Plasmide isoliert und sequenziert. Es ergab sich jedoch keine Veränderung auf der Ebene der Basenpaarsequenz, welche zu einer veränderten Aminosäuresequenz geführt hätte. Trotzdem kann eine Veränderung auf dem Genom nicht ausgeschlossen werden, auch wenn eine gleiche Mutation in allen Stämmen als sehr unwahrscheinlich gilt. Um dies näher untersuchen zu können, müsste eine Sequenzierung des gesamten Genoms der jeweiligen Stämme durchgeführt werden. Die Unterschiede zwischen den Butanol-gestressten Zellen und den Kontrollkulturen führen zu der Annahme, dass die vermehrte Expression von Chaperonen zu einem positiven Einfluss in Bezug auf die Butanoladaption führt. Die sich wiederholenden Butanolstress-Experimente üben einen gerichteten evolutionären Druck auf die Zellen aus, welcher nur durch das vermehrte Vorhandensein der Chaperone standgehalten werden kann. Die schützende Funktion der Chaperone gegenüber dem Stressor Butanol bedingt die Anpassung an den evolutionären Druck. Der exakte Mechanismus ist jedoch noch nicht völlig verstanden. Andererseits ist es möglich, dass die untersuchten Expressionsstämme mehr gesättigte als ungesättigte Fettsäuren bildet. Dies würde bedeuten, dass die Membranstabilität erhöht ist und somit eine verbesserte Butanoladaption gewährleistet ist (BAER *et al.*, 1987). Um die Auswirkung der Chaperon-Expression auf die Membranstabilität der Zellen zu analysieren, müssten Untersuchungen zur Fettsäurezusammensetzung nach BAER *et al.* (1987)

durchgeführt werden. Da die Stressantwort in *C. acetobutylicum* auf der Ebene der Transkription reguliert ist (BAHL *et al.*, 1995), kann man den komplexen Regulationsmechanismus der Zelle erst dann verstehen, wenn Microarray-Analysen durchgeführt wurden. Mit Hilfe dieser Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass Chaperone in einer kontinuierlichen Kultur dauerhaft, als Folge einer Adaption zu Butanol, angeschaltet sind. Zusätzlich konnten vermehrt Gene von Proteinen gefunden werden, welche für die Membranzusammensetzung zuständig sind (SCHWARZ *et al.*, 2012). In Verbindung mit dieser Arbeit müssten Microarray-Analysen, nach einem einmaligen Butanolstress einer Batchkultur, durchgeführt werden (JANSSEN *et al.*, 2012).

#### **4.2 Co-Expression zentraler Schlüsselenzyme in *C. acetobutylicum* zur Beeinflussung des Stoffflusses von Butanol**

Das systematische Metabolic Engineering stellt einen wichtigen Ansatz dar, bei dem es möglich ist den Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* so zu manipulieren, dass der Stofffluss in Richtung Butanol verschoben wird. Hierbei kann durch Gen-Knockout oder verminderte bzw. vermehrte Expression das Genexpressionsmuster so verändert werden, dass der metabolische Fluss zum gewünschten Produkt gelenkt wird (LEE *et al.*, 2008; PAPOUTSAKIS, 2008; LÜTKE-EVERSLOH & BAHL, 2011). Die zentralen Schlüsselenzyme des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* (Abb. 1.2) bieten dazu ideale Ansatzpunkte, eine vermehrte Butanolproduktion zu erreichen. Die Enzyme ermöglichen dem Organismus mit Hilfe der Glykolyse als Ausgangspunkt zuerst die Säuren Acetat und Butyrat und im späteren Wachstumsverlauf die Lösungsmittel Ethanol, Aceton und Butanol zu produzieren. Somit wurden in dieser Arbeit für folgende Enzyme plasmidvermittelte homologe Expressionen mittels des pT-Vektors in *C. acetobutylicum* durchgeführt: Thiolase,  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, Crotonase und Butyryl-CoA Dehydrogenase. Die Butyryl-CoA Dehydrogenase benötigt für seine Funktion die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten der Elektronentransfer Flavoproteine (ETFAB). Es wird postuliert, dass die *EtfABs* in Clostridien die Butyryl-CoA Dehydrogenase mit Elektronen versorgt. So nehmen sie voraussichtlich Elektronen vom reduzierten Ferredoxin oder NAD(P)H auf und transferieren sie zu ihrem Interaktionspartner (HERRMANN *et al.*, 2008). Durch die Interaktionsfähigkeit des



Proteinkomplexes und der Lokalisation auf einem Operon (INUI *et al.*, 2008) wurden diese zusammen kloniert und in *C. acetobutylicum* exprimiert.

#### 4.2.1 Enzymatische Charakterisierung

Mittels einer Colony-PCR (2.7.6.2) konnte der Nachweis einer korrekten Insertion der jeweiligen Gene (Thiolase, der  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, der Crotonase und der Butyryl-CoA Dehydrogenase) in den pT-Vektor nachgewiesen (Abb. 3.2). Weiterhin war es möglich die Funktionalität der entsprechenden Co-Expressionen mittels funktionsspezifischer Enzymassays (2.10.1-2.10.4) nachzuweisen. Mit Hilfe der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biochemie“ der Phillips Universität Marburg wurde erstmals eine Butyryl-CoA Dehydrogenase-Aktivität in *C. acetobutylicum* nachgewiesen. Hierfür wurde eine modifizierte Ferricenium-Ion-Methode eingesetzt (LI *et al.*, 2008). Vorher war lange Zeit der Nachweis dieser Enzymaktivität nicht möglich. Als Gründe wurden in der Literatur die Instabilität des Enzyms, eine unpassende Faltung des Proteins, eine zu geringe Aktivität oder eine fehlende Reproduzierbarkeit genannt (HARTMANIS & GATENBECK, 1984; BOYNTON *et al.*, 1996; ATSUMI *et al.*, 2008; OKSANA *et al.*, 2010). Die spezifische Butyryl-CoA Dehydrogenase-Aktivität in *C. acetobutylicum* ist im Gegensatz zu den anderen gemessenen Aktivitäten, wahrlich gering (Tab. 3.3). Andererseits sind die ermittelten Werte mit denen aus *C. kluyveri* vergleichbar (LI *et al.*, 2008). Die erzielten Ergebnisse aller durchgeführten Enzymassays verdeutlichten, dass der jeweilige Expressionsstamm eine deutlich höhere funktionsspezifische Aktivität im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT aufzeigte. Dieses Phänomen wurde durch die plasmidvermittelte Expression des jeweiligen Enzyms hervorgerufen. Die spezifischen enzymatischen Aktivitäten (U/mg) der untersuchten Expressionsstämme (*C. acetobutylicum* pT\_ThIA, *C. acetobutylicum* pT\_hbd, *C. acetobutylicum* pT\_crt, *C. acetobutylicum* pT\_bcd\_etfA\_etfB) konnten erstmals in dieser Arbeit ermittelt werden (Tab. 3.2). Angaben zu enzymatischen Analysen in Bezug auf die homologe Expression der o.g. Enzyme in *C. acetobutylicum* ATCC 824, sind in der Literatur nicht ermittelbar. In anderen Organismen wurde jedoch bereits gezeigt, dass eine homologe bzw. heterologe Expression der beschriebenen Enzyme zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität führt: Thiolase (INUI *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010; TANAKA *et al.*, 2011);  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA

Dehydrogenase (INUI *et al.*, 2008) und Crotonase (INUI *et al.*, 2008). Weiterhin sind die Ergebnisse aus den funktionsspezifischen Enzymassays des Typstamms *C. acetobutylicum* ATCC 824 und des Vektorkontroll-Stamms mit denen aus der Literatur vergleichbar. So konnten LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH (2011) folgende spezifische Aktivitäten, unter denselben Wachstumsbedingungen, bei *C. acetobutylicum* ATCC 824 feststellen: Thiolase:  $37,60 \pm 3,74$  U/mg; 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase:  $12,52 \pm 1,22$  U/mg; Crotonase:  $100,84 \pm 21,9$  U/mg. Anhand dieser Werte sind keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Arbeit feststellbar. Des Weiteren ist ersichtlich, dass in den untersuchten Expressionsstämmen die anderen Stoffwechsel-relevanten Enzyme gering oder gar nicht in ihrer Aktivität erhöht sind. Dies führt zu der Annahme, dass eine vermehrte Expression eines Enzyms zu keiner Beeinflussung - in Bezug auf die spezifische Aktivität - der anderen stoffwechselrelevanten Enzymen führt.

#### 4.2.2 Phänotypische Charakterisierung

Das Wachstum von *C. acetobutylicum* ATCC 824 ist durch eine starke H<sub>2</sub> Produktion, welche das zelluläre Redoxgleichgewicht während der acidogenen Phase aufrechterhält, gekennzeichnet (JONES & WOODS, 1986; GIRBAL *et al.*, 1995). Während dieser Wachstumsphase wird der Überschuss an Elektronen direkt für die H<sub>2</sub>-Produktion verwendet, so dass ein CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>-Verhältnis von 1:1 vorhanden ist. Diese Eigenschaft konnte in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. In der solventogenen Phase nimmt die H<sub>2</sub>-Produktion ab und die Butanolsynthese wird vorwiegend angetrieben. Aus diesem Grund konkurrieren die H<sub>2</sub>- und Alkoholbildung direkt miteinander um die vorhandene Energie. In Verbindung mit den erhöhten Alkoholtitern, zeigte *C. acetobutylicum* pT<sub>crt</sub> ein erhöhtes CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>-Verhältnis von 3:1 und *C. acetobutylicum* pT<sub>bcd\_etfA\_etfB</sub> von 2,7:1. Im Gegensatz dazu weisen die anderen Expressionsstämmen, sowie *C. acetobutylicum* ATCC 824 und der Vektorkontroll-Stamm ein CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>-Verhältnis von 2:1 zum Ende des Wachstums auf.

Die Thiolase als zentrales Schlüsselenzym im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* katalysiert die reversible Kondensationsreaktion von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu einem Molekül Acetoacetyl-CoA (Abb. 1.2). Sie konkurriert mit der Phosphotransacetylase um das vorhandene Acetyl-CoA, um die Bildung der Säuren Butyrat und Acetat einleiten zu können.

In der solventogenen Phase hingegen konkurriert sie mit der Acetaldehyd-Dehydrogenase um das vorhandene Acetyl-CoA (WIESENBORN *et al.*, 1988). In früheren Arbeiten ist bereits der Versuch unternommen worden, den metabolischen Fluss mit Hilfe der Thiolase in *C. acetobutylicum* zu verändern. Hierbei führte eine Co-Expression der Thiolase (*thIA*) in *C. acetobutylicum* 824 (pTHL) zu einer signifikant reduzierten Lösungsmittelproduktion und zudem konnten die produzierten Säuren nicht re-assimiliert werden (SILLERS *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit führte die homologe Expression des *thIA*-Gens im Gegensatz dazu zu einer gesteigerten Lösungsmittelproduktion. Die Werte von Aceton waren um das 2-fache und bei Butanol um das 1,7-fache, im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT, erhöht. Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen, denn durch die vermehrte Expression der Thiolase kommt es zur vermehrten Bildung von Acetoacetyl-CoA, was wiederum den metabolischen Fluss in Richtung Aceton und Butanol bewegt. Diese Resultate sind vergleichbar mit denen in der Literatur (SILLERS *et al.*, 2008). Andererseits sollte durch die Reduktion des Acetyl-CoA Pools zu einer verminderten Produktion an Ethanol führen. Die Ethanolausbeute ist gegenüber dem Vektorkontroll-Stamm pT dennoch um das 2-fache erhöht. Eine Möglichkeit für die erhöhte Ethanolproduktion wäre, dass der verbesserte Lösungsmittel-Metabolismus von *C. acetobutylicum* pT\_ThIA<sup>Derivat</sup> einen erheblichen Einfluss auf die NADH-abhängige Aldehyd/Alkohol Dehydrogenase Aktivität hat. Dieses Phänomen ist mit anderen lösungsmittelproduzierenden *C. acetobutylicum*-Stämmen mit hohen Ethanolausbeuten vergleichbar (FONTAINE *et al.*, 2002; LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011; LEHMANN *et al.*, 2012; HÖNICKE *et al.*, 2012). Eine weitere Möglichkeit für die erhöhte Ethanolproduktion könnte an der Reversibilität der Thiolasereaktion liegen. Die gesteigerte Menge von Acetoacetyl-CoA, bedingt durch die hohe Expression des *thIA*-Gens, führt zur Herstellung von Acetyl-CoA, was einen erhöhten Ertrag an Ethanol bewirkt. Weiterhin führt laut Literaturangaben die Reduktion des Acetyl-CoAs, verursacht durch die *thIA*-Expression, zu einer verminderten Acetatproduktion. Dies konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, denn die erzielten Acetatkonzentrationen lagen im Bereich derjenigen von *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamms pT. Die gegensätzlichen Ergebnisse aus dieser und der Arbeit von SILLERS *et al.* (2008) können an der Kulturführung liegen, denn in diesem Fall wurden die Stämme einem pH-kontrollierten Wachstumsverlauf unterzogen. Im Unterschied dazu sind in der vorliegenden Arbeit keine externen pH-Modifizierungen

während des Wachstumsverlaufes vorgenommen worden. Eine externe pH-Modifizierung kann den Gärungsmetabolismus von *C. acetobutylicum* lenken. So kann ein hoher pH-Wert zu einer hohen Acetatkonzentration führen. Das Maximum wird bei pH 6,0 und einer Ausbeute von 256 mM Acetat erreicht (SILLERS *et al.*, 2008). Jedoch wurde in der Arbeit von SILLERS *et al.* (2008) ein externer pH von 5,5 bis 5,75 eingestellt, was die niedrigen Acetatkonzentration erklären könnte. Eine weitere Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse aus dieser und der Arbeit von SILLERS *et al.* (2008) könnte am im Vektor verwendeten Promotor liegen, denn in dieser Arbeit wurde kein *ptb*-Promotor verwendet. Stattdessen ist wie bereits beschrieben der *pT*-Vektor, welcher einen *thl*-Promotor besitzt, verwendet worden. Dieser gilt als konstitutiv aktiv und zeigt seine stärkste Expression in der exponentiellen Wachstumsphase. Der *ptb*-Promotor ist zwar auch vornehmlich in der exponentiellen Wachstumsphase aktiv (TUMMALA *et al.*, 1999), ist jedoch nicht so stark exprimiert wie der *thl*-Promotor (SILLERS *et al.*, 2008). Der *ptb*-Promotor kontrolliert die Transkription des Gens der Phosphat Butyryltransferase (CA\_C3076) aus *C. acetobutylicum*, welches zum *ptb-buk* Operon gehört und die Enzyme (Phosphat Butyryltransferase und Butyratkinase) für die Butyratproduktion vom Butyryl-CoA aus, kodiert. Die schwache Expression des *ptb*-Promotors führte wahrscheinlich zu den unterschiedlichen Ergebnissen, denn geringere Proteinexpression führt einer verminderten Zellüberlastung (RIEBE, 2009). Im Falle einer Zellüberlastung wäre es denkbar, dass eine hohe Proteinexpression, bedingt durch den *thlA*-Promotor, den Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* *pT\_thlA* differentiell in der Produktion der organischen Säuren verändert.

Die  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*) ist das zweite Enzym aus dem Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* und katalysiert die Reduktion von Acetoacetyl-CoA unter Verwendung von NAD(P)H. Diese Reaktion ist der erste wichtige Schritt zur Produktion von Butyrat und Butanol. Die metabolische Kraft dieses Enzym kann direkt das Produktmuster der Fermentation beeinflussen (COLBY & CHEN, 1992). Eine vermehrte Expression der  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase führt zu einer vermehrten Expression des Gens und somit zu einer Anreicherung von Hydroxybutyryl-CoA und zu einer Reduktion von Acetoacetyl-CoA. Dies würde bedeuten, dass theoretisch Acetat, Ethanol und Aceton in geringeren und Butyrat und Butanol in höheren Mengen produziert werden. Interessanterweise zeigte jedoch *C. acetobutylicum* *pT\_hbd* ein ähnliches Produktspektrum

wie *C. acetobutylicum* pT\_ thIA (Im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT sind die Ausbeuten an Ethanol, Aceton und Butanol erhöht). Im Gegensatz zu den Kontrollstämmen produzierte *C. acetobutylicum* pT\_ hbd eine um die 1,5-fach erhöhte Menge an Aceton und sogar um die 3,5-fache Menge an Ethanol. In Bezug auf die Ethanolproduktion kann man Verhaltenshomologien finden, wenn das *Hbd*-Gen mittels des „Clostridial Clostron Systems“ (MINTON *et al.*, 2006; HEAP *et al.*, 2007) inaktiviert wird. Bei *C. acetobutylicum* hbd::int(69) wurde der Weg vom Acetoacetyl-CoA zum Hydroxybutyryl-CoA mittels sequenzspezifischer Insertionen ausgeschaltet und dadurch konnte die Ethanolmenge bis um das 23-fache gegenüber *C. acetobutylicum* ATCC 824 erhöht werden (LEHMANN & LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Eine Erklärung, warum eine Co-Expression von *Hbd* zu einer erhöhten Ethanolproduktion wie ein Knock-out-Stamm führt, kann abschließend nicht vollständig geklärt werden. Wie erwartet war die Butanolausbeute von *C. acetobutylicum* pT\_ hbd um das 1,7-fache im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT erhöht. Aufgrund der erhöhten Expression von *Hbd* kommt es zu einer vermehrten Bildung von Hydroxybutyryl-CoA und somit zu einer höheren Produktion an Butanol.

Die Crotonase katalysiert die Dehydratationsreaktion von 3-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA und stellt das dritte zentrale Enzym im Stoffwechselweg von *C. acetobutylicum* dar. Eine homologe Co-Expression des Enzyms führt theoretisch zu einer vermehrten Produktion von Crotonyl-CoA und somit zur Abnahme von 3-Hydroxybutyryl-CoA, so dass die Ausbeute des Lösungsmittels Butanol erhöht werden könnte. Jedoch postulieren STEEN *et al.* (2008), dass eine verstärkte Expression von *crt* zu einem höheren Spiegel an 3-Hydroxybutyryl-CoA führt. Dies wiederum würde zu einem ausgeglicheneren Stoffwechsel führen (STEEN *et al.*, 2008). Dennoch zeigte der vorliegende Phänotyp, dass das Produktionsspektrum der Lösungsmittel, im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT, stark verändert ist. So produziert *C. acetobutylicum* pT\_ crt mit 178 mM, von allen untersuchten Expressionsstämmen, die höchste Menge an Ethanol. Diese Produktionseigenschaft ist mit dem Vorhandensein von ATP, welches eine zentrale Rolle bei der Produktion von Lösungsmitteln spielt, zu erklären (MEYER *et al.*, 1986; HÜSEMANN & PAPOUTSAKIS, 1989). Ein niedriger ATP-Spiegel führt zur vermehrten Bildung von Säuren, wohingegen hohe ATP-Konzentrationen zur Lösungsmittelbildung führen (GRUPE & GOTTSCHALK, 1992). Durch die

vermehrte Expression der Crotonase, kommt es zu einer Ansammlung von ATP (durch die erhöhten Synthese von Butyrylphosphat), was die hohe Ethanolproduktion erklären könnte. Weiterhin fanden WIETZKE & BAHL (2012) heraus, dass die Crotonase sog. *Rex*-Boxen enthält. Bei dem *Rex*-Gen handelt es sich um CAC2713, welches als „redox-sensing transcriptional repressor“ für lösungsmittelbildende Gene beschrieben ist. *Rex* ist in der Lage das Redox-Gleichgewicht der Zelle zu beeinflussen (WIETZKE & BAHL, 2012). Bei einem niedrigen NADH/NAD<sup>+</sup> Verhältnis inhibiert es die Transkription, verliert jedoch seine Operatorfunktion bei einem ansteigenden NADH/NAD<sup>+</sup> Verhältnis (BREKASIS & PAGET, 2003). Ein durch die homologe Co-Expression bedingt erhöhtes NADH/NAD<sup>+</sup> Verhältnis führt zur Deaktivierung der *Rex*-Box innerhalb der Crotonase und somit zur erhöhten Bildung von Ethanol. Ferner ist bekannt, dass die Crotonase aus *C. acetobutylicum* durch Crotonyl-CoA gehemmt werden kann (WATERSON *et al.*, 1972). Eine verstärkte Expression der Crotonase, führt zu einer vermehrten Umsetzung von 3-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA und somit zu einer Feedback-Inhibierung, was die vermehrte Produktion von Ethanol und Aceton erklären könnte.

Der Butyryl-CoA Dehydrogenase-Komplex (*Bcd/EtfAB*) aus *C. acetobutylicum* gilt als wichtigster Schnittpunkt auf dem Weg zur Butanolbildung. Dies liegt daran, weil die Butyryl-CoA Dehydrogenase die Reaktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA katalysiert, welches als Produkt direkt für die Butanolsynthese benötigt wird. Die Wichtigkeit seiner Schnittpunkt-Funktion konnte bereits in diversen heterologen Expressionsstämmen nachgewiesen werden, denn es stellt den limitierenden Faktor in der Butanolherstellung dar (BEREZINA *et al.*, 2010). Demzufolge gilt eine homologe Co-Expression dieses Enzymkomplexes als ideales Target zur Erhöhung der Butalkonzentration. Es konnte gezeigt werden, dass *C. acetobutylicum* pT\_*bcd\_etfA\_etfB* eine veränderte Lösungsmittelproduktion im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und dem Vektorkontroll-Stamm pT aufwies. Durch die vermehrte Expression von *bcd* konnte die 2-fache Menge an Ethanol gegenüber den Kontrollstämmen produziert werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer homologen Co-Expression der Elektronentransfer-Flavoproteine in *C. acetobutylicum*. In der Arbeit von HAASE (2012) ist durch die vermehrte Expression der *EtfABs* ein erhöhtes Butanol-Aceton-Verhältnis sowie eine doppelt so hohe Ethanolproduktion erreicht worden (HAASE, 2012). Die Co-Expression der *EtfABs* in *C. acetobutylicum* führt dazu, dass

Elektronen nicht mehr in Form von  $H_2$  frei werden, sondern für die Bildung von Reduktionsäquivalenten ( $NAD(P)H+H^+$ ) genutzt werden können (BLUSSON *et al.*, 1981). Vermutlich wird durch die Erhöhung des  $NAD(P)H$ -Levels die Solventogenese induziert, so dass mehr Ethanol gebildet und die Reduktionsäquivalente wieder regeneriert werden (GRUPE & GOTTSCHALK, 1992). Auf der anderen Seite ist in der vorliegenden Arbeit nur eine 1,2-fache Erhöhung der Butanolausbeute erreicht worden. Verschiedene Studien belegen, dass 5 mol  $NADH$  für die Produktion von 1 mol Butanol benötigt werden: 2 mol  $NADH$  für den Butyryl-CoA Dehydrogenase-Komplex (HERRMANN *et al.*, 2008) und 3 mol  $NADH$  für weitere stoffwechselrelevante Reaktionen (BEREZINA *et al.*, 2010). Man kann also davon ausgehen, dass eine erhöhte Expression von *bcd* das Elektronengleichgewicht im Gärungsmetabolismus stört, was eine langsamere Kinetik des Butanolstoffwechsels zur Folge hat. Das wiederum führt zu einer niedrigen Butanolproduktion.

Die zusammen getragenen Ergebnisse verdeutlichen, dass der Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum* ein ideales Ziel für Metabolic-Engineering-Strategien ist, um die Lösungsmittelausbeute zu erhöhen. Jedoch zeigte die vorliegende Arbeit auch, dass die vermehrte Expression eines einzelnen Gens zu keinem idealen Butanolproduzenten führte. Wie bereits bekannt, führt erst das Zusammenspiel aller untersuchten Enzyme zur Reaktion vom Acetyl-CoA zum Butanol (JONES und WOODS, 1986). Aus diesem Grund wäre es angebracht das *bcs*-Operons ( $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, Crotonase, Butyryl-CoA Dehydrogenase mit den beiden Untereinheiten der Elektronentransfer Flavoproteinen) zusammen mit der Thiolase in *C. acetobutylicum* zu co-exprimieren. Um dies weiter zu optimieren, wäre der Austausch des *thl*-Promotors gegen einen *ptb*-Promotor im pT-Vektor denkbar. Der *ptb*-Promotor gilt als ideal für Gene, die natürlicherweise nicht in der frühen exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden (NAIR *et al.*, 1994). Wie bereits bekannt, werden Thiolase,  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, Crotonase und Butyryl-CoA Dehydrogenase sowohl in der Acidogenese, als auch in der Solventogenese exprimiert. Eine sehr hohe Expression, bedingt durch den *ptb*-Promotor, gleich zu Beginn des Wachstums könnte jedoch eine Ethanol- und Acetatreduktion und einhergehend einen verstärkten Kohlenstofffluss in Richtung Butanol bedeuten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine frühe Expression des Thiolasegens (*ThIA*; CA\_C2873) zu einer schnelleren

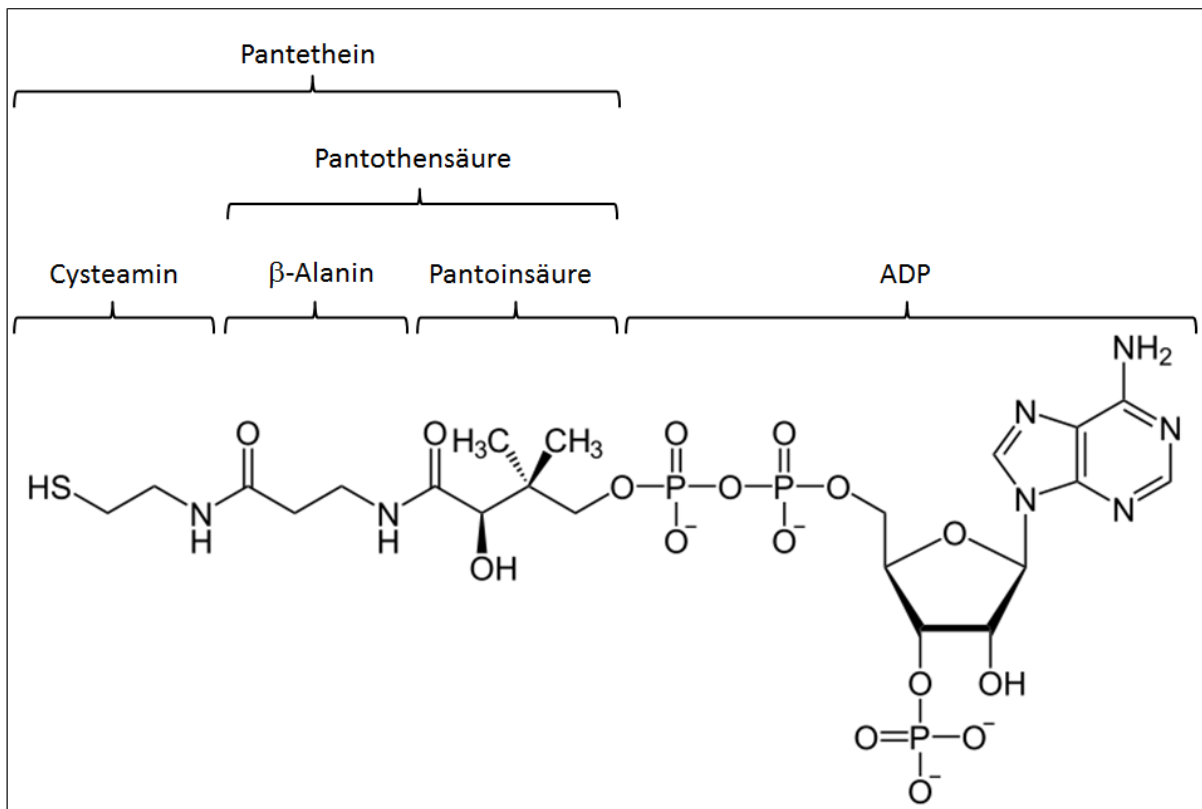
Butanolproduktion führt, da es so zu einer frühen Anreicherung des Butyryl-CoAs kommt (SILLERS *et al.*, 2008).

### **4.3 Gezielte Modifikation der Acetyl-CoA Acetyltransferase aus *C. acetobutylicum***

Im Allgemeinen sind biosynthetische Thiolasen für diverse Kohlenstoffwechselwege wie z.B. Fettsäuremetabolismus, Mevalonat- oder Polyhydroxybutyratbiosynthese und verschiedene sekundäre Metabolitstoffwechselwege verantwortlich. Es ist bekannt, dass die biosynthetischen Thiolasen durch produktbedingte Feedback-Inhibierungen reguliert sind. Diese Regulation gilt als typisch für verschiedene Schlüsselenzyme in biosynthetischen Stoffwechselwegen. Metabolic Engineering-Strategien zielen darauf ab, dass diese inhibitorischen Mechanismen abgemildert werden, um somit einen mikrobiellen Produktionsstamm zu generieren. Die mikrobielle Produktion von Aminosäuren stellen hierbei ein gutes Beispiel dar (IKEDA, 2003). Die biosynthetische Thiolase von *C. acetobutylicum* gilt als zentrales Schlüsselenzym für die Butanolproduktion. Sie katalysiert als initialen Schritt, die reversible Reaktion von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu einem Molekül Acetoacetyl-CoA (GHESLAGHI *et al.*, 2009). Bei dieser Reaktion entsteht freies CoA-SH, was eine produktbedingte Inhibition auslöst. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mittels klassischer Metabolic Engineering-Strategien versucht, die clostridielle Thiolase durch gerichtete Evolution (GeneArt® Controlled Randomization Service) so modifiziert, dass die Inhibition durch freies CoA-SH abgemildert werden könnte. Theoretisch führt eine geringere Inhibition durch freies CoA-SH zu einem verstärkten Fluss in Richtung Butanol.

Durch die Arbeiten von MERILÄINEN *et al.* (2008 & 2009) sind bereits die Bindungsmechanismen der Thiolase - aus *Z. ramigera* - mit dem Substrat CoA bekannt. Vier individuelle aktive Stellen eines Tetramers sind für die Bindung des CoA-Moleküls verantwortlich (MERILÄINEN *et al.*, 2008; MERILÄINEN *et al.*, 2009). Ein CoA-Molekül besteht aus den Komponenten Cysteamin,  $\beta$ -Alanin, Pantoinsäure und ADP (Abb. 4.1).  $\beta$ -Alanin und Pantoinsäure werden zusammen als Pantothensäure und mit Cysteamin als Pantethein bezeichnet. Die HS-Gruppe am Cysteamin gilt als die entscheidende Gruppe für die Reaktionsfähigkeit des CoAs (DICKERSON & GEIS, 1999; KARLSON *et al.*, 2005).





**Abb. 4.1:** Coenzym A besteht aus Cysteamin,  $\beta$ -Alanin, Pantoinsäure und einem Adenosin (ADP). (DICKERSON & GEIS, 1999; KARLSON *et al.*, 2005, mod.).

Ein CoA-Molekül bindet im Aminosäurenbereich 119-254 der Thiolase, was somit zur Inhibierung des Proteins führt. Mittels zufälliger Mutationen wurde dieser Bereich modifiziert (2.11). Um nun einen Thiolase-Klon mit geringerer CoA-Sensitivität zu detektieren, wurde ein Enzymassay nach WIESENBORN *et al.*, (1988, mod.) in einem neuartigen High-Throughput-Screening Verfahren entwickelt. Für dieses Thiolase-Aktivitätsscreening wurde *E. coli* als Wirt, aufgrund der einfachen Kultivierungstechnik und Umgangsbedingungen, eingesetzt. *E. coli* besitzt zwei Thiolasen: Thiolase I ist durch *fadA* kodiert und bevorzugt Acyl-CoA Substrate mit einer Kettenlänge von bis zu 16 Kohlenstoffen. Die Thiolase II ist durch *atoB* kodiert und ist spezifisch für Acetoacetyl-CoA. Sie ist an der Verwertung von Butyrat beteiligt und kann somit die reverse Kondensationsreaktion durchführen (FEIGENBAUM & SCHULZ, 1975; JENKINS & NUNN, 1987; YANG *et al.*, 1990). Es ist bekannt, dass die Thiolasengene von *E. coli* nur unter spezifischen Bedingungen exprimiert werden, z.B. wenn Butyrat, Acetoacetat oder langkettige Fettsäuren wie Ölsäure im Medium vorhanden sind. Eine Thiolaseaktivität des Wirtsstamms konnte daher ausgeschlossen werden. Thiolase-Aktivitätsassays des Kontrollstamms bestätigten diese Darlegung (Abb. 3.15, A).

### 4.3.1 Genotypische Charakterisierung

Nachdem das enzymatische High-Throughput-Screening Verfahren etabliert war, konnten die spezifischen Aktivitäten der Thiolase-Derivate ermittelt werden. Hierfür wurden die spezifischen Thiolase-Aktivitäten in physiologischer Richtung gemessen, d.h. die endergone Kondensationsreaktion ist im gekoppelten Assay mit Zellextrakten von *E. coli* Tuner (DE3) pET15b\_ *phaB1* durchgeführt worden. Somit konnte die NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase Aktivität bestimmt werden (BUDDE *et al.*, 2010). Der Assay wurde so etabliert, dass 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet werden konnten, um einen hohen Durchsatz zu gewährleisten. Von den 1620 untersuchten Klonen zeigten mehr als 80 %, in Gegenwart von 10  $\mu$ M CoA-SH, weiterhin eine spezifische Aktivität ähnlich des Typstamms *ThIA*<sup>WT</sup> ( $\pm$  20 %). Bei 14 Derivaten (entspricht: 0,8 % der untersuchten Klone) konnte eine um > 150 %ig erhöhte Thiolase-Aktivität, vergleichend zu *ThIA*<sup>WT</sup>, in der Gegenwart von 10  $\mu$ M CoA-SH ausgemacht werden (Abb. 3.16). In keinen der untersuchten Derivate konnte eine allgemein erhöhte Aktivität (ohne CoA-SH) nachgewiesen werden. Nach einer erneuten Analyse bestätigten 6 Klone den gewünschten Phänotypen (erhöhte spezifische Aktivität in Gegenwart von CoA-SH). Die Reduktion der positiven Klone lässt sich mit den Volumina der Enzymassays erklären. Messungenauigkeiten bei sehr kleinen Volumina, wie bei den Mikrotiterplatten (200  $\mu$ l), können nicht ausgeschlossen werden. Die DNA-Sequenzermittlungen wiesen für alle 6 Klone denselben Genotyp mit den AS-Substitutionen: R133G, H156N und G222V auf. Daher ist davon auszugehen, dass die AS-Austausche zu einer Modifikation des CoA-Bindemechanismus der Thiolase führten. Die Ursachen für dieses veränderte Verhalten sind wie folgt zu erklären:

Bei der AS-Substitution an Stelle 133 ist die Aminosäure Arginin gegen Glycin ersetzt worden. Bei Arginin handelt es sich um eine aliphatische, polare und stark basische Aminosäure. Glycin ist hingegen als eine aliphatische, unpolare und neutrale Aminosäure charakterisiert (LÖFFLER *et al.*, 2007). In direkter Nachbarschaft der ausgetauschten Aminosäure liegt Met134, welche an der Bindung von CoA beteiligt ist. Wenn sich ein CoA-Molekül an eine biosynthetische Thiolase bindet, tritt sein Pantothersäuren-Rest mit der Pantothersäuren-Bindestelle in Verbindung und seine SH-Gruppe sperrt die katalytische Höhle der Thiolase, welche sich in der Nähe der wichtigen katalytischen Aminosäuren Cys89, His348 und Cys378 befindet. Die Aminosäuren Met143, Ile144, Leu148, His156, Ala234,

Phe235, Leu249 und Met134 von der gegenüberliegenden Nachbaruntereinheit bilden eine hydrophobe Tasche und binden somit den Pantothersäuren-Rest des CoAs an die Thiolase (MERILÄINEN *et al.*, 2008). Durch den Austausch von Arginin gegen Glycin kommt es wahrscheinlich zu einem bedeutenden Einfluss der tetrameren Untereinheit welche Met134 enthält. Diese führt dazu, dass die Bildung der hydrophoben Tasche welche zur Bindung des Pantothersäuren-Rest des CoAs zuständig ist, negativ beeinflusst wird. Die zweite AS-Substitution fand an Stelle 156 statt. Dort wurde die aromatische, polare und schwach basische Aminosäure Histidin durch die aliphatische, polare und neutrale Aminosäure Asparagin ausgetauscht (LÖFFLER *et al.*, 2007). His156 ist wie Met134 an der Bindung des Pantothersäuren-Restes des CoAs an die Thiolase beteiligt. Hierbei stellen His156 mit Ser247 die einzigen hydrophilen Reste der hydrophoben Tasche dar. Zudem sind beide Aminosäuren in der Thiolase-Sequenz stark konserviert. His156 ist mit dem Pantothersäuren-Restes des CoAs mittels Van-der-Waals-Bindungen direkt am Eingang der hydrophoben Tasche verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen His156 und dem CoA eine wichtige Rolle im CoA-Bindemechanismus einnehmen (MODIS & WIERENGA, 2000; KURSULA *et al.*, 2002). Bei der Substitution von Histidin gegen Asparagin kommt es zu keiner Änderung der Hydrophatit (EISENBERG *et al.*, 1982). Trotzdem ist davon auszugehen, dass durch den Austausch die Bindung des CoA Pantothersäuren-Rest an die hydrophobe Bindetasche der Thiolase beeinflusst wurde. Bei der dritten AS-Substitution wurde an Stelle 222 die Aminosäure Glycin gegen Valin ausgetauscht. Wie bereits beschrieben, stellt Glycin eine aliphatische, unpolare und neutrale Aminosäure dar. Valin hingegen ist als eine aliphatische, unpolare und neutrale Aminosäure charakterisiert (LÖFFLER *et al.*, 2007). In beiden Fällen handelt es sich um kleine und hydrophobe Aminosäuren. Die AS-Substitution liegt in unmittelbarer Nähe von Arg220, Thr224, Ser227 und Gly244. Diese Aminosäuren sind für die Bindung des ADPs eines CoAs zuständig. Hierbei sind die Atome der Adenin-Gruppe indirekt durch Wasserstoffbrückenbinden mit der Thiolase verbunden (Thr224, Ser227 und Gly244). Zudem treten die Elektronen des Adenin-Rings mit Hilfe von Van-der-Waals-Bindungen mit den Elektronen von Arg220 in Verbindung. Die 3`-Phosphat und 5`-Pyrophosphat-Gruppen des ADPs haben keinen Bindungspartner am Protein. Die geringe Anzahl der Bindungsmöglichkeiten des 3`-Phosphat-ADP-Restes vom CoA verdeutlicht, dass die biosynthetische Thiolase nur dann aktiv ist, wenn kein Substrat vorhanden ist

(DAVIS *et al.*, 1987; MODIS & WIERENGA, 1999). Es ist anzunehmen, dass das Gesamtgefüge von Arg220, Thr224, Ser227 und Gly244 durch die AS-Substitution an Stelle 222 beeinflusst wird. Man kann also davon ausgehen, dass die Bindung des ADPs des Coenzym As an die Thiolase erschwert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die drei AS-Substitutionen voraussichtlich zu einer reduzierten Affinität der CoA-Bindeschleife führten. Jedoch wurde dabei nicht die Claisen-Kondensation-Reaktion (Enzymatische Reaktion ohne CoA-SH) durch diese Modifikationen beeinflusst, da keine Änderung der spezifischen Aktivität der Thiolase beobachtet wurde. Trotz dieser detaillierten Informationen sollten weitere Analysen zur Charakterisierung der o.g. Klone durchgeführt werden. So könnte zum Beispiel die genaue Struktur der veränderten Proteine mittels einer Proteinkristallisation ermittelt werden. Die ermittelten Strukturen könnte anschließend mit der eines nativen Thiolaseproteins (MODIS & WIERENGA, 1999, MODIS & WIERENGA, 2000 [Kristallstruktur der Thiolase aus *Z. ramigera*]) verglichen werden. Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der Mutationen, wäre eine ortspezifische Mutagenese, für die jeweiligen einzelnen o.g. Aminosäuren, durchzuführen. Somit könnte die individuelle Rolle der jeweiligen ausgetauschten Aminosäure, in Bezug auf ihren Einfluss an der CoA-SH Bindung der Thiolase von *C. acetobutylicum*, untersucht werden. So konnten z.B. THOMPSON *et al.* (1989) bereits zeigen, dass ein Aminosäureaustausch, des im CoA-Bindebereich liegenden Cysteins (Cys126) durch ein Serin, zu einer erheblichen Reduktion der katalytischen Kraft der Thiolase führte.

#### **4.3.2 Phänotypische Charakterisierung**

Nachdem die Auswirkung der AS-Substitutionen auf die CoA-Bindeschleife der Thiolase geklärt wurde, mussten die phänotypischen Auswirkungen der ausgetauschten Aminosäuren (R133G, H156N und G222V) analysiert werden. Hierfür wurde das optimierte *thIA*-Gen (*thIA*<sup>Derivat</sup>) in den pT-Vektor kloniert und in *C. acetobutylicum* ATCC 824 homolog exprimiert. Vergleichend zu den in dieser Arbeit erstellten clostridiellen Expressionsstämmen, konnten phänotypische Homologien zu *C. acetobutylicum* pT\_*thIA* gefunden werden. Die Homologien traten auf, weil *C. acetobutylicum* pT\_*thIA* die unveränderte Version des Thiolase-Gens exprimiert (Kapitel 3.3). Die Auswirkung der homologen Co-Expression der Thiolase, auf die

Produktbildung, wurde bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert. Sowohl die Expression von pT\_ *thIA*, als auch von *thIA*<sup>Derivat</sup>, führten zu Phänotypen mit gesteigerter Lösungsmittelbildung (siehe Anhang, Tab. A3). In beiden Fällen kam es zu keinen signifikanten Produktionsunterschieden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Butanolbildung von *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA*<sup>Derivat</sup> gegenüber *C. acetobutylicum* pT\_ *thIA* sogar noch um 5 % gesteigert wurde. Dieses Verhalten wurde durch die Expression des optimierten Thiolasegens hervorgerufen. Eine geringere Affinität der CoA-Bindeschleife führte dazu, dass die Inhibierung der spezifischen Aktivität der Thiolase durch freies CoA-SH abgemildert wurde. Daher konnte ein leicht verstärkter Fluss, im Gärungsstoffwechsel von *C. acetobutylicum*, in Richtung Butanol gewährleistet werden. Anhand der durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine erhöhte Genexpression, sondern auch eine optimierte enzymatische Regelung zu einem Phänotypen mit verbesserter Butanolproduktion führen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit eine neuartige Strategie, zur Überwindung von limitierenden Thiolase-abhängigen Stoffwechselwegen, geschaffen worden ist. Es wurde ein einfaches High-Throughput-Screening-Verfahren zur Identifizierung von Thiolase-Derivaten mit reduzierter CoA-SH Sensitivität in rekombinanten *E. coli*-Zellen entwickelt. Diese Methode könnte leicht an halb- oder vollautomatische Systeme mit Mikrotiterplatten adaptiert werden. Weiterhin ist anzumerken, dass die genetische Modifikation der Thiolase nicht nur ein anwendbares Instrument für die clostridielle Biokraftstoff-Produktion ist, sondern auch in anderen mikrobiellen Zellfabriken anwendbar ist, da somit der Kohlenstofffluss durch Acetoacetyl-CoA-abhängige Wege optimiert werden kann.

## Zusammenfassung

1. Eine Plasmid-vermittelte homologe Co-Expressionen der Chaperone GrpE und HtpG führten zu einer signifikant erhöhten Butanolresistenz, jedoch nicht zu einer erhöhten Butanolproduktion in *C. acetobutylicum*. Zudem zeigten die untersuchten Expressionsstämme eine effizientere Adaption an sich wiederholende Butanolstress-Experimente.
2. Die zentralen Schlüsselenzyme (Thiolase, der  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, der Crotonase und der Butyryl-CoA Dehydrogenase) des Gärungsstoffwechsels von *C. acetobutylicum* konnten jeweils mittels des pT-Vektors homolog exprimiert werden. Die Richtigkeit der Expression wurde mittels spezifischer Enzymassay nachgewiesen. Erstmals war auch eine Butyryl-CoA Dehydrogenase in *C. acetobutylicum* nachweisbar. Die vermehrte Expression der zentralen Schlüsselenzyme führten zu Phänotypen mit differenziell verändertem Gärungsstoffwechsel. Es konnte jedoch kein idealer Butanolproduzent generiert werden.
3. Es konnte ein gekoppelter *PhaB*/Thiolaseassay in 96-Well-Mikrotiterplatten für ein High-Troughput-Screening-Verfahren etabliert werden. Hiermit war es möglich *E. coli*-Derivate mit einer reduzierten CoA-Sensitivität zu ermitteln.
4. Eine plasmid-vermittelte homologe *thlA*-Expression - mit folgenden Aminosäuresubstitutionen: R133G, H156N und G222V - in *C. acetobutylicum*, führten zu einem Phänotypen mit erhöhter Butanolproduktion (vergleichend zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT).

## Literaturverzeichnis

**ALSAKER, K. V. & PAPOUTSAKIS, E.** (2005). Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **187**:7103-7118.

**ALSAKER, K.; SPITZER, T. & PAPOUTSAKIS E. T.** (2004). Transcriptional analysis of *spo0A* overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress. *J Bacteriol.* **186**:1959-1971.

**ATSUMI, S.; CANN, A.; CONNOR, M.; SHEN, C.; SMITH, K.; BRYNILDSEN, M.P.; CHOU, K. J.; HANAI, T. & LIAO, J. C.** (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng.* **10**:305–11.

**BAER, S. H.; BLASCHEK, H. & SMITH, T.** (1987). Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2854-2861.

**BAHL, H. & DÜRRE, P.** (2001). Clostridia: biology and medical applications. Weinheim, Germany: In Mitchell, W. J. (Hrsg.), WILEY-VCH.

**BAHL, H.; MÜLLER, H.; BEHRENS, S.; JOSEPH, H. & NARBERHAUS, F.** (1995). Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews.* **17**: 341-348.

**BAILEY, J. E.** (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science.* **252**:1668-1675.

**BALTZ, R. H.** (2006). Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol.* **24**:1533–1540.

**BEREZINA, O. V.; ZAKHAROVA, N. V.; BRANDT, A.; YAROTSKY, S. V.; SCHWARZ, W. H. & ZVERLOV, V. V.** (2010). Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **87**:635–646.

**BERMEJO, L. L.; WELKER, N. & PAPOUTSAKIS, E.** (1998). Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Genes in *Escherichia coli* for Acetone Production and Acetate Detoxification. *Applied and Environmental Microbiology.* **64**:1079-1085.

**BERTRAM, J.; HOSSAIN, M.; PUNG, A. & RUNDHAUG, J.** (1989). Development of *in vitro* systems for chemoprevention research. *Prev. Med.* **18**:562-75.

**BIRNBOIM, H. & DOLY, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

**BLUM, P.; ORY, J.; BAUERNFEIND, J. & KRŠKA, J.** (1992). Physiological consequences of *DnaK* and *DnaJ* overproduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:7436–7444.

**BLUSSON, H.; PETITDEMANGE, H. & GAY, R.** (1981). A New, Fast, and Sensitive Assay for NADH-Ferredoxin Oxidoreductase Detection in Clostridia. *Anal. Biochem.* **110**:176-181.

**BOWLES, L. K. & ELLEFSON, W.** (1985). Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1165–1170.

**BOYNTON, Z. L.; BENNETT, G. & RUDOLPH, F.** (1996). Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **178**:3015-24.

**BRADFORD, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

**BREKASIS, D. & PAGET, M.** (2003). A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* **22**:4856–4865.

**BUDDE, C.; MAHAN, A.; LU, J.; RHA, C. & SINSKEY, A.** (2010). Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **192**:5319-28.

**CHASE, J. F.; MIDDLETON, B. & TUBBS, P.** (1966). A coenzym A analogue, desulpho-CoA: Preparation and effects on various enzymes. *Biochem Biophys Res Comm.* **23**:208-213.

**CHESTER, N. & MARSHAK, D.** (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer T<sub>m</sub> reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **209**:284-290.

**CHIAO, J. S. & SUN, Z.** (2007). History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology. *J.Mol.Microbiol. Biotechnol.* **13**:12–14.

**COLBY, G. & CHEN, J.** (1992). Purification and Properties of 3-Hydroxybutyryl-Coenzyme A Dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* ("*Clostridium butylicum*") NRRL B593. *Appl Environ Microbiol.* **58**:3297-3302.



**DAVIS, J. T.; MOORE, R.; IMPERIALI, B.; PRATT, A.; KOBAYASHI, K.; MASAMUNE, S.; SINSKEY, A. J.; WALSH, C. T.; FUKUI, T. & TOMITA, K.** (1987). Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. I. Preliminary characterization and analysis of proton transfer reaction. *J. Biol. Chem.* **262**:82-89.

**DEGENKOLB, J.; TAKAHASHI, M.; ELLESTAD, G. & HILLEN, W.** (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: Determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogues with the Tet repressor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1591-1595.

**DICKERSON, R. & GEIS, I.** (1999). CHEMIE - eine lebendige und anschauliche Einführung. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.

**DOWER, W.; MILLER, J. & RAGSDALE, C.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res.* **16**:6127-6145.

**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.* **12**:1525-34.

**DÜRRE, P.** (2008). Fermentative Butanol Production Bulk Chemical and Biofuel. *New York Academy of Sciences.* **1125**:353-362.

**EISENBERG, D.; WEISS, R. & TERWILLIGER, T.** (1982). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature.* **5881**:371-374.

**EZEJI, T.; MILNE, C.; PRICE, N. & BLASCHEK, H.** (2010). Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol producing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* **85**:1697-1712.

**FEIGENBAUM, J., & SCHULZ, H.** (1975). Thiolases of *Escherichia coli*: purification und chain length specificities. *J Bacteriol.* **122**:407-411.

**FIOCCO, D.; CAPOZZI, V.; GOFFIN, P.; HOLS, P. & SPANO, G.** (2007). Improved adaptation to heat, cold and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:909-915.

**FONTAINE, L.; MEYNIAL-SALLES, I.; GIRBAL, L.; YANG, X.; CROUX, C. & SOUCAILLE, P.** (2002). Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol.* **184**:821-830.

**GHESHLAGHI, R.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M. & CHOU, C. P.** (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol. Adv.* **27**:764-81.

**GIRBAL, L. & SOUCAILLE, P.** (1998). Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Trends Biotechnol.* **16**:1-16.

**GIRBAL, L.; CROUX, C.; VASCONCELOS, I. & SOUCAILLE, P.** (1995). Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol Rev.* **17**:287-297.

**GIRBAL, L.; MORTIER-BARRIERE, I.; RAYNAUD, F.; ROUANET, C.; CROUX, C. & SOUCAILLE, P.** (2003). Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol.* **71**:2777-2781.

**GIRBAL, L.; VON ABENDROTH, G.; WINKLER, M.; BENTON, P.; MEYNIAL-SALLES, I.; CROUX, C.; PETERS, J. W.; HAPPE, T. & SOUCAILLE, P.** (2005). Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol.* **71**:2777-2781.

**GREEN, E. M.** (2011). Fermentative production of butanol - the industrial perspective. *Curr Opin Biotechnol.* **22**:337-343.

**GREEN, E.; BOYNTON, Z.; HARRIS, L.; RUDOLPH, F.; PAPOUTSAKIS, E. & BENNETT, G.** (1996). Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology.* **142**:2079-2086.

**GRIMMLER, C.; JANSSEN, H.; KRAUß, D.; FISCHER, R.-J.; BAHL, H.; DÜRRE, P.; LIEBL, W. & EHRENREICH, A.** (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **20**:1-15.

**GRUPE, H. & GOTTSCHALK, G.** (1992). Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *App. Environ. Microbiol.* **58**:3896-3902.

**HAAPALAINEN, A. M.; MERILÄINEN, G. & WIERENGA, R.** (2006). The thiolase superfamily: Condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends in Biochemical Sciences*. **31**:64-71.

**HAASE, D.** (2012). Charakterisierung von Elektronentransfer-Flavoproteinen in *Clostridium acetobutylicum*. Universität Rostock, Diplomarbeit.

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

**HARTMANIS, M. & GATENBECK, S.** (1984). Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:1277-1283.

**HAYWOOD, G.; ANDERSON, A.; CHU, L. & DAWES, E.** (1988). The role of NADH- and NADPH acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**:259-264.

**HEAP, J.; PENNINGTON, O.; CARTMAN, S.; CARTER, G. & MINTON, N.** (2007). The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods*. **70**:452-464.

**HERRMANN, G.; JAYAMANI, E.; MAI, G. & BUCKEL, W.** (2008). Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *J Bacteriol.* **190**:784-791.

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

**HILLMANN, F.; DÖRING, C.; RIEBE, O.; EHRENREICH, A.; FISCHER, R.-J. & BAHL, H.** (2009). The role of PerR in O<sub>2</sub>-affected gene expression of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **191**:6082-6093.

**HÖNICKE, D.** (2009). Vergleichende Gentranskriptionsanalysen zur Butanolproduktion von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Diplomarbeit. Universität Rostock.

**HÖNICKE, D.; JANSSEN, H.; GRIMMLER, C.; EHRENREICH, A. & LÜTKE-EVERSLOH, T.** (2012). Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. *N Biotechnol.* DOI: 10.1016/j.nbt.2012.01.001.

**HÜSEMANN, M. H. & PAPOUTSAKIS, E.** (1989). Comparison between in vivo and in vitro enzyme activities in continuous and batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **30**:585-595.

**HUTKINS, R. W. & KASHKET, E.** (1986). Phosphotransferase activity in *Clostridium acetobutylicum* from acidogenic and solventogenic phases of growth. *Appl Environ Microbiol.* **51**:1121-1123.

**IKEDA, M.** (2003). Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **79**:1-35.

**INUI, M.; SUDA, M.; KIMURA, S.; YASUDA, K.; SUZUKI, H.; TODA, H.; YAMAMOTO, S.; OKINO, S.; SUZUKI, N. & YUKAWA, H.** (2008). Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:1305–1316.

**JANSEN, H.** (2007). Granulose-Granula in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Diplomarbeit, Universität Rostock.

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

**JANSEN, H.; DÖRING, C.; EHRENREICH, A.; VOIGT, B.; HECKER, M.; BAHL, H. & FISCHER, R.-J.** (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.

**JANSEN, H.; GRIMMLER, C.; EHRENREICH, A.; BAHL, H. & FISCHER, R.-J.** (2012). A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum*—Solvent stress caused by a transient *n*-butanol pulse. *J Biotechnol.* in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.027>.

**JENKINS, L. & NUNN, W.** (1987). Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: The *atoB* system. *J Bacteriol.* **169**:42-52.

**JIANG, Y.; XU, C.; DONG, F.; YANG, Y.; JIANG, W. & YANG, S.** (2009). Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene insolvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metab.Eng.* **11**:284–291.

**JOJIMA, T.; INUI, M. & YUKAWA, H.** (2008). Production of isopropanol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **77**:1219–1224.

**JONES, D. T. & WOODS, D.** (1986). Acetone–butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev.* **50**:484-524.

- JONES, D. T.; VAN DER WESTHUIZEN, A.; LONG, S. & ALLCOCK, E.** (1982). Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1434-1439.
- KARLSON, P.; DOENECKE, D.; KOOLMAN, J.; FUCHS, G. & GEROK, W.** (2005). Biochemie und Pathobiochemie. Georg Thieme Verlag.
- KURSULA, P.; OJALA, J.; LAMBEIR, A. & WIERENGA, R.** (2002). The catalytic cycle of biosynthetic thiolase: a conformational journey of an acetyl group through four binding modes and two oxyanion holes. *Biochem.* **41**:15543–15556.
- LAEMMLI, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
- LEE, S. Y.; PARK, J.; JANG, S.; NIELSEN, L.; KIM, J. & JUNG, K.** (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol Bioeng.* **101**:209-228.
- LEHMANN, D. & LÜTKE-EVERSLOH, T.** (2011). Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metab. Eng.* **13**:464-73.
- LEHMANN, D.; HÖNICKE, D.; EHRENREICH, A.; SCHMIDT, M.; WEUSTER-BOTZ, D.; BAHL, H. & LÜTKE-EVERSLOH, T.** (2012). Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: Physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Appl Microbiol Biotechnol.* **94**:743-54
- LI, F.; HINDERBERGER, J.; SEEDORF, H.; ZHANG, J.; BUCKEL, W. & THAUER, R.** (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.
- LIU, S.; BISCHOFF, K.; QURESHI, N.; HUGHES, S. & RICH, J.** (2010). Functional expression of the thiolase gene *thl* from *Clostridium beijerinckii* P260 in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus buchneri*. *N Biotechnol.* **27**:283-8.
- LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. & HEINRICH, P.** (2007). Biochemie & Pathobiochemie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- LONG, S.; JONES, D. T. & WOODS, D. R.** (1984). The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Biotechnol. Lett.* **6**:529-534.
- LU, J.; TAPPEL, R. & NOMURA, C.** (2009). Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Rev.* **49**:226-248.

**LÜTKE-EVERSLOH, T. & BAHL, H.** (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Biotechnol.* **22**:634-47.

**MADAN, V.; HILLMER, P. & GOTTSCHALK, G.** (1973). Purification and properties of NADP-dependent L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* **32**:51-56.

**MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. & PARKER, J.** (2000). Brock: biology of microorganism, dt. Übersetzung Goebel, W. (Hrsg.). Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.

**MANSILLA, M. C.; CYBULSKI, L.; ALBANESI, D. & DE MENDOZA, D.** (2004). Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**:6681-6688.

**MAO, S.; LUO, Y.; ZHANG, T.; LI, J.; BAO, G. ZHU, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, Y.; LI, Y. & MA, Y.** (2010). Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield. *Proteome Res.* **9**:3046-3061.

**MERILÄINEN, G.; POIKELA, V.; KURSULA, P. & WIERENGA, R.** (2009). The thiolase reaction mechanism: the importance of Asn316 and His348 for stabilizing the enolate intermediate of the Claisen condensation. *Biochem.* **48**:11011-11025.

**MERILÄINEN, G.; SCHMITZ, W.; WIERENGA, R. & KURSULA, P.** (2008). The sulfur atoms of the substrate CoA and the catalytic cysteine are required for a productive mode of substrate binding in bacterial biosynthetic thiolase, a thioester-dependent enzyme. *FEBS Journal.* **275**:6136-6148.

**MERMELSTEIN, L. & PAPOUTSAKIS, E.** (1993). *In vivo* methylation in *E. coli* by the *Bacillus subtilis* phage  $\Phi$ 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Env Microbiol.* **59**:1077-1081.

**MERMELSTEIN, L.; WELKER, N.; BENNETT, G. & PAPOUTSAKIS, E.** (1992). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio Technol.* **10**:190-195.

**MEYER, C. L.; ROOS, J. & PAPOUTSAKIS, E.** (1986). Carbon monoxide gasing leads to alcohol production and butyrate uptake without acetone formation in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **24**:159-167.

**MINTON, N.** (2006). Laboratory workshop, Protocol for clostridial gene knockout using pMTL007. Institute of Infection, Immunity and Inflammation, School of Molecular Medical Sciences, Centre for Biomolecular Sciences. University of Nottingham.

**MITCHELL, W. J.** (1998). Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv Microb Physiol.* **39**:31–130.

**MODIS, Y. & WIERENGA, R.** (1999). A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: The crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure.* **7**:1279-1290.

**MODIS, Y. & WIERENGA, R.** (2000). Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *J Mol Biol.* **297**:1171-1182.

**MONOT, F.; MARTIN, J.; PETITDEMANGE, H. & GAY, R.** (1982). Acetone und Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Appli Env Microbiol.* **44**:1318-1324.

**NAIR, R.; BENNETT, G. & PAPOUTSAKIS, E.** (1994). Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol.* **176**:871–885.

**NARBERHAUS, F. & BAHL, H.** (1992). Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **174**:3282-3289.

**NARBERHAUS, F.; GIEBELER, K. & BAHL, H.** (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.

**NI, Y. & SUN, Z.** (2009). Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**:415-423.

**NICOLAOU, S.; GAIDA, S. & PAPOUTSAKIS, E.** (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab Eng.* **12**:307-331.

**NÖLLING, J.; BRETON, G.; OMELCHENKO, M.; MAKAROVA, K.; ZENG, Q.; GIBSON, R.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; QUI, D.; HITTI, J.; WOLF, Y. I.; TATUSOV, R. L.; SABATHE, F.; DOUCETTE-STAMM, L.; SOUCAILLE, P.; DALY, M. J.; BENNETT, G. N.; KOONIN, E. V. & SMITH, D. R.** (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **183**:4823-38.

**PACE, C. P. & STANKOVICH, M.** (1987). Redox properties of electrontransferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim Biophys Acta.* **911**:267–276.

- PAPOUTSAKIS, E. T.** (2008). Engineering solventogenic clostridia. *Curr.Opin.Biotechnol.* **19**:420-429.
- RHIE, H. G. & DENNIS, D.** (1995). Role of *fadR* and *atoC*(Con) mutations in poly (3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *pha<sup>+</sup> Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **61**:2487-2492.
- RICCI, J. C. & HERNANDEZ, M.** (2000). Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Crit. Rev. Biotechnol.* **20**:79–108.
- RIEBE, O.** (2009). Enzyme und Reaktionswege zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies in *Clostridium acetobutylicum*. Universität Rostock, Dissertation.
- RIEGER, T.** (2006). Sporulation und Glykogensynthese bei *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Universität Rostock, Diplomarbeit.
- RÜNGELING, E.; LAUFEN, T. & BAHL, H.** (1999). Functional characterisation of the chaperones *DnaK*, *DnaJ* and *GrpE* from *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett.* **170**:119-23.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- SCHWARZ, K. M.; KUIT, W.; GRIMMLER, C.; EHRENREICH, A. & KENGEN, S.** (2012). A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of *Clostridium acetobutylicum* – Cellular behavior in adaptation to *n*-butanol. *J Bacteriol.* in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.018>.
- SILLERS, R.; AL-HINAI, M. & PAPOUTSAKIS, E.** (2009). Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol Bioeng.* **102**:38-49.
- SILLERS, R.; CHOW, A.; TRACY, B. & PAPOUTSAKIS, E.** (2008). Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metab Eng.* **10**:321-332.
- SLATER, S.; GALLAHER, T. & DENNIS, D.** (1992). Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol.* **58**:1089-1094.



**SPIEKERMANN, P.; REHM, B.; KALSCHUEER, R.; BAUMEISTER, D. & STEINBÜCHEL, A.** (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol.* **171**:73-80.

**STEEN, E. J., CHAN, R., PRASAD, N., MYERS, S., PETZOLD, C., REDDING, A.; OUELLET, M. & KEASLING, J. D.** (2008). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of *n*-butanol. *Microbial Cell Factories*. DOI: 10.1186/1475-2859-7-36.

**STRAUSS, E. & BEGLEY, T.** (2002). The antibiotic activity of N-pentylpantothenamide results from its conversion to ethyldethia-coenzyme a, a coenzyme a antimetabolite. *J Biol Chem.* **277**:48205-48209.

**TANAKA, T.; SHIMA, Y.; OGAWA, N.; NAGAYAMA, K.; YOSHIDA, T. & OHMACHI, T.** (2011). Expression, Identification and Purification of Dictyostelium Acetoacetyl-CoA Thiolase Expressed in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci.* **7**:9-17.

**TAYLOR, M.; TUFFIN, M.; BURTON, S.; ELEY, K. & COWAN, D.** (2008). Microbial responses to solvent and alcohol stress. *Biotechnol J.* **3**:1388-1397.

**THOMAS, J. & BANEYX, F.** (2000). *ClpB* and *HtpG* facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol.* **36**:1360-70.

**THOMPSON, S.; MAYERL, F.; PEOPLES, O.; MASAMUNE, S.; SINSKEY, A. & WALSH, C.** (1989). Mechanistic studies on beta-ketoacyl thiolase from *Zoogloea ramigera*: identification of the active-site nucleophile as Cys89, its mutation to Ser89, and kinetic and thermodynamic characterization of wild-type and mutant enzymes. *Biochem.* **28**: 5735–5742.

**THORMANN, K.; FEUSTEL, L.; LORENZ, K.; NAKOTTE, S. & DÜRRE, P.** (2002). Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *J Bacteriol* **184**:1966-1973.

**TOKIWA, Y. & UGWU, C.** (2007). Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *J Biotechnol.* **132**:264–272.

**TOMAS, C. A.; BEAMISH, J. & PAPOUTSAKIS, E.** (2004). Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **186**:2006-2018.

**TOMAS, C.; WELKER, N. & PAPOUTSAKIS, E.** (2003). Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl Environ Microbiol.* **69**:4951-65.

**TUMMALA, S.; WELKER, N. & PAPOUTSAKIS, E.** (1999). Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3793-3799.

**TUMMALA, S.; WELKER, N. & PAPOUTSAKIS, E.** (2003). Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **185**:1923-1934.

**UHLIG, R.** (2011). Das Protein Cac0116 aus *Clostridium acetobutylicum* - eine Kohlenstoffmonoxid - Dehydrogenase? Universität Rostock; Diplomarbeit.

**VOLLHERBST-SCHNECK, K.; SANDS, J. & MONTENECOURT, B.** (1984). Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:193-194.

**WATERSON, R. M.; CASTELLINO, F.; HASS, G. & HILL, R.** (1972). Purification and Characterization of Crotonase from *Clostridium acetobutylicum*. *J Biol Chem.* **247**:5266-5271.

**WEIZMANN, C.** (1915). Patentnr. British Patent 4845.

**WIESENBORN, D.; RUDOLPH, F. & PAPOUTSAKIS, E.** (1988). Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Appl Environ Microbiol.* **54**:2717-2722.

**WIETZKE, M. & BAHL, H.** (2012). The redox-sensing protein *Rex*, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* DOI: 10.1007/s00253-012-4112-2.

**WINZER, K.; LORENZ, K.; ZICKNER, B. & DÜRRE, P.** (2000). Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2**:531-541.

**YANG, S.; YANG, X.; HEALY-LOUIE, G.; SCHULZ, H. & ELZINGA, M.** (1990). Nucleotide sequence of the *fadA* gene. Primary structure of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase from *Escherichia coli* and the structural organization of the *fadAB* operon. *J Biol Chem.* **265**:10424-10429.

**YOUNG, M.; MINTON, N. & STAUDENBAUER, W.** (1989). Recent advances in the genetics of the clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**:301-326.

## Anhang

**Tab. A1: Physiologische Parameter und Gärungsendprodukte von *C. acetobutylicum* pT<sub>grpE</sub>, *C. acetobutylicum* pT<sub>groESL</sub> und *C. acetobutylicum* pT<sub>htpG</sub> im Vergleich zu *C. acetobutylicum* ATCC 824 und zum Vektorkontroll-Stamm pT. Dargestellt sind die Mittelwerte von je drei 200 ml MS-MES Kulturen.**

Parameter	<i>C. ac.</i> ATCC 824	<i>C. ac.</i> pT	<i>C. ac.</i> pT <i>grpE</i>	<i>C. ac.</i> pT <i>groESL</i>	<i>C. ac.</i> pT <i>htpG</i>
Wachstumsrate ( $\mu$ )	0,14 h <sup>-1</sup>	0,12 h <sup>-1</sup>	0,01 h <sup>-1</sup>	0,13 h <sup>-1</sup>	0,13 h <sup>-1</sup>
Verdopplungszeit ( $t_D$ )	297 min	346 min	4158 min	319 min	319 min
max. OD <sub>600</sub> (nach)	4,35 (47 h)	4,04 (47 h)	0,77 (89 h)	6,15 (83 h)	4,1 (47 h)
min. pH-Wert (nach)	4,5 (40 h)	4,55 (40)	4,82 (93 h)	4,57 (40 h)	4,4 (60 h)
Acetat [(mM) nach 96 h]	16±2,0	12±3,5	30±2,0	14±2,4	11±2,1
Butyrat [(mM) nach 96 h]	3±2,2	2±1,8	5±1,0	2±1,2	2±0,9
Ethanol [(mM) nach 96 h]	38±5,0	38±1,4	20±1,6	37±4,3	37±3,4
Aceton [(mM) nach 96 h]	70±3,5	71±3,1	55±5,1	70±2,1	70±2,4
Butanol [(mM) nach 96 h]	141±12	126±6,0	69±1,8	130±11	107±6,4
Verhältnis Aceton:Butanol:Ethanol	2 : 3,7 : 1	1,8 : 3,3 : 1	1,2 : 3,5 : 1	1,8 : 3,5 : 1	1,8 : 3,7 : 1

**Tab. A2: Physiologische Parameter und Gärungsendprodukte von *C. acetobutylicum* pT<sub>thIA</sub>, *C. acetobutylicum* pT<sub>hbd</sub>, *C. acetobutylicum* pT<sub>crt</sub> und *C. acetobutylicum* pT<sub>bcd\_etfA\_etfB</sub> im Vergleich zum Vektorkontroll-Stamm pT und zu *C. acetobutylicum* ATCC 824. Dargestellt sind die Mittelwerte von je drei 100 ml MS-MES Kulturen.**

Parameter	<i>C. ac.</i> ATCC 824	<i>C. ac.</i> pT	<i>C. ac.</i> pT <sub>thIA</sub>	<i>C. ac.</i> pT <sub>hbd</sub>	<i>C. ac.</i> pT <sub>crt</sub>	<i>C. ac.</i> pT <sub>bcd_</sub> etfA_etfB
Wachstumsrate ( $\mu$ )	0,14 h <sup>-1</sup>	0,14 h <sup>-1</sup>	0,12 h <sup>-1</sup>	0,15 h <sup>-1</sup>	0,18 h <sup>-1</sup>	0,19 h <sup>-1</sup>
Verdopplungszeit (t <sub>D</sub> )	297 min	297 min	346 min	277 min	231 min	218 min
max. OD <sub>600</sub> (nach)	10 (46 h)	9 (46 h)	14 (46 h)	12 (46 h)	14 (46 h)	11 (62 h)
min. pH-Wert (nach)	4,44 (71 h)	4,74 (62 h)	4,53 (67 h)	4,64 (62 h)	4,70 (67 h)	4,77 (67 h)
Acetat [(mM) nach 88 h]	5,9±0,8	18±1,8	10±0,5	9±0,6	15±1,4	20±1,2
Butyrat [(mM) nach 88 h]	1,1±1,0	0,6±0,5	0±0	0±0	0±0	0±0
Ethanol [(mM) nach 88 h]	29±11	52±1,8	113±2,1	162±2,5	178±3,9	99±2,5
Aceton [(mM) nach 88 h]	67±1,5	77±7,8	125±1,2	104±3,8	87±1,5	82±1,5
Butanol [(mM) nach 88 h]	142±2,2	140±2,2	185±1,2	182±3,4	177±3,5	163±2,3
Verhältnis Aceton:Butanol:Ethanol	2,5:4,8:1	1,5:2,6:1	1,1:1,6:1	1:1,7:1,5	1:2:2	1:1,9:1,2

**Tab. A3: Physiologische Parameter und Gärungsendprodukte von *C. acetobutylicum* pT<sub>thIA</sub><sup>Derivat</sup> im Vergleich zum *C. acetobutylicum* pT<sub>thIA</sub><sup>WT</sup> und zum Vektorkontroll-Stamm pT. Dargestellt sind die Mittelwerte von je drei 200 ml MS-MES Kulturen.**

Parameter	<i>C. ac.</i> pT <sub>thIA</sub> <sup>Derivat</sup>	<i>C. ac.</i> pT <sub>thIA</sub> <sup>WT</sup>	<i>C. ac.</i> pT
Wachstumsrate ( $\mu$ )	0,13 h <sup>-1</sup>	0,13 h <sup>-1</sup>	0,14 h <sup>-1</sup>
Verdopplungszeit (t <sub>D</sub> )	319 min	319 min	297 min
max. OD <sub>600</sub> (nach)	7,8 (48 h)	11 (48 h)	8,8 (46 h)
min. pH-Wert (nach)	4,57 (39 h)	4,59 (68 h)	4,61 (68 h)
Acetat [(mM) nach 88 h]	24±2,0	12±1,1	11±0,9
Butyrat [(mM) nach 88 h]	0±0,0	0±0,0	0±0,0
Ethanol [(mM) nach 88 h]	109±2,5	124±3,2	89±1,0
Aceton [(mM) nach 88 h]	77±1,0	82±1,3	78±01,1
Butanol [(mM) nach 88 h]	168±1,0	161±0,5	142±1,9
Verhältnis Aceton:Butanol:Ethanol	1:2,1:1,4	1:2:1,4	1:1,8:1,1











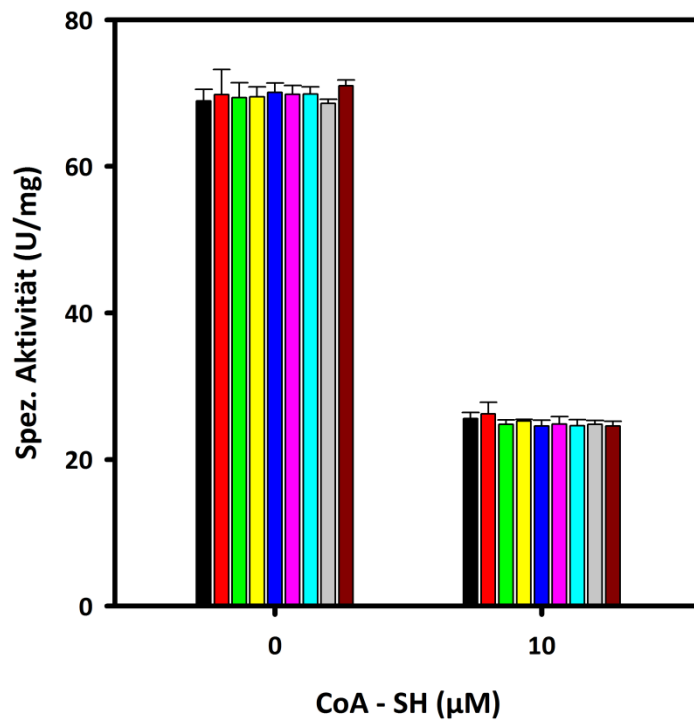






	1130	1140	1150	1160	1170	1180	
Prot.	K--G--L--A--T--L--C--I--G--G--G--Q--G--T--A--I--L--L--E--K--C--G--T--						394
1107435Th1A	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-A04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-A05	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-A06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-A07	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-A09	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-B03	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1186
1107435-B04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-B06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-B07	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-B10	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-C04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-C05	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-C06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-C09	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-C10	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-D02	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1187
1107435-D03	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-D04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-D05	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-D06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-D11	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-E01	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-E02	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-E03	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-E04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1185
1107435-E05	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-E06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1186
1107435-E08	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-F02	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1187
1107435-F04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-F05	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-F06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G02	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G03	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G04	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G05	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G07	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G08	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-G10	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1186
1107435-G11	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-H03	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1187
1107435-H06	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-H07	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1187
1107435-H08	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-H09	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1187
1107435-H10	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188
1107435-H11	AAGGACTTGCAACATTATGTATTGGAGGTGGACAAGGTACAGCAATATTACTTGAAAAATGTGGTACC						1188

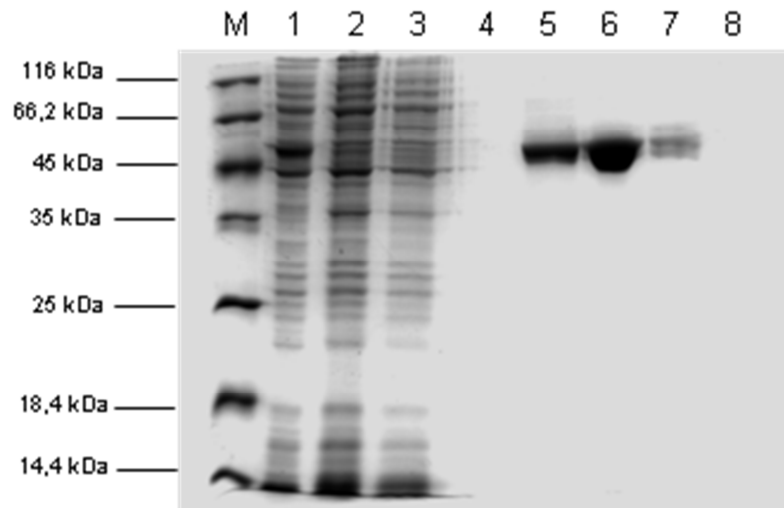
**Abb. A1: Vergleich der Nukleotidsequenz von 48 Klonen (6 pASK-IBA3\_ *thIA*<sup>MUT</sup>)** Die Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart AG, Regensburg, Germany durchgeführt. Schwarz hinterlegte Buchstaben stellen den mutierten Bereich (CoA - Bindestelle) der Thiolase dar. Rote Buchstaben markieren die Mutation innerhalb der Nukleotidsequenz (Geneart AG, Regensburg, Germany).



**Abb. A2:** Spezifische Thiolase - Aktivitäten (U/mg) in Gegenwart von 0 μM und 10 μM CoA - SH (pASK-IBA3\_thIA<sup>MUT</sup> - Klone mit hoher CoA - SH Sensitivität). Untersucht wurden pASK-IBA3\_thIA<sup>7D5</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>11B9</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>12B8</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>17C5</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>22B7</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>28C4</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>28B9</sup> (●), pASK-IBA3\_thIA<sup>30F3</sup> (●) im Vergleich zu pASK-IBA3\_thIA<sup>WT</sup> (●). Die Messungen erfolgten in Küvetten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Messungen.

<i>th1A_19C10</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
<i>th1A_25C8</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
<i>th1A_21B8</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
<i>th1A_28C9</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
<i>th1A_13D7</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
<i>th1A_9G4</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
<i>th1A_WT</i>	MKEVVIIASAVRTAIGSYGKSLKDVPAVDLGATAIKEAVKKAGIKPEDVNEVILGNVLQAG	60
*****		
<i>th1A_19C10</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
<i>th1A_25C8</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
<i>th1A_21B8</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
<i>th1A_28C9</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
<i>th1A_13D7</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
<i>th1A_9G4</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
<i>th1A_WT</i>	LGQNPARQASFKAGLPVEIPAMTINKVCGSGLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSR	120
*****		
<i>th1A_19C10</i>	APYLANNARWGYGMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYNGMITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
<i>th1A_25C8</i>	APYLANNARWGYGMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYNGMITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
<i>th1A_21B8</i>	APYLANNARWGYGMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYNGMITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
<i>th1A_28C9</i>	APYLANNARWGYGMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYNGMITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
<i>th1A_13D7</i>	APYLANNARWGYGMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYNGMITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
<i>th1A_9G4</i>	APYLANNARWGYGMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYNGMITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
<i>th1A_WT</i>	APYLANNARWGYRMGNAKFVDEMITDGLWDAFNDYHMGITAENIAERWNISREEQDEFAL	180
*****		
<i>th1A_19C10</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFVSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
<i>th1A_25C8</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFVSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
<i>th1A_21B8</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFVSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
<i>th1A_28C9</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFVSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
<i>th1A_13D7</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFVSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
<i>th1A_9G4</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFVSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
<i>th1A_WT</i>	ASQKKAEEAIIKSGQFKDEIVPVVVKGRKGETVVDTDEHPRFGSTIEGLAKLKPFAFKKDG	240
*****		
<i>th1A_19C10</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
<i>th1A_25C8</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
<i>th1A_21B8</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
<i>th1A_28C9</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
<i>th1A_13D7</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
<i>th1A_9G4</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
<i>th1A_WT</i>	VTAGNASGLNDCAAFLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYATKAAI	300
*****		
<i>th1A_19C10</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
<i>th1A_25C8</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
<i>th1A_21B8</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
<i>th1A_28C9</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
<i>th1A_13D7</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
<i>th1A_9G4</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
<i>th1A_WT</i>	EKAGWTVDELDELIESNEAFAAQSLAVAKDLKFDMNKVVNVNGGAIALGHPIGASGARILVT	360
*****		
<i>th1A_19C10</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
<i>th1A_25C8</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
<i>th1A_21B8</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
<i>th1A_28C9</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
<i>th1A_13D7</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
<i>th1A_9G4</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
<i>th1A_WT</i>	LVHAMQKRDAKGLATLCIGGGQGTAILLEKC	392
*****		

**Abb. A3: Vergleich der Aminosäuresequenz der Thiolasen von pASK-IBA3\_ *th1A*<sup>WT</sup> und 6 pASK-IBA3\_ *th1A*<sup>MUT</sup> - Klone mit signifikant reduzierter CoA - Sensitivität. Der Sequenzvergleich ist mit Hilfe von ClustalW 2.1 durchgeführt worden; Aminosäuren sind wie folgt gekennzeichnet: "\*" identische, ":" hohe Ähnlichkeit und " " keine Ähnlichkeit. Grau schattiert sind die putativen Aminosäuren die an der CoA - Bindung beteiligt sind.**



**Abb. A4: Aufreinigung von Strep-tag II-ThIA aus *E. coli* BL21-DE3 pASK-IBA3\_thIA.** Dargestellt ist ein 12%iges [w/v] SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. In jeder Spur sind 20 µg Protein aufgetragen. M: Unstained Marker (Fermentas); Spur 1: Zellüberstand; Spur 2: Durchfluss; Spur 3: 1. Waschung; Spur 4: 2. Waschung; Spur 5: 1. Elution; Spur 6: 2. Elution; Spur 7: 3. Elution, Spur 8: 4. Elution und Spur 9: 5.Elution.

## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** für das Ermöglichen einer selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit an der Universität Rostock und die Unterstützungen, die er mir dabei zukommen ließ.

Frau **Dr. Tina Lütke-Eversloh** danke ich für die Bereitstellung dieses Themas und die vielen kreativen Ideen dazu.

Herrn **Dr. Ralf-Jörg Fischer** und **Dr. Holger Janssen** gilt besonderer Dank für häufige Diskussionen, Motivationsgespräche und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei **Prof. Dr. Gerd Klöck** für das stätige Interesse meiner wissenschaftlichen Laufbahn, aber auch für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

**Dörte Lehmann** danke ich den stetigen konstruktiven Gedankenaustausch, für die gemeinsame Zeit während der Schreibphase und für ihren unaufhörlichen Optimismus. Danke!

Den Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, insbesondere **Ilona Boldt, Hella Goschke, Regina Karstädt, Antje May, Oliver Riebe, Monika Timm, Michael Scheel, Franziska Schulz, Ronny Uhlig, Deliana Vasileva, Daniela Wetzler, Mandy Wietzke** und **Katja Zimmermann**, gilt mein besonderer Dank für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, stetige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Der **Süd-Chemie AG** und dem **Projektträger Jülich** danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich meiner Familie **Jutta Klang, Marco Mann** und **Lynn Klang** für das fortwährende Interesse meiner Arbeit und die Hilfe jeglicher Art in dieser Zeit.

Herrn **Sebastian Franz** danke ich für die enormen Ermutigungen und Aufmunterungen sowie die moralische Unterstützung in dieser Zeit. Vielen Dank!



## Lebenslauf

Name	Miriam Stella Mann
Geburtsdatum	28.01.1984
Geburtsort	Castrop-Rauxel
08/1990 - 08/1994	Westhausen Grundschule in Dortmund-Westerfilde
08/1994 - 06/2003	Gustav-Heinemann-Gesamtschule in Dortmund-Huckarde, Abitur 06/2003
10/2003 - 08/2007	<b>Fachhochschule in Bremen</b> Internationaler Studiengang für Technische und Angewandte Biologie; Vertiefungsrichtung: Industriebiologie Bachelor-of-Science-Abschluss: 08/2007
10/2007 - 04/2009	<b>Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</b> Studiengang: Ökotoxikologie Vertiefungsrichtung: Ernährungswissenschaften Master-of-Science-Abschluss: 04/2009
10/2008 - 04/2009	<b>Universität Rostock</b> Abteilung: Mikrobiologie; Anfertigung einer experimentellen Masterarbeit Thema: Gärungsprodukte von <i>Clostridium acetobutylicum</i> in Gegenwart von Sauerstoff
seit 04/2009	Beginn der experimentellen Arbeit der vorliegenden Dissertation

## Publikationen

**MANN, M. S., DRAGOVIC, Z., SCHIRRMACHER, G., LÜTKE-EVERSLOH, T. 2012.**  
Overexpression of stress protein encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly  
adapt to butanol stress. *Biotech. Lett.* submitted

## **Selbstständigkeitserklärung**

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 02.05.2012

Miriam Stella Mann