

Metabolic Engineering von Clostridium pasteurianum
zur Optimierung der Biobutanolproduktion

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von
Rebekka Schmitz

aus
Münster

2018

1. Gutachter: Prof Dr. An-Ping Zeng
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Liese

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2018

If you can dream it, you can do it.

Walt Disney

Zusammenfassung

Die Bioproduktion von Chemikalien und Kraftstoffen ist aufgrund der steigenden Nachfrage nach alternativen, nachhaltigen Produktionswegen Gegenstand aktiver Forschung. *Clostridium pasteurianum* stellt einen attraktiven Mikroorganismus für die industrielle Bioproduktion dar, da dieser Stamm optimale Eigenschaften hinsichtlich Substratnutzung und Produktspektrum vereint: *C. pasteurianum* besitzt die Fähigkeit, Rohglycerol zu metabolisieren, welches beispielsweise bei der Biodieselproduktion als Abfallprodukt anfällt. Die Hauptprodukte der Glycerolfermentation von *C. pasteurianum* sind 1,3-Propanediol und n-Butanol, zwei Stoffe von hohem industriellen Wert.

Das industrielle Potential von *C. pasteurianum* konnte lange Zeit nicht voll ausgeschöpft werden, da die molekularen Werkzeuge zur Optimierung des Metabolismus dieses Stammes nicht verfügbar waren. Erst kürzlich gelang erstmals der DNA-Transfer in *C. pasteurianum*. Bis heute sind die Methoden für das *metabolic engineering* von *C. pasteurianum* wenig entwickelt und ineffizient.

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden für das *metabolic engineering* von *C. pasteurianum* analysiert und optimiert. Verschiedene Methoden für den DNA-Transfer wurden hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Transformation von *C. pasteurianum* getestet und verglichen. Gegenüber der Konjugation hat sich die Elektroporation als effizientere Methode für die Transformation von *C. pasteurianum* erwiesen. Ein neuartiger *C. pasteurianum*-Stamm (R525) wurde isoliert, welcher eine 50-fach gesteigerte Transformationseffizienz aufweist. Der elektrokompetente R525-Stamm wurde genotypisch sowie phänotypisch charakterisiert und als Basis für die Entwicklung optimierter Stämme verwendet.

Durch Überexpression der Pyruvatcarboxylase wurde der Kohlenstofffluss in *C. pasteurianum* am Pyruvat-Acetyl-CoA-Knotenpunkt umgeleitet mit dem Ziel, ein gesteigertes Wachstum und eine vermehrte Produktion auf Glycerol-Glukose-Cosubstrat zu erzielen. Der generierte Stamm liefert wertvolle neue Erkenntnisse zum Metabolismus von *C. pasteurianum*, insbesondere hinsichtlich des Citratzyklus, welcher bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist.

Verschiedene Gendelektionsmethoden wurden auf ihre Verwendbarkeit in *C. pasteurianum* hin untersucht. Das CRISPR-Cas9-Nickase-System konnte erstmalig in *C. pasteurianum* erfolgreich zur Gendelektion eingesetzt werden. Durch Deletion der Glyceroldehydratase-Untereinheit *dhaB* wurde die 1,3-Propanediol-Produktion ausgeschaltet und die Butanolproduktion selektiv erhöht. Die Bildung des Nebenpro-

duktes Butyrat war in diesem Stamm ebenfalls eliminiert. Durch Optimierung der Fermentationsbedingungen konnten mit diesem Stamm Butanolausbeuten von 0,371 - 0,385 mol/mol Substrat erzielt werden, welche zu den höchsten bisher erreichten gehören. Durch die Deletion der Glyceroldehydratase konnte erstmals gezeigt werden, dass die Kultivierung von *C. pasteurianum* auf Glycerol ohne die Bildung von 1,3-Propanediol möglich ist, was auf einen neuartigen Mechanismus der Redoxregulation in *C. pasteurianum* hinweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag zur Nutzung von *C. pasteurianum* für die industrielle Biobutanolproduktion, um den konventionellen, petrochemischen Prozessen zukünftig eine konkurrenzfähige, nachhaltige Alternative gegenüberzustellen.

Abstract

Research on bioproduction of chemicals and fuels is of great interest due to the increasing demand for alternative, sustainable production processes. *Clostridium pasteurianum* represents an appealing microorganism for industrial bioproduction as it combines favourable properties regarding substrate utilization and product spectrum: *C. pasteurianum* is able to metabolize raw glycerol which accumulates as byproduct in biodiesel production. The main products of glycerol fermentation by *C. pasteurianum* are 1,3-propanediol and n-butanol, two compounds of high industrial value.

The industrial potential of *C. pasteurianum* could not be fully exploited in the past, as molecular tools for the optimization of the cell's metabolism were not available. Recently, a protocol was developed which enabled DNA transfer to *C. pasteurianum* for the first time. To date, methods for metabolic engineering of *C. pasteurianum* are poorly developed and inefficient.

In this study, methods for metabolic engineering of *C. pasteurianum* were analyzed and optimized. Different DNA transfer methods were tested and compared regarding its applicability for transformation of *C. pasteurianum*. In contrast to conjugation, electroporation has proven to be more efficient for transformation of *C. pasteurianum*. A novel *C. pasteurianum* strain (R525) was isolated which exhibits 50-fold increased transformation efficiency. The genotype as well as the phenotype of the electrocompetent R525 strain were characterized and based on this strain, optimized strains were developed.

By overexpression of pyruvate carboxylase, carbon flux of *C. pasteurianum* was shifted at the pyruvate-acetyl-CoA node, aiming to increase growth and product formation of *C. pasteurianum* on glycerol/ glucose cosubstrate. The created mutant reveals valuable new insights into the metabolism of *C. pasteurianum*, especially regarding its citrate cycle which is not fully elucidated so far.

Several gene deletion methods were analyzed regarding their utility in *C. pasteurianum*. The CRISPR-Cas9 nickase system was successfully established for gene deletion in *C. pasteurianum* for the first time. By deletion of the glycerol dehydratase *dhaB* subunit, 1,3-propanediol production was shut down and butanol production was selectively enhanced. In addition, formation of the byproduct butyrate was eliminated in this strain. After optimization of fermentation conditions, butanol yields of 0.371 - 0.385 mol/mol substrate were reached with this strain, which are among the highest yields reported for *C. pasteurianum* to date. Glycerol dehydratase dele-

tion demonstrated for the first time that anaerobic cultivation of *C. pasteurianum* on glycerol without 1,3-propanediol formation is possible, revealing a new mechanism of redox regulation in *C. pasteurianum*.

The results of this study contribute to the utilization of *C. pasteurianum* for prospective industrial biobutanol production in order to oppose conventional petrochemical processes a competitive sustainable alternative.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fragestellung	3
1.2	Theoretische und technische Grundlagen	4
1.2.1	Mikrobielle Fermentation von Glycerol	4
1.2.2	Biotechnologische Nutzung von Clostridien	4
1.2.3	<i>Clostridium pasteurianum</i>	5
1.2.4	Cosubstrat-Fermentation und die Rolle der Pyruvatcarboxylase in <i>C. pasteurianum</i>	8
1.2.5	Die Rolle der Glyceroldehydratase im Glycerolstoffwechsel von <i>C. pas-</i> <i>teurianum</i>	9
1.2.6	<i>Metabolic engineering</i> von Clostridien zur Biobutanolproduktion . .	10
1.2.7	<i>Metabolic engineering</i> von <i>Clostridium pasteurianum</i>	11
1.2.7.1	Transformation von <i>C. pasteurianum</i>	11
1.2.7.2	ClosTron-Mutagenese	14
1.2.7.3	Genomeditierung mittels CRISPR-Cas	16
1.2.8	Analyse von <i>C. pasteurianum</i> -Fermentationen	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Kultivierung und Aufbewahrung der Bakterien	21
2.1.1	Kulturmedien	23
2.1.1.1	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	23
2.1.1.2	Medien für die Kultivierung von <i>C. pasteurianum</i>	24
2.1.2	Fermentation	25
2.1.3	Gasmessung, analytische Methoden und Berechnungen	26
2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1	PCR	26
2.2.1.1	In-Fusion-PCR	26
2.2.1.2	Kolonie-PCR	27
2.2.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten	28
2.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten und Extraktion von Plasmid-DNA	28
2.2.4	Extraktion genomischer DNA	29

2.2.5	Klonierung	29
2.2.6	<i>In vivo</i> -Methylierung und Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	34
2.2.7	Transformation	34
2.2.7.1	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.2.7.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	35
2.2.7.3	Transformation von <i>C. pasteurianum</i> mittels Konjugation	35
2.2.7.4	Elektrotransformation von <i>C. pasteurianum</i>	36
2.2.8	Plasmid-Curing	37
2.3	Proteinbiochemische Methoden	37
2.3.1	Präparation von Zelllysaten	37
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.3.3	SDS-PAGE	37
2.3.4	Pyruvatcarboxylase-Aktivitätstest	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Transformation von <i>C. pasteurianum</i>	40
3.1.1	Test verschiedener DNA-Transfermethoden für die Transformation von <i>C. pasteurianum</i>	40
3.1.1.1	Konjugation	40
3.1.1.2	Elektroporation	41
3.1.2	Generierung eines <i>C. pasteurianum</i> -Stammes mit gesteigerter Transformationseffizienz	43
3.1.3	Charakterisierung des elektrokompetenten <i>C. pasteurianum</i> R525-Stammes	44
3.2	<i>Metabolic Engineering</i> von <i>C. pasteurianum</i> durch Verschiebung des Kohlenstoffflusses am Pyruvat-Acetyl-CoA-Knotenpunkt	48
3.2.1	Generierung einer <i>C. pasteurianum</i> -Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante	49
3.2.2	Charakterisierung der <i>C. pasteurianum</i> -Pyruvatcarboxylase-Mutante	50
3.3	<i>Engineering</i> von <i>C. pasteurianum</i> für eine gesteigerte Butanolproduktion	55
3.3.1	Deletion der Glyceroldehydratase von <i>C. pasteurianum</i>	55
3.3.1.1	Gendeletion in <i>C. pasteurianum</i> mittels ClosTron-Mutagenese	55

3.3.1.2	Gendeletion in <i>C. pasteurianum</i> mittels CRISPR-Cas . . .	58
3.3.2	Charakterisierung der <i>C. pasteurianum-dhaB</i> -Mutante	61
3.3.2.1	Wachstum der <i>C. pasteurianum-dhaB</i> -Mutante auf Glycerol	65
3.3.2.2	Komplementierung der Deletion von <i>dhaB</i> in <i>C. pasteu-</i> <i>rianum</i>	67
4	Diskussion	68
4.1	Transformation von <i>C. pasteurianum</i> und Generierung des elektrokompe-	
	tenten R525-Stammes	68
4.2	Die Funktion der Pyruvatcarboxylase für den Kohlenstoffmetabolismus von	
	<i>C. pasteurianum</i>	72
4.3	Gendeletion in <i>C. pasteurianum</i>	74
4.4	Deletion des 1,3-PDO-Weges in <i>C. pasteurianum</i>	75
5	Schlussfolgerung und Ausblick	79
	Literatur	81

Abbildungsverzeichnis

1	Biodiesel- und Glycerolproduktion	2
2	<i>Clostridium pasteurianum</i>	5
3	Stoffwechselwege der <i>C. pasteurianum</i> -Fermentation	7
4	Glyceroldehydratase-Operon von <i>C. pasteurianum</i>	10
5	Biparentale und triparentale Konjugation	13
6	Elektroporationsprotokoll für <i>C. pasteurianum</i>	14
7	ClosTron-Mutagenese	15
8	CRISPR-Cas Typ I- und Typ II-System	16
9	Dasgip-Bioreaktor	26
10	In-Fusion-Klonierungsprotokoll	33
11	Transformation von <i>C. pasteurianum</i> mittels Konjugation und Elektroporation	42
12	Steigerung der Transformationseffizienz von <i>C. pasteurianum</i>	44
13	Genomsequenzierung des elektrokompetenten <i>C. pasteurianum</i> -R525-Stammes	45
14	Fermentationsergebnisse des <i>C. pasteurianum</i> -R525-Stammes	47
15	Produkte des <i>C. pasteurianum</i> -R525-Stammes	48
16	Generierung einer <i>C. pasteurianum</i> -Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante	49
17	Biochemische Charakterisierung der <i>C. pasteurianum</i> -Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante	50
18	Fermentationsergebnisse der <i>C. pasteurianum</i> -PC-Mutante	51
19	Produkte der <i>C. pasteurianum</i> -PC-Mutante	52
20	Analyse der Gasproduktion der <i>C. pasteurianum</i> -PC-Mutante	53
21	Produktverteilung der Pyruvatcarboxylase-Mutante	54
22	Transformation von <i>C. pasteurianum</i> mit ClosTron-Splitvektoren	56
23	Analyse der <i>C. pasteurianum</i> -ClosTron-Transformanten	57
24	Transformation von <i>C. pasteurianum</i> mit Typ I-CRISPR-Plasmid	59
25	Deletion von <i>dhaB</i> in <i>C. pasteurianum</i>	60
26	Fermentationsergebnisse der <i>C. pasteurianum</i> - <i>dhaB</i> -Mutante	63
27	Kohlenstoffverteilung der Fermentationen mit der <i>C. pasteurianum</i> - <i>dhaB</i> -Mutante	64

28	Butanolausbeute der <i>C. pasteurianum-dhaB</i> -Mutante	64
29	Optimierung der Kultivierung der <i>C. pasteurianum-dhaB</i> -Mutante	66
30	Komplementation der <i>dhaB</i> -Deletion in <i>C. pasteurianum</i>	67
31	Mutanten des Glyceroldehydratase-Operons von <i>C. pasteurianum</i>	78

Tabellenverzeichnis

1	Restriktionsendonukleasen von <i>C. pasteurianum</i>	12
2	Berechnung der Kohlenstoffverteilung	20
3	Verwendete Bakterienstämme	22
4	LB-Medium	23
5	SOB-Medium	23
6	SOC-Medium	23
7	RCM-Medium	24
8	Biebl-Medium	24
9	2x YTG-Medium	25
10	PCR-Pipettierschema für Klonierungen	27
11	PCR-Protokoll für Klonierungen	27
12	PCR-Pipettierschema für Kolonie-PCR	28
13	PCR-Protokoll für Kolonie-PCR	28
14	Verwendete Plasmide	31
15	Verwendete Oligonukleotide	32
16	Zusammensetzung des Laemmli-Puffers (4x) für die SDS-PAGE	38
17	Zusammensetzung des SDS-Gels	38
18	Zusammensetzung des Pyruvatcarboxylase-Reaktionspuffers	39
19	Vergleich verschiedener Transformationsmethoden für <i>C. pasteurianum</i>	43
20	Ergebnisse der R525-Genomsequenzierung	46
21	Ergebnisse der Fermentation der Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante	53
22	Ergebnisse der Fermentation der <i>dhaB</i> -Deletionsmutante	61
23	Mutationen von <i>C. pasteurianum</i> -Stämmen mit gesteigerter Transformations-effizienz	69

Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
Cas	CRISPR-associated
catP	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
C.	Clostridium
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ermRAM	<i>erythromycin retrotransposition-activated marker</i>
gRNA	Guide-RNA
IEP	<i>intron-encoded protein</i>
Kb	Kilobasenpaare
Kn	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
Nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAM	<i>protospacer-adjacent motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Pyruvatcarboxylase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
1,3-PDO	1,3-Propanediol
RCM	<i>reinforced clostridial medium</i>
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Streptococcus
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tm	Thiamphenicol
tracrRNA	transaktivierende crRNA
Wt	Wildtyp
YTG	<i>Yeast-Tryptone-Glucose</i>

Einheiten

Einheit	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
F	Farad
g	Gramm
Gt	Gigatonnen
h	Stunden
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	mol/Liter
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ω	Ohm
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunden
V	Volt

1 Einleitung

Eine Reihe von Gründen motiviert zur Forschung an der Bioproduktion von Chemikalien und Kraftstoffen. Der Klimawandel zeigt deutlich die Notwendigkeit neuer, umweltfreundlicher und nachhaltiger Produktionsverfahren an Stelle von Erdöl-basierten Verfahren. Durch die Verwendung fossiler Brennstoffe werden weltweit jährlich ca. 7 Gt Kohlenstoff in Form von CO₂ freigesetzt [88, 63]. Es wird erwartet, dass sich bei gleichbleibender Nutzung die CO₂-Konzentration in der Atmosphäre bis 2050 verdoppelt haben wird, mit fatalen Folgen für die Gesellschaft, Ökonomie und Umwelt [86, 66]. Eine stetig steigende Weltbevölkerung auf der einen und die Abhängigkeit von limitierten Ressourcen auf der anderen Seite sind weitere Gründe, alternative Produktionswege zu entwickeln.

Ein vielversprechendes alternatives Konzept für die Produktion von Chemikalien, Gasen oder Kraftstoffen stellt die Bioraffinerie dar. Im Gegensatz zu herkömmlichen, erdöl-basierten Raffinerien wird bei der Bioraffinerie Biomasse als Ausgangsmaterial verwendet. In Kombination mit der weißen Biotechnologie, der Nutzung von Mikroorganismen für die Produktion gewünschter Metabolite, ermöglicht dieser bio-basierte Prozess die nachhaltige Produktion einer Vielzahl von Stoffen. Durch die zusätzliche Nutzung von Nebenprodukten können der Gewinn sowie die Nachhaltigkeit des Prozesses gesteigert werden [17].

Unter den Produkten der Bioraffinerie kommt Biokraftstoffen eine zentrale Bedeutung zu. Diese tragen einen wichtigen Teil dazu bei, den steigenden Energiebedarf auf nachhaltige Weise zu decken. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Biodiesel den Netto-Treibhauseffekt reduziert [83]. Biodiesel wird durch die Transesterifizierung von Pflanzenölen hergestellt [5] (Abb. 1). Dazu werden hauptsächlich Sonnenblumen-, Raps-, Sojabohnen- und Palmöle verwendet. Als Nebenprodukt entsteht in dieser Reaktion Glycerol. Da der Anteil an Glycerol bis zu 10% der Endprodukte beträgt, ist es wichtig, dieses Nebenprodukt im Sinne des Bioraffinerie-Konzeptes weiterzuverwenden, um die Biodieselproduktion in einen rentablen Prozess zu konvertieren, welcher mit der petrochemischen Kraftstoffgewinnung konkurrieren kann [7]. Die mikrobielle Nutzung von Glycerol zur Herstellung industriell nutzbarer Plattformchemikalien, insbesondere Biobutanol, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

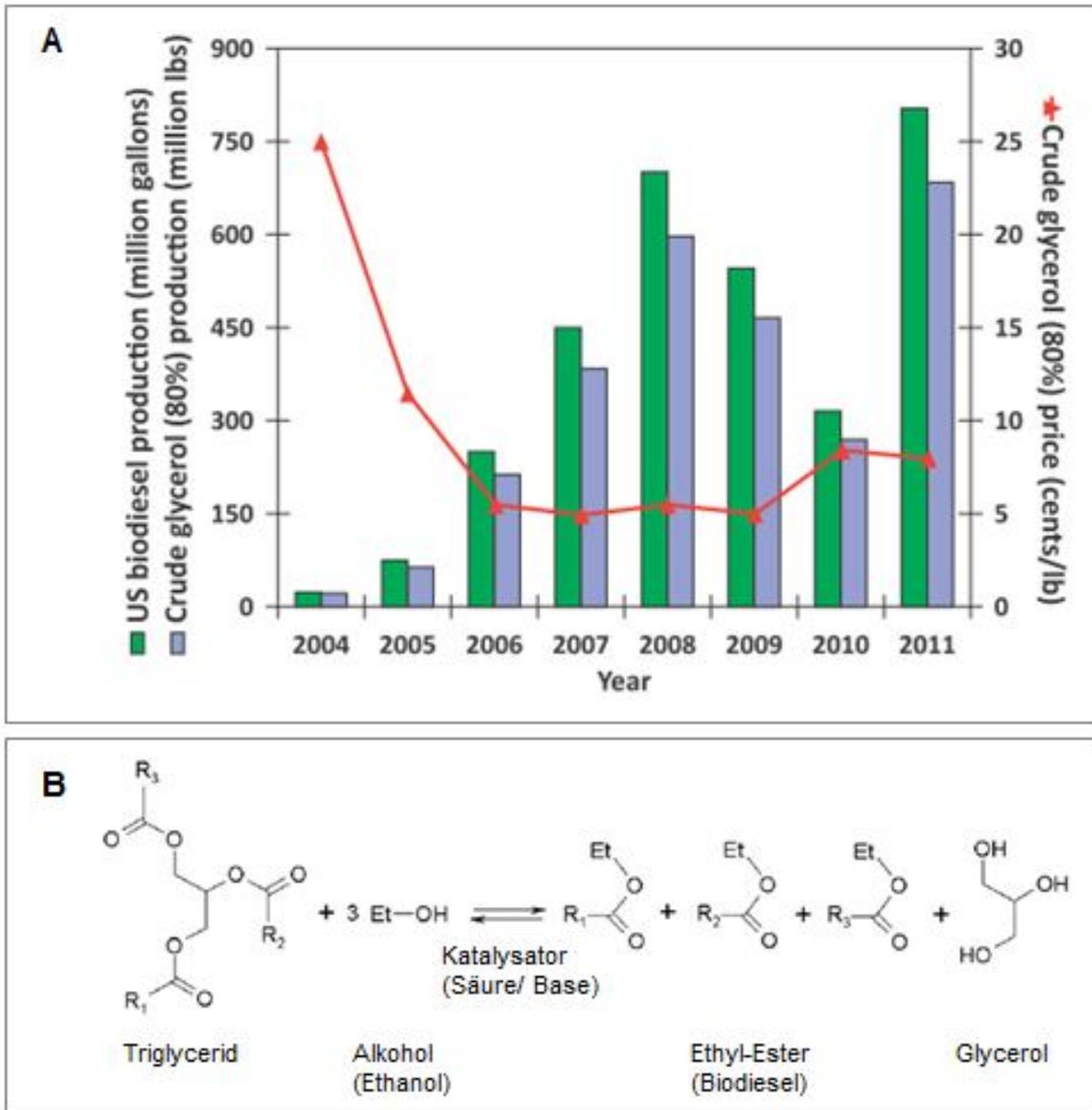


Abb. 1: US-Biodiesel- und Glycerolproduktion. A: Entwicklung der Biodieselproduktion und Glycerolpreise seit 2004 [17]. B: Bildung von Biodiesel aus Triglyceriden mit Glycerol als Nebenprodukt (nach [99]).

1.1 Fragestellung

Bis heute ist die industrielle Bioproduktion von Butanol nicht rentabel und nur mit Hilfe von Subventionen möglich. Somit kann sie nicht mit den Erdöl-basierten Produktionsverfahren konkurrieren. Weitere Forschung wird benötigt, um effiziente und nachhaltige Produktionsprozesse zu entwickeln. Die Verwendung von günstigen Substraten sowie die Steigerung der Erträge oder der Selektivität spezieller Produkte sind wichtige Ansatzpunkte.

Der Mikroorganismus *Clostridium pasteurianum* vereint eine Reihe positiver Eigenschaften: Neben seiner Fähigkeit, Stickstoff zu fixieren, kann *C. pasteurianum* potentiell für die Nutzung von C1-Substraten wie Kohlendioxid oder Kohlenmonoxid genutzt werden. Darüber hinaus produziert *C. pasteurianum* natürlicherweise Butanol und ist in der Lage, dazu günstige Substrate zu nutzen. Die industrielle Nutzung dieses Mikroorganismus wird durch den Mangel an effizienten Werkzeugen zur Genomeditierung für das *metabolic engineering* des Stammes behindert. Das Ziel dieser Arbeit ist es, Methoden und Werkzeuge zu etablieren, welche die effiziente Manipulation dieses Mikroorganismus ermöglichen und auf diese Weise dessen industrielles Potential zu steigern. Primär ist dazu eine Optimierung der Transformationseffizienz notwendig. Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen robuste Methoden für die Überexpression sowie Deletion von Genen zu implementieren. Mit diesen Werkzeugen an der Hand kann das Produktspektrum von *C. pasteurianum* auf gewünschte Weise verändert werden. Durch *metabolic engineering* soll die Produktion in einer Weise beeinflusst werden, sodass Butanol selektiv vermehrt gebildet wird. Die Nutzung des Abfallstoffes Glycerol - als Mono- oder in Kombination mit Glukose als Cosubstrat - sowie die selektiv gesteigerte Bildung industriell wertvoller Endprodukte resultiert in einem kostengünstigen, nachhaltigen Prozess, der das Potential von *C. pasteurianum* als industriellem Mikroorganismus voll ausschöpft um zukünftig zu Erdöl-basierten Produktionsprozessen in Konkurrenz zu treten.

1.2 Theoretische und technische Grundlagen

1.2.1 Mikrobielle Fermentation von Glycerol

Durch die fortschreitende Expansion der Biodieselindustrie ist der Marktpreis für Glycerol gesunken [90, 33, 82] (Abb. 1). Glycerol stellt daher ein attraktives, kostengünstiges Substrat für die mikrobielle Fermentation dar. Glycerol kann von verschiedenen aeroben und anaeroben Bakterien genutzt werden, beispielsweise *Citrobacter freundii* und *Klebsiella pneumoniae* sowie *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* und *Anaerobiospirillum* [136]. Auch für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Glycerol unter bestimmten Bedingungen als Substrat genutzt werden kann [136].

Die Verwendung von Glycerol als Kohlenstoffquelle ist im Vergleich zu der Nutzung anderer Substrate wie Glukose von Vorteil: Der Grad an Reduktion von Glycerol beträgt $k = 4,67$, wobei k den Reduktionsgrad pro Kohlenstoffatom darstellt, ein Maß für die Anzahl zur Verfügung stehender Elektronen pro Kohlenstoffeinheit [81]. Er liegt höher als der Reduktionsgrad von Glukose ($k = 4$) und auch als der von Biomasse ($k = 4,3$). Dies führt im Verlauf der Fermentation zu einer Akkumulation von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH. Um die Redoxbilanz in der Zelle stabil zu halten, wird der Überschuss an Reduktionsäquivalenten durch eine bevorzugte Bildung von reduzierten Produkten ausgeglichen, welche industriell besonders wertvoll sind. Zu den Produkten, die einen höheren Reduktionsgrad als Glycerol aufweisen, zählen 1,3-PDO und 1,2-PDO (jeweils $k = 5,33$), Propanol, Ethanol und Butanol (jeweils $k = 6$) [17]. Durch die Fermentation von Glycerol können deutlich höhere theoretische Erträge erzielt werden als bei der Verwendung anderer Kohlenstoffquellen.

In dieser Arbeit steht die Fermentation von Glycerol mit dem Stamm *Clostridium pasteurianum* im Mittelpunkt.

1.2.2 Biotechnologische Nutzung von Clostridien

Clostridien sind gram-positive Bakterien, welche zu dem Phylum der Firmicutes gehören (Familie: *Clostridiaceae*). Ihr Name bezieht sich auf ihre stäbchenförmige Morphologie (aus dem Griechischen: $\kappa\lambda\omega\sigma\tau\eta\rho$ = Spindel) (Abb. 2). Sie sind obligat anaerobe Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Endosporen zu bilden. Ihr natürlicher Lebensraum

ist der Erdboden sowie der Magen-Darmtrakt von Menschen und Tieren.

Unter den ca. 200 Clostridium-Spezies sind sowohl pathogene Stämme als auch Stämme von therapeutischem und industriellem Nutzen. *C. acetobutylicum* ist der am Besten untersuchte Stamm für die bioindustrielle Produktion von Chemikalien. Er wird seit Beginn des 20. Jahrhunderts verwendet. Die Haupt-Fermentationsprodukte sind Aceton, Butanol und Ethanol, welche im sogenannten ABE-Prozess generiert werden [128]. Als Nebenprodukte werden organische Säuren (v. a. Acetat und Butyrat), Wasserstoff sowie Kohlendioxid produziert. Neben dem Modellorganismus *C. acetobutylicum* werden weitere Stämme für die bioindustrielle Produktion erforscht, darunter *C. beijerinckii*, *C. ljungdahlii* und *C. pasteurianum*.

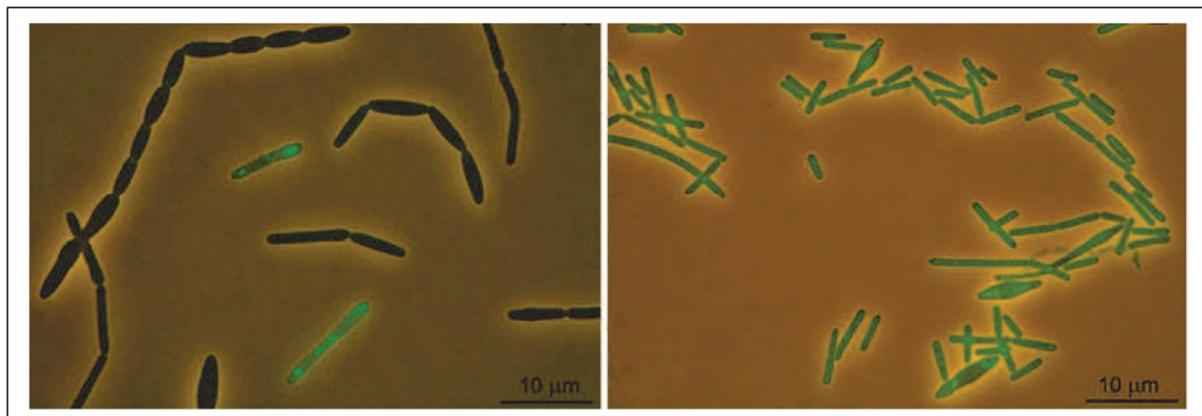


Abb. 2: Mikroskopische Darstellung lebender (links) und fixierter (rechts) *C. pasteurianum*-Zellen [89].

1.2.3 *Clostridium pasteurianum*

Clostridium pasteurianum (*C. pasteurianum*) wurde 1895 von Sergei Winogradsky als erstes diazotrophes Bakterium in Reinkultur isoliert [130]. Der Name *C. pasteurianum* wurde zu Ehren von Louis Pasteur vergeben, welcher erstmals 1861 die Produktion von Butanol durch mikrobielle Fermentation erwähnt hatte [55].

C. pasteurianum unterscheidet sich von den zuvor genannten Clostridienstämmen in seinem Produktspektrum sowie in der Substratnutzung. Im Gegensatz zu dem Prototyp-Stamm *C. acetobutylicum* besitzt *C. pasteurianum* die Fähigkeit, rohes Glycerol als einzige Kohlenstoffquelle für die Fermentation zu verwenden. Die Nutzung von Glycerol durch *C. pasteurianum* zur Produktion von Lösungsmitteln wurde erstmals 1983 von Nakas et al. beschrieben [80]. Der Pathway zur Metabolisierung von Glycerol in *C. pasteurianum*

wurde von Dabrock et al. 1992 gefunden [19]. *C. pasteurianum* besitzt im Vergleich zu anderen Stämmen, welche Glycerol metabolisieren können, wie beispielsweise *C. butyricum*, ein besonders attraktives Produktspektrum: Die Hauptprodukte einer Glycerolfermentation von *C. pasteurianum* sind n-Butanol und 1,3-PDO [80, 46, 8]. Beide Produkte sind von hohem industriellen Interesse:

1,3-PDO wird als Monomer für die Synthese verschiedener Polymere wie Polypropylenterephthalat (PPT) und Polytrimethylenterephthalate (PTT) verwendet; diese werden beispielsweise zu speziellen Textilfasern, Vliesstoffen oder Teppichen weiterverarbeitet [68]. Polybutylenterephthalat (PBT) wird hauptsächlich in der Automobil- und Elektronikindustrie verwendet [5]. Darüber hinaus wird 1,3-PDO als Kettenverlängerer für die Synthese von Polyurethanen, Schmierstoffen, Lösungsmitteln und als Vorläufer in der chemischen und pharmazeutischen Industrie genutzt [21, 132]. Kunststoffen, welche 1,3-PDO enthalten, wird eine höhere Biodegradierbarkeit zugesprochen als herkömmlichen Polymeren [22, 132].

Butanol stellt - neben Ethanol - einen alternativen Kraftstoff dar und zeichnet sich im Vergleich zu Ethanol durch einen höheren Energiegehalt sowie eine geringere Hygroskopizität aus [28]. Butanol kann außerdem industriell zu Acrylaten, Ethern und Butylacetat umgewandelt werden, welche zu Farben, Lacken und Harzen weiterverarbeitet werden [41].

Für die Energiegewinnung sowie die Redoxbilanz der Zelle ist die Generierung von Nebenprodukten unumgänglich. Die Nebenprodukte in *C. pasteurianum*-Fermentationen sind hauptsächlich Acetat, Butyrat, Wasserstoff und Kohlendioxid. Der 1,3-PDO-Produktion wird ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Redox-Regulation bei Glycerolfermentationen zugesprochen [8, 97].

Fermentationsprozesse mit *C. pasteurianum* wurden in zahlreichen Studien untersucht und hinsichtlich der 1,3-PDO- und Butanolproduktion optimiert. Der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsprozesse sowie der verwendeten Kohlenstoffquelle, des pH-Wertes und der Eisenkonzentration wurden analysiert [105, 8, 32]. Es wurde gezeigt, dass die Verwendung von Glycerol als Substrat im Vergleich zu Glukose das Verhältnis von 1,3-PDO zu Butanol verschiebt [19, 104]. Die Eisenkonzentration und der pH-Wert haben ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Produktspektrum: Während Eisenlimitierung die 1,3-PDO-Produktion fördert, steigert ein niedriger pH-Wert die Bildung von Butanol [105, 54, 38]. Auch die Gaszusammensetzung während der Kultivierung hat einen Einfluss;

so wurde beispielsweise gezeigt, dass Stickstoffbegasung zu einer gesteigerten 1,3-PDO-Produktion führt [32]. Die Verwendung von Rohglycerol aus der Biodieselproduktion, welches durch Methanol, anorganische Salze, Fettsäuren, Wasser und weitere Beimengungen verunreinigt ist, wurde im Vergleich zu reinem Glycerol als Substrat analysiert [13, 122, 115, 49]. Es wurde gezeigt, dass die Verunreinigung durch Fettsäuren negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Produktivität haben, wohingegen die anderen Komponenten keine oder geringe Beeinträchtigungen für die Fermentation bewirken [122]. Wenige Studien befassten sich mit der Nutzung von Cosubstrat, d. h. der Kombination von Glycerol mit einer weiteren Kohlenstoffquelle. Für *C. beijerinckii* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Butyrat die Lösungsmittelproduktion erhöht [14, 61]. Ein vergleichbarer Effekt konnte für *C. pasteurianum* nicht eindeutig gezeigt werden [31, 103]. Hingegen konnte für *C. pasteurianum* gezeigt werden, dass die Verwendung von Glycerol/Glukose-Cosubstrat positive Effekte auf die Produktbildung hat [103, 104].

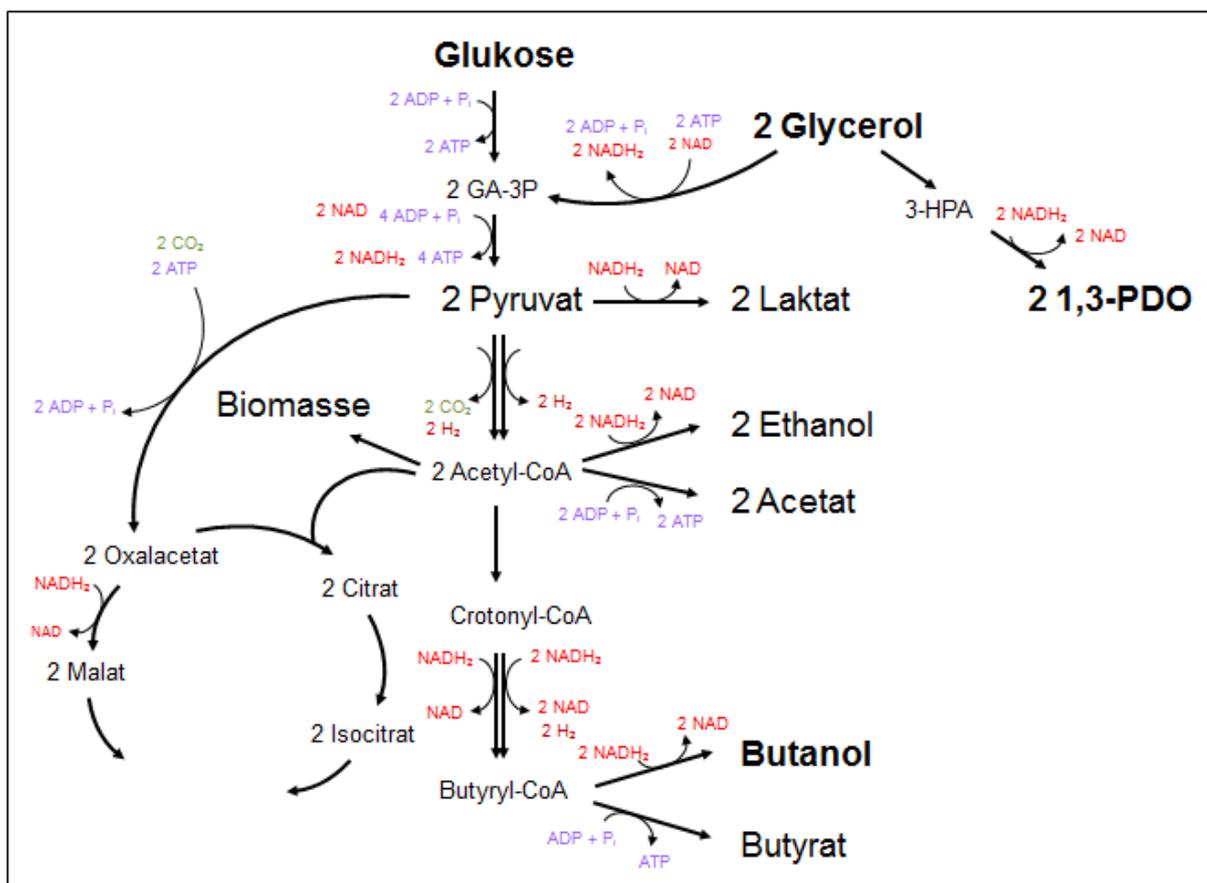


Abb. 3: Stoffwechselwege der Fermentation von Glycerol und Glukose in *C. pasteurianum*. 3-HPA = 3-Hydroxy-Propionaldehyd; GA-3P = Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

1.2.4 Cosubstrat-Fermentation und die Rolle der Pyruvatcarboxylase in *C. pasteurianum*

In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass eine Cosubstrat-Fermentation von Glycerol mit Glukose die Butanolproduktion von *C. pasteurianum* signifikant erhöht [103, 104]. Während die Fermentation von Glukose eine gesteigerte Biomasse- und Säureproduktion zur Folge hat, verschiebt die Verwendung von Glycerol das Produktspektrum so, dass Butanol und 1,3-PDO als Haupt-Produkte gebildet werden. Die Cosubstrat-Fermentation hat die Intention, die Vorteile beider Substrate optimal zu nutzen. Dabei ist die Wahl der Glukosekonzentration für das Ergebnis der Fermentation von großer Bedeutung. Der höchste Butanol-Titer von 21 g/l wurde bei Verwendung von Glycerol und Glukose in einem Verhältnis von 1:1 erreicht [103]. Bei der Verwendung geringerer Glukosekonzentrationen (10 g/l) wurde ein interessantes Phänomen beobachtet: Nach Verbrauch der Glukose stoppten die Zellen ihr Wachstum, obwohl Glycerol im Überschuss vorhanden war [104]. Eine Proteomanalyse vor und nach Glukoselimitierung zeigte, dass bestimmte Proteine in den verschiedenen Phasen der Fermentation differenziell exprimiert waren. Eine deutliche Herunterregulierung nach Glukoselimitierung war für die Enzyme Pyruvatcarboxylase und Biotinsynthese zu beobachten.

Das Enzym Pyruvatcarboxylase (PC) katalysiert die ATP- und Biotin-abhängige Bildung von Oxalacetat aus Pyruvat. Es wurde erstmals von Utter und Keech beschrieben [120]. Die Pyruvatcarboxylase ist ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 120 – 130 kDa, dessen Untereinheiten tetraederförmig angeordnet sind [124]. Jede Untereinheit enthält drei funktionelle Domänen: die Biotin-Carboxylierungsdomäne, die Transcarboxylierungsdomäne und die Biotin-Carboxyl-Carrierdomäne [53].

Mit Pyruvat als Substrat nimmt die Pyruvatcarboxylase eine zentrale Stellung im Kohlenstoffmetabolismus ein: In Anaerobiern kann Pyruvat über verschiedene Wege metabolisiert werden. Pyruvat kann einerseits zu CO₂ und Acetyl-CoA umgesetzt werden. Dieser Decarboxylierungsschritt hat zur Folge, dass alle Produkte unterhalb von Acetyl-CoA auf eine Ausbeute von maximal 66,6% limitiert sind [66]. Neben dem dissimilatorischen Acetyl-CoA-Weg kann Pyruvat anaplerotisch zu Oxalacetat umgesetzt werden. Im Gegensatz zum vorher genannten Weg wird hier CO₂ fixiert. Die Konversion von Pyruvat zu Acetyl-CoA oder Oxalacetat stellt die Verbindung von Glykolyse und Citratzyklus dar und repräsentiert somit eine wichtige Stellschraube für den Kohlenstofffluss der Zelle. An

dieser Stelle kann der Fluss flexibel in Richtung Katabolismus, Anabolismus oder Energiegewinnung gelenkt werden [106].

1.2.5 Die Rolle der Glyceroldehydratase im Glycerolstoffwechsel von *C. pasteurianum*

Glycerol wird während der anaeroben Fermentation im Rahmen einer Disproportionierung auf zwei Wegen verstoffwechselt: Im reduktiven Weg wird Glycerol von dem Enzym Glyceroldehydratase zu 3-Hydroxy-Propionaldehyd (3-HPA) umgesetzt, welches von der 1,3-PDO-Dehydrogenase weiter zu 1,3-PDO reduziert wird. Gleichzeitig wird ein Teil des Glycerols über den oxidativen Weg, katalysiert durch die Glyceroldehydrogenase und die Dihydroxyacetonkinase, zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt, welches der Glykolyse zugeführt wird. In Mikroorganismen, welche die Fähigkeit besitzen, auf Glycerol als einzige Kohlenstoffquelle anaerob zu wachsen, sind die genannten Enzyme des oxidativen und reduktiven Weges in der Regel aktiv [20].

Neben den beschriebenen anaeroben Stoffwechselwegen kann Glycerol von einigen Mikroorganismen, beispielsweise *S. cerevisia*, *K. pneumoniae* oder *G. oxydans*, aerob metabolisiert werden [127, 102, 26, 10, 15]. In diesem Fall wird das Glycerol einerseits von der Glyceroldehydrogenase zu Dihydroxyaceton, andererseits von der Glycerolkinase zu Glycerol-3-Phosphat umgesetzt. Die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert die weitere Umsetzung von Glycerol-3-Phosphat in Dihydroxyaceton-Phosphat. Über diesen Weg werden die Abbauprodukte des Glycerols ebenfalls der Glykolyse zugeführt [127, 18]. Der 1,3-PDO-Produktionsweg spielt bei *C. pasteurianum* eine Schlüsselrolle für die Glycerolfermentation, da der Überschuss an Reduktionsäquivalenten über diesen Weg auf einfache Weise abgebaut werden kann. Nur zwei Reaktionen sind notwendig, um Glycerol zu 1,3-PDO umzusetzen (Abb. 3). Dabei wird im zweiten Schritt, katalysiert durch die 1,3-PDO-Dehydrogenase, NADH_2 verbraucht. Der erste Schritt, katalysiert durch die Glyceroldehydratase, ist der limitierende Schritt im 1,3-PDO-Reaktionsweg; eine Akkumulation von 3-HPA wäre toxisch für die Zelle.

Die Glyceroldehydratase katalysiert eine Coenzym B12-abhängige Radikalreaktion; sie gehört zur Klasse II der Coenzym B12-abhängigen Enzyme [20]. Sie kann Glycerol, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu 3-HPA, Propionaldehyd und Acetaldehyd umsetzen;

dabei ist Glycerol das präferierte Substrat [72].

Die Glyceroldehydratase von *C. pasteurianum* wird von dem *dhaBCE*-Operon codiert (Abb. 4). Sie besteht aus einer großen (α -), einer mittleren (β -) und einer kleinen (γ -) Untereinheit, welche im Verhältnis $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ angeordnet sind. Dabei codiert das Gen *dhaB* für die α -, *dhaC* für die β - und *dhaE* für die γ -Untereinheit [116]. Weitere Gene des Glycerolstoffwechsels von *C. pasteurianum* befinden sich in unmittelbarer Nähe des *dhaBCE*-Operons [72, 109]. So befindet sich das Gen *ddrA* unmittelbar *downstream* vom *dhaBCE*-Operon, welches für das Enzym *diol dehydratase reactivating factor* codiert. *DdrA* ist verantwortlich für das Recycling des Glyceroldehydratase-Cofaktors B12.

Außer bei *C. pasteurianum* wurde das Enzym Glyceroldehydratase bei *C. butyricum*, *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus buchneri* nachgewiesen [71, 109, 27, 3, 2, 112, 107, 46]. Lactobacilli sind allerdings nicht fähig auf Glycerol zu wachsen, da ihnen der oxidative Abbauweg fehlt.

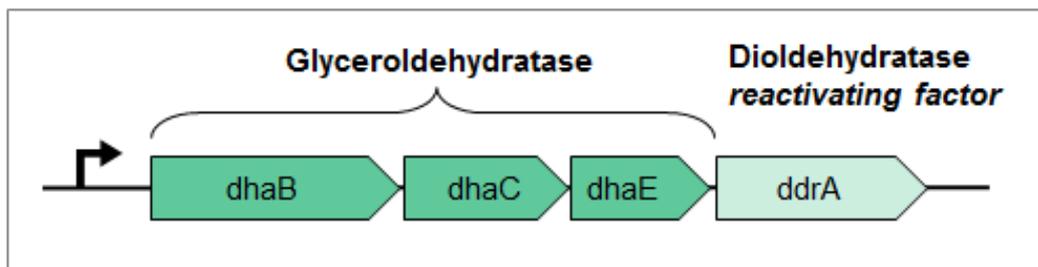


Abb. 4: Glyceroldehydratase-Operon von *C. pasteurianum*.

1.2.6 *Metabolic engineering* von Clostridien zur Biobutanolproduktion

Mikroorganismen können genetisch modifiziert werden um gewünschte Eigenschaften zu optimieren oder neu zu erschaffen. *Metabolic engineering* ist eine interdisziplinäre Methode, welche in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurde. Sie ist definiert als die zielgerichtete Verbesserung von Produktbildung oder zellulären Eigenschaften durch Modifikation spezifischer biochemischer Reaktionen oder Einführung neuer Reaktionswege, basierend auf der rekombinanten DNA-Technologie [113]. Die Anwendungen dieser Methode sind vielfältig. Mikroorganismen können genetisch verändert werden, um neue Produkte oder native Produkte mit höherer Effizienz zu bilden. Weiterhin kann das Substratspektrum erweitert oder das Wachstumsverhalten der Zellen optimiert werden. Nach sorgfältiger Aus-

wahl des Zielgens oder Reaktionsweges sowie des Wirtsorganismus werden die gewünschten Veränderungen durch DNA-Manipulation herbeigeführt. Gendeletion sowie homologe und heterologe (Über-)expression von Genen sind die am meisten verwendeten Methoden. Darüber hinaus sind *antisense-RNA knockdown* sowie Promotoraustausch weitere Methoden, um das Expressionslevel eines Gens zu regulieren. Eine Grundvoraussetzung für alle DNA-Manipulationsmethoden stellt die effiziente Transformation von Fremd-DNA dar. *Metabolic engineering* wurde bereits bei verschiedenen Clostridienstämmen angewendet. Diese wurden genetisch optimiert mit dem Ziel erhöhter Erträge oder Toleranz gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln [131, 135, 29] oder hinsichtlich der Nutzung nachhaltiger Substrate wie Zellulose oder Kohlendioxid [58, 30]. Für die Optimierung der Biobutanolproduktion mittels *metabolic engineering* wurden hauptsächlich Studien mit den Wirtsorganismen *C. acetobutylicum* sowie *C. beijerinckii* durchgeführt. Durch *random mutagenesis* sowie *antisense-RNA-Knockdown* des Gens *gldA*, welches für das Enzym Glyceroldehydrogenase codiert, konnte die Toleranz gegenüber Lösungsmitteln bei *C. beijerinckii* erhöht werden [98, 70]. Die Amplifikation des Aceton-Produktionsweges führte zu gesteigerten Ausbeuten von Aceton, Butanol und Ethanol in *C. acetobutylicum* [76]. Während die Überexpression der Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase (*adhE*) zu keiner gesteigerten Butanolproduktion führte, konnte dies durch Deletion des *solR*-Gens, eines transkriptionellen Repressors des *sol*-Lokus, erreicht werden [79, 40]. Des Weiteren konnte die Butanolproduktion von *C. acetobutylicum* durch Inaktivierung der Butyrylkinase (*buk*) gesteigert werden [37, 23].

1.2.7 *Metabolic engineering von Clostridium pasteurianum*

1.2.7.1 Transformation von *C. pasteurianum*

Bisher liegen nur wenige Studien vor, bei denen *metabolic engineering* für *C. pasteurianum* angewendet wurde. Ein großes Hindernis für die genetische Manipulation von *C. pasteurianum* stellt die geringe Transformationseffizienz dieses Stammes dar [100, 94]. Als gram-positives Bakterium besitzt *C. pasteurianum* eine robuste Zellwand mit zahlreichen Schichten verzweigter Peptidoglycanmoleküle, welche für DNA-Moleküle schwer passierbar ist [110]. Zudem sind in *C. pasteurianum* verschiedene endogene Restriktionsendonukleasen aktiv, die Fremd-DNA erkennen und degradieren [95]. Bakterielle Restriktionsmodifikationssysteme (RM-Systeme) bestehen jeweils aus einem Paar von Enzymen: einer

Endonuklease und einer DNA-Methyltransferase. Die Methylierung der DNA durch die Methyltransferase an ihrer spezifischen Erkennungssequenz verhindert die Degradierung endogener DNA durch die jeweilige Endonuklease. Unmethylierte Fremd-DNA dagegen wird degradiert. Während Typ II-RM-Systeme aus einzelnen Enzymen (Endonuklease + Methyltransferase) bestehen, handelt es sich beim Typ I-System um einen Enzymkomplex. Bisher sind drei Restriktionsendonukleasen von *C. pasteurianum* beschrieben: CpaI und CpaAI, welche zu den Typ II-Endonukleasen gehören, sowie die Typ I-Endonuklease CpaAII. In Tabelle 1 sind die Erkennungssequenzen der Enzyme aufgeführt. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere, bisher unbekannte Endonukleasen in *C. pasteurianum* aktiv sind.

Aufgrund des Mangels an zielgerichteten Transformationsmethoden wurden in der Vergangenheit Techniken zur chemischen Mutagenese mit anschließender Selektion von gewünschten Phänotypen bei *C. pasteurianum* angewendet [74, 50]. Bei anderen Clostridienstämmen wurden hauptsächlich zwei Methoden für den DNA-Transfer verwendet: die Konjugation und die Elektrottransformation [4, 87, 36, 48, 117]. In den meisten Fällen hat sich die Elektroporation als die effizientere Methode erwiesen. Bei einigen Stämmen, bei denen ein DNA-Transfer per Elektroporation nicht möglich war, stellte die Konjugation eine Alternative dar. Der DNA-Transfer in *C. pasteurianum* mittels Konjugation wurde 1988 von Richards et al. berichtet [100], jedoch wurden in dieser Studie weder Ergebnisse präsentiert noch Angaben zu dem verwendeten Konjugationsprotokoll gemacht. Kürzlich wurde ein Elektroporationsprotokoll entwickelt, welches eine Transformation von *C. pasteurianum* ermöglichte [94]. Daraufhin wurde die heterologe Expression, Transkriptionsregulation sowie Deletion von Genen in *C. pasteurianum* erfolgreich demonstriert [95, 96, 97, 12], wobei die geringe Effizienz der DNA-Manipulation weiterhin eine Limitierung für das *metabolic engineering* dieses Mikroorganismus darstellt.

Tabelle 1: Restriktionsendonukleasen von *C. pasteurianum*

Enzym	Typ	Erkennungssequenz	Methylierungsmuster	Referenz
CpaI	II	GATC	Dam-Methylierung (m6A)	[101]
CpaAI	II	CGCG	FnuDII-Methylierung (m5C)	[100]
CpaAII	I	AAGNNNNCTCC	nicht bekannt	[95]

Die Konjugation stellt eine clevere Methode des DNA-Transfers bei Clostridien dar, da sie das Hindernis umgeht, das die gram-positive Zellwand darstellt. Sie beruht auf dem Austausch von DNA zwischen einem Donor- und einem Rezipientenstamm durch direkten Zell-Zell-Kontakt (Abb. 5). Der Donorstamm besitzt Transferegene, welche ihm die Ausbildung einer Zytoplasmabrücke ermöglichen, über welche die zu transferierende DNA auf die Rezipientenzelle übertragen werden kann.

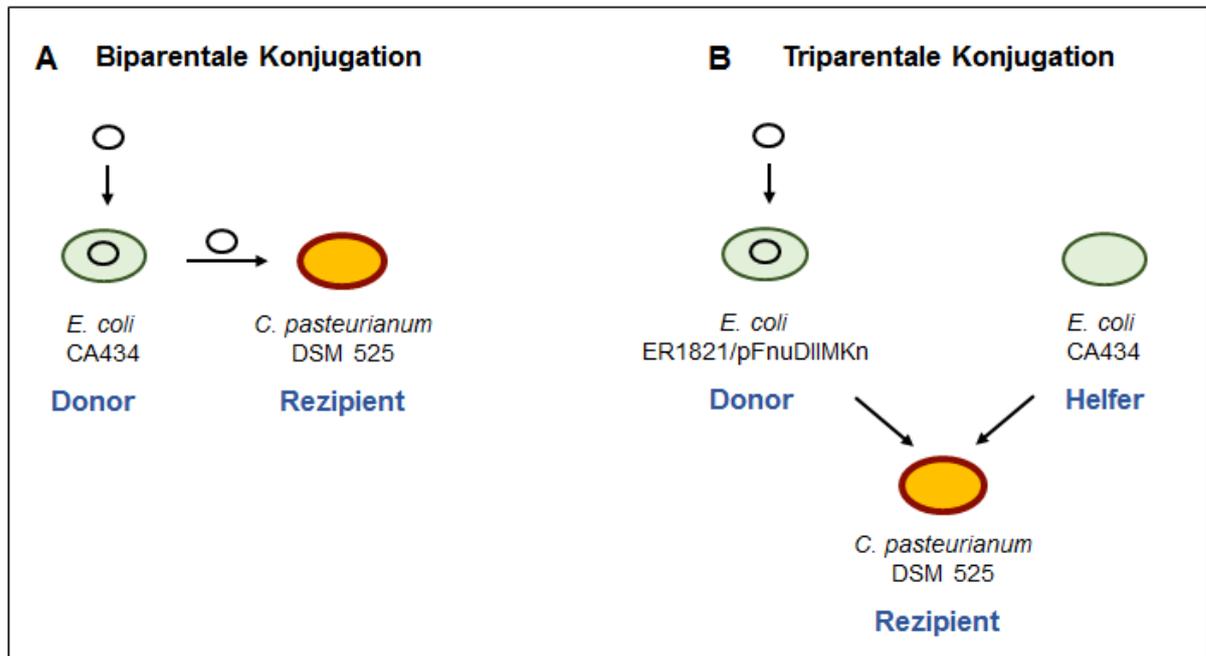


Abb. 5: Schematische Darstellung der biparentalen und triparentalen Konjugation zur Transformation von *C. pasteurianum*. A: Biparentale Konjugation. Der Donorstamm *E. coli* CA434 besitzt Transferegene sowie das zu transferierende Plasmid und ermöglicht somit den direkten konjugativen Plasmid-Transfer. B: Triparentale Konjugation. Als Donor dient der *E. coli*-Stamm ER1821/pFnuDIIMKn. Da dieser keine Transferegene besitzt, wird zusätzlich *E. coli* CA434 als Helferstamm benötigt.

Bei der Elektroporation wird die Bakterienzellwand durch ein kurzzeitig angelegtes elektrisches Feld permeabilisiert, sodass die DNA in die Zelle gelangen kann. Für *C. pasteurianum* wurde kürzlich von Pyne et al. ein Elektroporationsprotokoll entwickelt [94]. Im Vergleich zu anderen Protokollen enthält dieses Protokoll einige Ergänzungen, die eine hohe Transformationseffizienz bei *C. pasteurianum* ermöglichen sollen: Sporulierte, hitzeschockaktivierte Zellen werden für die Herstellung der kompetenten Zellen verwendet. Den Zellen werden zellwandauflösende und zellmembranauflösende Agenzien - Glycin bzw. Ethanol – zugegeben, in Kombination mit Saccharose zur osmotischen Stabilisierung, um die DNA-Aufnahme zu ermöglichen. Darüber hinaus sind Elektroporationsparameter, transformierte DNA-Menge sowie Kultivierungszeiten in diesem Protokoll für *C. pasteu-*

rianium optimiert (Abb. 6).

Das Protokoll von [94] beinhaltet die *in vivo*-Methylierung des *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttleplasmids zum Schutz vor dem Verdau durch Restriktionsendonukleasen. Dazu wird das Shuttleplasmid zunächst in den *E. coli*-Stamm ER1821/pFnuDIIMKn eingebracht. Die aus diesem Stamm extrahierte Plasmid-DNA wird für die Elektrottransformation von *C. pasteurianum* verwendet.

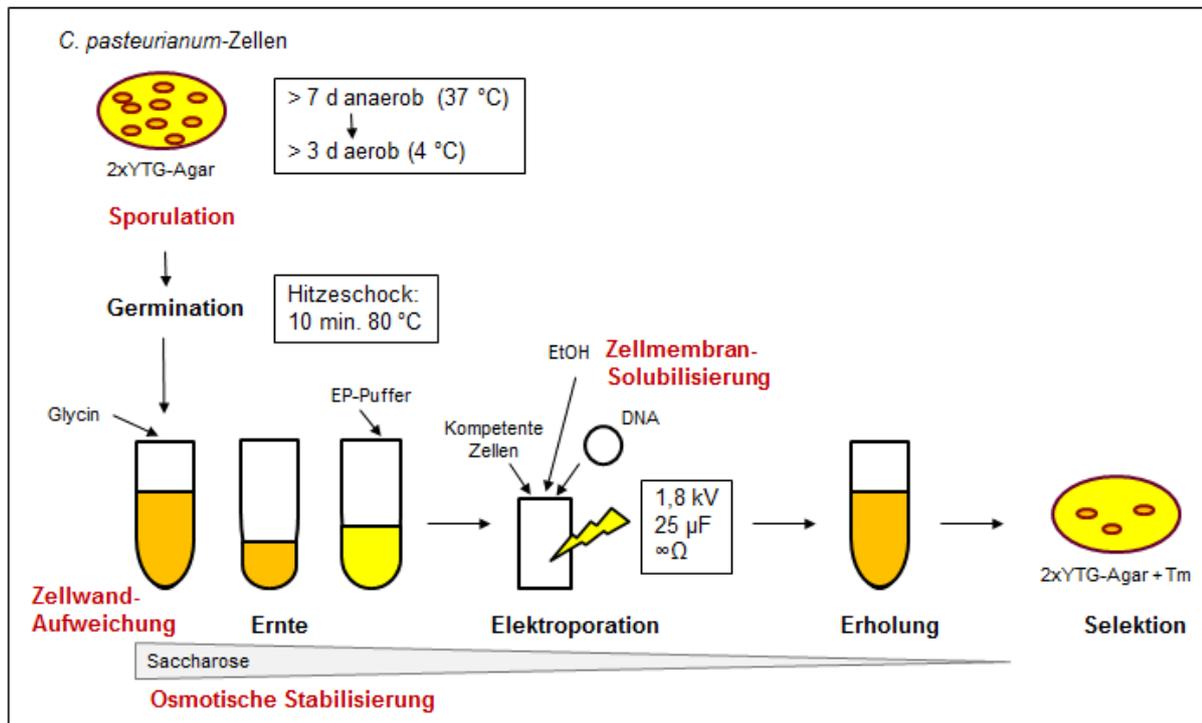


Abb. 6: Elektroporationsprotokoll für die Transformation von *C. pasteurianum* (nach [94]). EP-Puffer = Elektroporationspuffer; EtOH = Ethanol; Tm = Thiamphenicol.

1.2.7.2 ClosTron-Mutagenese

Eine speziell für Clostridien entwickelte Methode zur Deletion von Genen ist die ClosTron-Methode [44]. Diese basiert auf einem mobilen Gruppe II-Intron, welches mit Hilfe eines Shuttleplasmids in die Bakterien eingebracht wird [56]. Gruppe II-Introns sind katalytische RNAs, die sich selbst aus RNA-Transkripten herauspleißen und in neue DNA-Targetsequenzen integrieren. In der Intronsequenz ist das Intron-codierte Protein (IEP = *intron-encoded protein*) LtrA enthalten, welches das Spleißen sowie die Targetsequenz-Erkennung und Integration des Introns unterstützt. Darüber hinaus besitzt LtrA eine Reverse-Transkriptase-Aktivität; nach Integration des RNA-Introns in die DNA synthetisiert LtrA den komplementären DNA-Strang. Die RNA-Sequenz wird anschließend von

zelleigenen Enzymen abgebaut und durch DNA ersetzt (Abb. 7). Die Erkennungssequenz des Gruppe II-Introns kann durch Austausch bestimmter Nukleotide verändert werden. Dies ermöglicht einen gezielten Einsatz dieses Mechanismus' für die Deletion von Genen. Ein Erythromycin-Selektionsmarker ($ermRAM = erythromycin\ retrotransposition-activated\ marker$), der im Shuttleplasmid in *antisense*-Orientierung vorhanden und durch ein Gruppe I-Intron inaktiviert ist, wird durch das Spleißen und die chromosomale Integration aktiviert, sodass Mutanten durch ihre erworbene Erythromycin-Resistenz selektierbar sind.

Die ClosTron-Methode wurde erfolgreich bei verschiedenen Clostridienstämmen angewendet [25, 16, 140, 62, 69, 67], in zwei Fällen auch bei *C. pasteurianum* [95, 97].

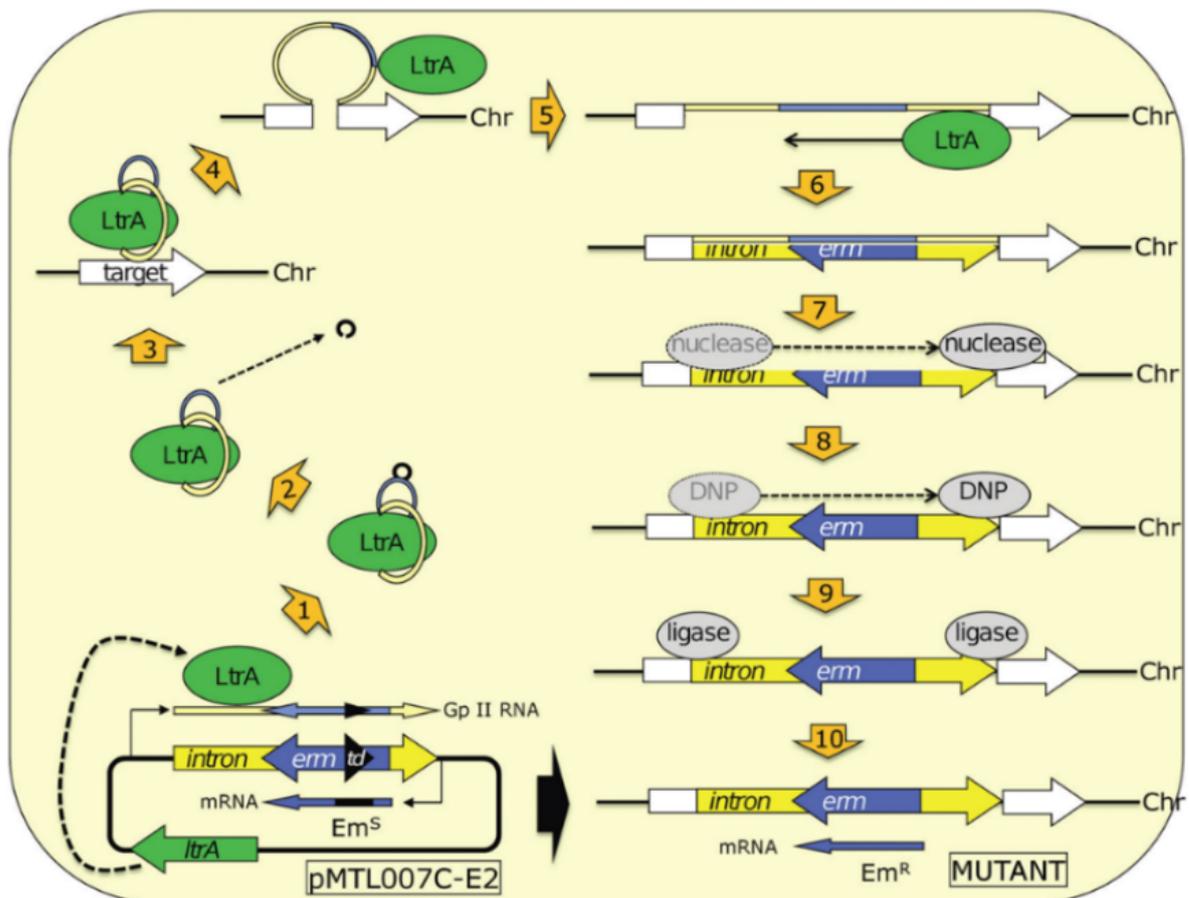


Abb. 7: Schematische Darstellung der ClosTron-Mutagenese [59]. Erläuterungen siehe Text. pMTL007C-E2 = ClosTron-Plasmid; LtrA = Intron-codiertes Protein; td = Gruppe I-Intron zur Inaktivierung des Erythromycin-Resistenzgens (*erm*).

1.2.7.3 Genomeditierung mittels CRISPR-Cas

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas (*CRISPR-associated*) ist eine relativ neue, wertvolle Methode für Genom-Manipulationen einer großen Zahl an Organismen und Zelltypen [52]. CRISPR-Cas stellt ursprünglich einen Teil des bakteriellen adaptiven Immunsystems dar und somit einen Verteidigungsmechanismus gegen fremde Nukleinsäuren wie Bakteriophagen und andere mobile genetische Elemente.

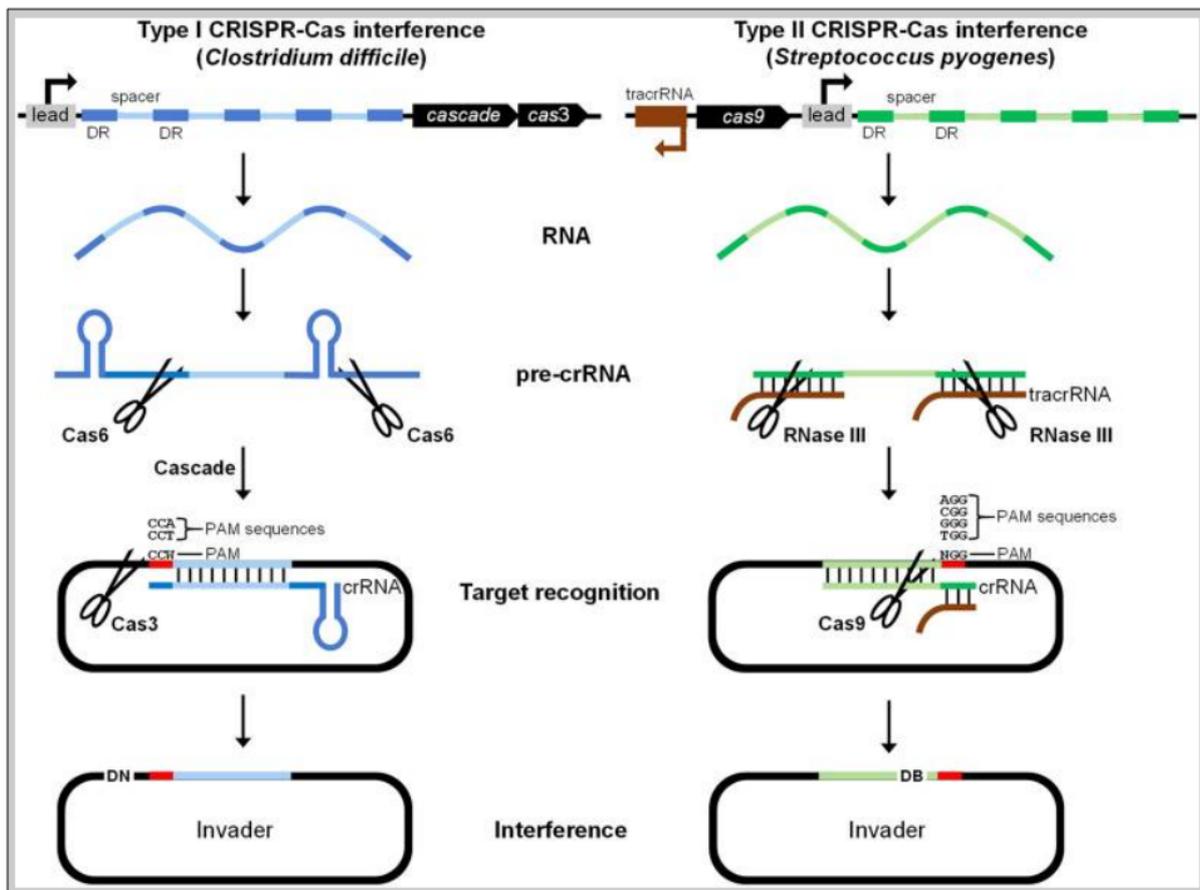


Abb. 8: Typ I- und Typ II-CRISPR-Cas-Interferenzmechanismen [93]. Erläuterungen siehe Text. DR = *direct repeats*, PAM = *protospacer-adjacent motif*, DN = *DNA-nick*, DB = *DNA-Doppelstrangbruch*.

CRISPR-Immunität wird in drei Schritten erreicht, welche als Adaption, CRISPR-RNA (crRNA)-Biogenese und Interferenz bezeichnet werden. Im ersten Schritt wird die eindringende DNA als fremd erkannt und, flankiert von *repeat*-Sequenzen, in den CRISPR-Lokus als neuer sogenannter Spacer integriert. Das Stadium der crRNA-Biogenese ist charakterisiert durch die Transkription des CRISPR-Lokus und die Reifung der crRNA. Im Interferenz-Stadium bindet die reife crRNA an Cas-Proteine, welche zusammen den Effektor-Komplex bilden. Dieser identifiziert und degradiert eindringende, fremde DNA.

Eine kurze Sequenz von drei Basen unmittelbar hinter der DNA-Zielsequenz, genannt *protospacer-adjacent motif* (PAM), ermöglicht der Zelle zwischen Selbst und Nicht-Selbst zu unterscheiden [137].

Abhängig von den beteiligten Molekülen werden CRISPR-Cas-Systeme in sechs Typen klassifiziert [133]. In Abb. 8 sind die Typ I- und Typ II-CRISPR-Interferenzmechanismen dargestellt. Am Häufigsten wird für das Genom-*engineering* das Typ II-System von *Streptococcus pyogenes* angewendet. Das zentrale Molekül stellt in diesem System die RNA-abhängige DNA-Nuklease Cas9 dar. Cas9 besitzt zwei Nuklease-Domänen, RuvC und HNH, welche einen DNA-Doppelstrangbruch in der spezifischen Zielsequenz erzeugen. Die Zielsequenz wird durch die gebundene Guide-RNA (gRNA) definiert. Die gRNA ist ein duales RNA-Molekül, bestehend aus der crRNA für die Zielsequenz-Erkennung und der transaktivierenden crRNA (tracrRNA), welche eine spezifische Sekundärstruktur ausbildet, die die Bindung von Cas9 ermöglicht. Die Prozessierung erfolgt mit Hilfe des Enzyms RNase III. Der DNA-Doppelstrangbruch erfolgt an Position 3-4 *upstream* von der PAM-Sequenz.

Das Typ I-System ist durch das Enzym Cas3 gekennzeichnet [73, 111]. Zusätzlich wird bei diesem System eine Kaskade, im Falle von *C. pasteurianum* oder *C. difficile* bestehend aus Cas6, Cas8b, Cas7 und Cas5, für die Interferenz benötigt. Mit 6 Subtypen (A-F) stellt das Typ I-System das System mit der größten Diversität dar, das in der Natur vorkommt. Am häufigsten kommt der Subtyp IB vor. Die PAM-Sequenz ist beim Typ I-System *upstream* vom Protospacer lokalisiert. Ein weiterer Unterschied zum Typ II-System stellt die Aktivität der Nuklease Cas3 dar: Im Gegensatz zu Cas9 erzeugt Cas3 einen DNA-Einzelstrangbruch (*nick*) anstelle eines Doppelstrangbruches. Die Position des DNA-Einzelstrangbruches liegt außerhalb der Targetsequenz.

Im Gegensatz zu dessen Verwendung bei Eukaryonten fungiert das CRISPR-Cas-System bei Prokaryonten nicht selbst als Mutagenese-, sondern als Selektionsmethode: Durch die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ist das CRISPR-Cas-System lethal, sofern die zelleigene DNA das Target darstellt [24, 75]. Durch eine entsprechende Mutagenese-strategie kann diese Tatsache zur Selektion genutzt werden, indem nicht-mutierte Zellen aus der Population eliminiert werden und nur mutierte Zellen überleben. Das CRISPR-Cas-System wurde bereits bei einigen *Clostridium*-Stämmen angewendet [125, 126, 47], unter anderem auch bei *C. pasteurianum* [93, 12]. Bedingt durch den Wirkungsmechanismus des Systems bei Prokaryonten führt dessen Anwendung zu einer Reduzierung der Transforma-

tionseffizienz [123, 51, 75, 9]. Während die Cas9-Nuklease des *S. pyogenes*-Typ II-Systems sich als zu toxisch erwiesen hat um Transformanten in ausreichender Zahl zu generieren, führte die Nutzung des endogenen Typ IB- CRISPR-Cas-Immunsystems zu einer erfolgreichen Gendeletion in *C. pasteurianum* [93].

1.2.8 Analyse von *C. pasteurianum*-Fermentationen

Mit Hilfe der folgenden Formeln können *C. pasteurianum*-Fermentationen analysiert und charakterisiert werden:

Die Zelldichte wird turbidometrisch bei 600 nm bestimmt und mit der Biotrockenmasse nach [38] korreliert:

$$c_{Biomasse} = 0,336 \times OD_{600} \quad (1.1)$$

mit

$c_{Biomasse}$ = Biomassekonzentration (in g/l)

OD_{600} = Optische Dichte (600 nm)

Die Wachstumsrate μ wird durch folgende Formel berechnet:

$$\mu(t_1, t_2) = \frac{\ln c_2 - \ln c_1}{t_2 - t_1} \quad (1.2)$$

mit

t_1, t_2 = Zeitpunkt der Messung

c_1, c_2 = Zelldichte zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2

Aufgrund der Überlappung der Chromatographie-Peaks von Ethanol und Butyrat wird die Ethanolkonzentration mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$c_{Ethanol} = 1,1383 \times A_{Ethanol} \quad (1.3)$$

mit

$c_{Ethanol}$ = Ethanolkonzentration (in g/l)

$A_{Ethanol}$ = Fläche des Ethanolpeaks des Chromatogramms (in mV min)

Der Ertragskoeffizient wird berechnet nach [38]:

$$Y_{i/c} = \frac{i_2 - i_1}{c_2 - c_1} \quad (1.4)$$

mit

Y = Ertragskoeffizient (*yield coefficient*)

i_2, i_1 = Produktkonzentrationen

c_2, c_1 = Biomassekonzentrationen

Die Bilanzierung der Kohlenstoffverteilung und der Kohlenstoffflüsse von Substraten zu Produkten erfolgt nach [138]. Basierend auf den stöchiometrischen Formeln zur Metabolisierung von Glycerol und Glukose in *C. pasteurianum* ([104] und Tabelle 2) wird die Kohlenstoff-Wiederfindung wie folgt berechnet:

$$C_{recovery}(\%) = \frac{\sum C_{Produkte}}{\sum C_{Substrate}} \quad (1.5)$$

mit

$C_{recovery}$ = Kohlenstoff-Wiederfindung (in %)

$C_{Produkte}$ = Produktkonzentration (in mM)

$C_{Substrate}$ = Substratkonzentration (in mM)

Tabelle 2: Berechnung der Kohlenstoffverteilung von Fermentationssubstraten und -produkten. Molare Zusammensetzung der Biomasse von *C. pasteurianum* nach [8].

Komponente	Summenformel	Molmasse (g/mol)	Anzahl C-Atome (mol/mol)	produziertes CO ₂ (mol/mol)
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	92	3	0
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,2	6	0
1,3-PDO	C ₃ H ₈ O ₂	76,1	3	0
Butanol	C ₄ H ₁₀ O	74,12	4	2
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46,07	2	1
Butyrat	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	4	2
Acetat	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	2	1
Formiat	CH ₂ O ₂	46,03	1	0
Laktat	C ₃ H ₆ O ₃	90,08	3	0
Biomasse	C ₄ H ₇ O ₂ N	101,1	4	0

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die genetische Modifikation wurden die *C. pasteurianum*-Zellen anaerob in 2x YTG-Medium kultiviert. Für die Kultivierung wurden Anaerobflaschen verwendet, in denen der Sauerstoff durch Begasung mit Stickstoff entfernt worden war. Agarplatten wurden in Anaerobtöpfen kultiviert, in denen mit Hilfe von Anaerocult A (Merck Millipore) ein anaerobes Milieu erzeugt wurde. Alle Arbeiten wurden in einer Anaerobkammer (Coy laboratory products) durchgeführt. Die Bakterien wurden bei 35-37 °C kultiviert und bei -80 °C in 20% Glycerol gelagert. Für die Elektroporation wurden sporulierte Zellen verwendet, wie unter [94] beschrieben.

E. coli NEB10 β und ER1821 wurden aerob in LB-medium bei 37 °C kultiviert und bei -80 °C in Roti-Store Kryoröhrchen (Roth) aufbewahrt.

Transformierte *C. pasteurianum*-Klone, die ein Plasmid enthielten, wurden mit 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thiamphenicol selektiert. Für *E. coli*-Zellen, welche *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttlevektoren besaßen, wurden 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol verwendet. *E. coli*-Zellen, welche das Methylierungsplasmid pFnuDIIMKn besaßen, wurden mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin selektiert.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Name	Beschreibung	Quelle
<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	Wildtyp	DSMZ
<i>C. pasteurianum</i> R525	selektierter <i>C. pasteurianum</i> -Klon mit erhöhter Transformationseffizienz	diese Arbeit
<i>C. pasteurianum</i> PC	<i>C. pasteurianum</i> R525 mit erhöhter Pyruvatcarboxylaseaktivität (enthält Plasmid pMTL007-PC)	diese Arbeit
<i>C. pasteurianum</i> dhaBmut	<i>C. pasteurianum</i> R525 mit Deletion der Glyceroldehydratase (<i>dhaB</i>)	diese Arbeit
<i>C. pasteurianum</i> dhaBcompl	<i>C. pasteurianum</i> R525 mit Komplementation der Deletion der Glyceroldehydratase (<i>dhaB</i>)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> NEB10 β	Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)	New England Biolabs
<i>E. coli</i> ER1821	F - endA1 glnV44 thi-1 relA1? e14 - (mcrA-) rfbD1? spoT1? Δ (mcrC-mrr)114::IS10	New England Biolabs
<i>E. coli</i> ER1821-pFnuDIIMKn	<i>E. coli</i> ER1821 mit Plasmid pFnuDIIMKn für die <i>in vivo</i> -Methylierung von <i>E. coli</i> - <i>C. pasteurianum</i> Shuttlevektoren	Prof. Perry Chou [94]

2.1.1 Kulturmedien

2.1.1.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Tabelle 4: LB-Medium

Komponente	Konzentration (g/l)
Natriumchlorid	10
Hefeextrakt	5
Trypton	10

Tabelle 5: SOB-Medium

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	0,5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
Kaliumchlorid	2,5 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Magnesiumsulfid	10 mM

Tabelle 6: SOC-Medium

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	0,5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
Kaliumchlorid	2,5 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Magnesiumsulfid	10 mM
Glukose	20 mM

2.1.1.2 Medien für die Kultivierung von *C. pasteurianum*

Tabelle 7: RCM-Medium

Komponente	Konzentration (g/l)
Natriumchlorid	5
Hefeextrakt	3
Pepton	10
Fleisch-Extrakt	10
Lösliche Stärke	1
Natrium-Acetat	3
Glukose	5
Cystein-HCl	0,5
Resazurin	0,001

Tabelle 8: Biebl-Medium

Komponente	Konzentration
Glycerol	80 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
CaCl ₂	0,02 g/l
CoCl ₂	200 mg/l
CuCl ₂	20 mg/l
H ₃ BO ₃	60 mg/l
HCl (95 %)	0,9 ml/l
MnCl ₂	100 mg/l
Na ₂ MoO ₄	40 mg/l
NiCl ₂	20 mg/l
ZnCl	70 mg/l
FeSO ₄	0,005 g/l
Cystein-HCl	0,5 g/l
Resazurin	0,001 g/l

Tabelle 9: 2x YTG-Medium (pH 6,3)

Komponente	Konzentration (g/l)
Natriumchlorid	5
Hefeextrakt	10
Trypton	16
Glukose	5
Resazurin	0,001

2.1.2 Fermentation

50 ml RCM-Medium wurden mit 1,8 ml einer Kryokultur angeimpft und 24 h bei 35 °C kultiviert. Diese Vorkultur wurde als Inokulum für das Produktionsmedium verwendet. Für die *batch*-Kultivierung wurde Biebl-Produktionsmedium [103] mit 80 g/l Glycerol sowie 10 g/l Glukose (separat autoklaviert) verwendet. Die *batch*-Fermentationen wurden in 1,5 l-Dasgip-Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1 l durchgeführt (Dasgip, Jülich). Nach Sterilisation wurde das Medium bis zum Erreichen der Raumtemperatur im Reaktor mit sterilem Stickstoff begast. Unmittelbar vor der Inokulation wurden Cystein-HCl und FeSO₄ steril zu einer finalen Konzentration von 3 g/l bzw. 0,01 mg/l zugegeben. Bei Fermentationen mit dem PC-Stamm und den entsprechenden Kontrollfermentationen wurde zusätzlich 0,12 mg/l Biotin zugegeben. Außerdem wurde bei dem PC-Stamm 7 mg/l Thiamphenicol zur Selektion hinzugefügt. Die Inokulation erfolgte mit 50 ml der Vorkultur, entsprechend einer OD₆₀₀ von 0,2. Während der Kultivierung wurde die Temperatur auf 35 °C, die Rührergeschwindigkeit auf 300 rpm sowie der pH durch Zugabe von 5 M KOH auf 6,0 gehalten.



Abb. 9: Fermentation im Dasgip-Bioreaktor.

2.1.3 Gasmessung, analytische Methoden und Berechnungen

Das Gesamtvolumen der Fermentationsgase wurde mit einem Milligasähler (Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG) ermittelt. Die Gaszusammensetzung wurde mit Hilfe des Massenspektrometers OmniStar 300 (Balzer Instruments/ Pfeiffer Vacuum GmbH) bestimmt.

Die Konzentrationen von Glukose, Glycerol, Butanol, 1,3-PDO, Ethanol, Acetat, Butyrat, Formiat und Laktat wurden mittels HPLC (HPLC System 300, Kontron instruments, Rossdorf) aus zellfreien Überständen bestimmt. Dazu wurde eine Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm) verwendet. Die Messung erfolgte bei 60 °C, einer Flussrate von 0,6 ml/min. und unter Verwendung einer mobilen Phase von 0,005 M H₂SO₄. Die Detektion erfolgte mit Brechungsindex-sowie Ultraviolett-Detektoren. Glycerol und Glukose wurden in 1:10-Verdünnung gemessen, alle anderen Metabolite in 1:2-Verdünnung.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 PCR

2.2.1.1 In-Fusion-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten und Einführung von Mutationen. Für Klonierungen wurde der CloneAmp Hifi PCR Premix (Clontech) verwendet. Es wurden jeweils 25 µl-Ansätze

angesetzt, wie in Tab. 10 dargestellt. Die Amplifikation erfolgte nach dem PCR-Protokoll in Tab. 11.

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Ansätze mit dem Restriktionsenzym Dpn I verdaut. Dpn I schneidet methylierte DNA und dient somit dem Abbau des Template-Plasmids. Der Verdau erfolgte für 1,5 h bei 30 °C mit 1 µl Dpn I pro 25 µl PCR-Ansatz.

Tabelle 10: Pipettierschema der PCR-Ansätze für Klonierungen. () = Angaben für die Amplifikation von genomischer DNA

Komponente	Konzentration	Menge (µl)
CloneAmp Hifi PCR Premix	2 x	12,5
<i>forward</i> Primer	10 µM	0,25
<i>reverse</i> Primer	10 µM	0,25
Template-DNA	1 ng/µl (100 ng/µl)	1
H ₂ O		11
Gesamt		25

Tabelle 11: PCR-Protokoll für Klonierungen. () = Angaben für die Amplifikation von genomischer DNA

Temperatur (°C)	Zeit (s)	Wiederholungen
98	10	30 x
55	15	
72	5 s/kb (60 s/kb)	
4	∞	

2.2.1.2 Kolonie-PCR

Zum Nachweis des Vorhandenseins einer spezifischen DNA-Sequenz nach Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Für die Kolonie-PCR wurde der Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in 50 µl Lysepuffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 % Triton-X 100) 2 min. in der Mikrowelle erhitzt. Die lysierte Kolonie wurde als Template-DNA für die Kolonie-PCR eingesetzt (Tab. 12 und 13).

Tabelle 12: Pipettierschema der PCR-Ansätze für Kolonie-PCR

Komponente	Konzentration	Menge (μl)
Maxima Hot Start PCR Premix	2 x	5
<i>forward</i> Primer	10 μM	0,2
<i>reverse</i> Primer	10 μM	0,2
Template-DNA		1
H ₂ O		3,6
Gesamt		10

Tabelle 13: PCR-Protokoll für Kolonie-PCR

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (s)	Wiederholungen
95	4 min.	
95	30 s	30 x
T _m - 5	30 s	
72	1 min./kb	
72	10 min.	
4	∞	

2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten

Zur Analyse der DNA-Fragmente nach PCR wurden die DNA-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Je nach Anzahl der Proben wurden 50-100 ml-Gele mit 1% Agarose in TAE-Puffer verwendet. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 5 μl des DNA-Größenstandards O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V über 45 min. in TAE-Laufpuffer in BioRad-Elektrophoresekammern. Die Gele wurden mit SYBR GOLD (Thermo Fisher Scientific) für 30 min. gefärbt und am BioRad GelDoc XR Imager dokumentiert.

2.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Extraktion von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA-Extraktion wurden mit den NucleoSpin Gel and PCR clean-up- bzw. NucleoSpin Plasmid-Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit Wasser. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab durchgeführt und mit Hilfe des Programmes FinchTV ausgewertet.

2.2.4 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA von *C. pasteurianum* wurden 2 ml Bakterienkultur in der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,6$) geerntet. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Tissue-Kits von Macherey-Nagel. Dabei wurde das Support-Protokoll für gram-positive Bakterien angewendet. Die Konzentration von Lysozym im Lysepuffer wurde auf 100 mg/ml erhöht und die Lyse erfolgte bei 56 °C über Nacht.

2.2.5 Klonierung

Klonierungen wurden mit Hilfe des In-Fusion HD Cloning Kits (Clontech) durchgeführt. Abb. 10 zeigt eine schematische Darstellung des Klonierungsprotokolls. Alle Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Life Technologies gekauft und sind in Tabelle 15 aufgelistet. Für die Generierung des Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsvektors pMTL007-PC wurde das Pyruvatcarboxylasegen von genomischer DNA von *C. pasteurianum* DSM 525 per PCR amplifiziert und *downstream* vom *C. sporogenes fdx*-Promotor in den *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttlevektor pMTL007C-E2 kloniert, indem dessen Gruppe II-Intron und *ltrA*-Sequenzen ersetzt wurden.

Für den ClosTron-Splitvektor pMTL007-LtrA wurde das *ltrA*-Gen des Plasmids pSYCP amplifiziert und anstelle des vorhandenen *ltrA*-Gens und des Gruppe II-Introns in den Vektor pMTL007C-E2 kloniert.

Der Vektor pMTL007-Int-dhaB wurde basierend auf dem Vektor pMTL007C-E2 Cpas_dhaB-519-520s kloniert, indem die *ltrA*-Sequenz durch PCR-Linearisierung und Re-Ligation entfernt wurde.

Der CRISPR-Cas-Typ I-*dhaB*-Deletionsvektor pMTL85141-CRISPR-dhaB wurde entsprechend [93] für die Deletion von *dhaB* designt und von der Firma GenScript (USA) synthetisiert.

Für den CRISPR-Cas-Typ II-*dhaB*-Deletionsvektor pMTL85141-Cas9n-dhaB wurde die Cas9-Nickase von dem Vektor pNICKclos1.0 (addgene) amplifiziert und in den *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttlevektor pMTL85141 kloniert, flankiert von den *C. sporogenes fdx*-Promotor- und Terminatorregionen von pMTL007C-E2. Basierend auf diesem in-

termediären Plasmid pMTL85141-Cas9n wurde der *dhaB*-Deletionsvektor pMTL85141-Cas9n-*dhaB* durch Insertion einer gRNA-Sequenz sowie eines Reparaturtemplates kreiert. Die gRNA-Sequenz wurde entsprechend des Plasmids pNICKclos1.0 unter transkriptioneller Kontrolle des synthetischen Promotors pJ23119 designt. Die genspezifische 20-Nukleotid-Targetsequenz (TATTTACAGGACGCTCTGAT) wurde mit Hilfe des Cas Designer Tools vom Center for Genome Engineering, Institute for Basic Science, Korea (www.rgenome.net) ausgewählt, um Nebeneffekte außerhalb des Zielgens zu vermeiden. Die gRNA-Kassette wurde von Life Technologies synthetisiert. Das Reparaturtemplate, bestehend aus zwei 1 kb-Regionen *up-* und *downstream* vom *dhaB*-Gen, wurde von dem Plasmid pMTL85141-CRISPR-*dhaB* amplifiziert. Reparaturtemplate und gRNA wurden *downstream* vom *fdx*-Promotor und Cas9n in pMTL85141-Cas9n kloniert, wobei die gRNA mit ihrem Promotor pJ23119 in *antisense*-Orientierung integriert wurde.

Für die Komplementation der *dhaB*-Deletion wurde der Vektor pMTL85141-*dhaB*-compl, basierend auf dem Plasmid pMTL85141-Cas9n-*dhaB*, kloniert. Dazu wurde die *dhaB*-spezifische 20-Nukleotid-Targetsequenz durch eine neue Targetsequenz (AATACCGCTTCAAACGGTAT) ersetzt, welche komplementär zu einem Bereich in der *upstream* gelegenen 1 kb-Homologieregion von *dhaB* ist. Die deletierte *dhaB*-Genregion wurde von genomischer DNA von *C. pasteurianum* amplifiziert und in den Vektor integriert. Die Primer zur Amplifikation von *dhaB* wurden so designt, dass parallel zur Amplifikation von *dhaB* stille Mutationen in der 20-Nukleotid-Targetsequenz der *upstream* gelegenen Homologieregion des Reparaturtemplates des Vektors eingeführt wurden, um eine Cas9-Nickase-Aktivität nach Re-Integration der *dhaB*-Sequenz ins Genom zu vermeiden.

Tabelle 14: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle
pMTL85141	<i>E. coli-C. pasteurianum</i> -Shuttlevektor (CmR; ColE1 ori; pIM13 ori)	Nigel Minton [45]
pMTL007C-E2	<i>E. coli-C. pasteurianum</i> -Shuttlevektor mit Gruppe II-Intron für die ClosTron-Mutagenese (CmR; ColE1 ori; pCB102 ori)	Nigel Minton [43]
pMTL007-PC	Pyruvatcarboxylase-Expressionsvektor basierend auf pMTL007C-E2 (CmR; ColE1 ori; pCB102 ori)	diese Arbeit
pMTL007C-E2 Cpas_dhaB-519-520s	ClosTron- <i>dhaB</i> -Deletionsvektor basierend auf pMTL007C-E2	Sugima Rappert
pSYCP	ClosTron-Deletionsvektor mit markerlosem Gruppe II-Intron; CpaA II-Restriktionsschnittstellen entfernt	Perry Chou [95]
pMTL007-LtrA	ClosTron-Splitvektor, exprimiert LtrA von pSYCP	diese Arbeit
pMTL007-Int-dhaB	ClosTron-Splitvektor, enthält <i>dhaB</i> -Gruppe II-Intron von pMTL007C-E2 Cpas_dhaB-519-520s	diese Arbeit
pMTL85141-CRISPR-dhaB	<i>dhaB</i> -Deletionsvektor für die Deletion basierend auf endogenem Typ I-CRISPR-Cas-System	diese Arbeit
pNICKclos1.0	<i>E. coli-C. pasteurianum</i> -Shuttlevektor, exprimiert gRNA und Cas9-Nickase von <i>S. pyogenes</i>	addgene (73639)
pMTL85141-Cas9n	<i>E. coli-C. pasteurianum</i> -Shuttlevektor, exprimiert Cas9-Nickase von pNICKclos1.0	diese Arbeit
pMTL85141-Cas9n-dhaB	<i>dhaB</i> -Deletionsvektor basierend auf pMTL85141-Cas9n	diese Arbeit
pMTL85141-dhaB-compl	<i>dhaB</i> -Komplementationsvektor basierend auf pMTL85141-Cas9n-dhaB	diese Arbeit
pFnuDIIMKn	FnuDII-Methyltransferasegen von <i>Fusobacterium nucleatum</i> inseriert in das <i>tet</i> -Gen und das FRT-flankierte <i>kan</i> -Gen von pETKnFRT inseriert in das <i>cat</i> -Gen von pACYC184; (p15A ori; KnR)	Perry Chou [94]

Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5´-3´)
PC For	tggccgtcgttttacatgaaagaatTTAAAagagtattggtgctaacagag
PC Rev	acgggtgctcgacatttacttcaactcaattaataactctccagctttaacc
V-PC For	atgtcgagcaccggttctcg
V-PC Rev	gtaaaacgacggccagtgaatcc
Seq R525-PC For	caggaaacagctatgac
Seq R525-PC Rev	acgggtgctcgacatttacttcaactcaattaataactctccagctttaacc
V-LtrA For	atgtcgagcaccggttctcg
V-LtrA Rev	ggcatagctgtttcctgtgtgaaattgt
LtrA For	gaaacagctatgacatgaaaccaacaatggcaatTTtagaaagaat
LtrA Rev	acgggtgctcgacattcacttgtgttt
V-Int-dhaB For	atgtcgagcaccggttctcg
V-Int-dhaB Rev	gtgaagtagggaggtaccgcc
Int-dhaB For	acctccctacttcaccatattcattttctg
Int-dhaB Rev	acgggtgctcgacattttgaggtttctccctaatcaattt
Cas9n For	acacaggaaacagctatggataagaaataactcaataggcttagctatcg
Cas9n Rev	acgggtgctcgacattcagtcacctcctagctgactcaaatcaa
V-Cas9n For	atgtcgagcaccggttctcg
V-Cas9n Rev	agctgtttcctgtgtgaaattggttatgag
dhaB H1 For	ttctcggagcactgtagtaaaaagaggaataccatataatataaaatggttatgaatat
dhaB H2 Rev	gctTTTTTTtagattgaataccaatacctattccagaaccactaag
gRNA dhaB For	actaccatcgggccacagctagctcagtcctaggtataataactag
gRNA dhaB Rev	atctaaaaaaaaagcaccgactcgggtg
V-dhaB For	gccgccgatggtagtgtg
V-dhaB Rev	acagtgctccgagaacggg
gRNA Rev	gttttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtccg
N20 compl For	aacacggcatctaataatggaatactagtagtattatacctaggactg
V-dhaB compl_H2 For	ccttctctcattcagatataagaagaactgc
V-dhaB compl_N20 H1 Rev	ataccgtttgaagcggatTTTTgtatatacctaccattaatatttttattgattctaatttatTTTtatcaatccc
dhaB compl_N20 H1 For	aataccgcttcaaacggtaggtattaataatgtattacagagaatagatttttctatggagataaatat
dhaB compl_H2 Rev	tatatctgaatgagagaaggtttgatcatttgc
Seq dhaB H1 For	ccattttatgattatacaaccctttg
Seq dhaB H2 Rev	catccgtaatagctggaagt
Seq R525 F502.06873 For	ctatctaaaatTTTTgtataattccacataacctttaacgg
Seq R525 F502.06873 Rev	catcctacaatgactctactggaatcg
Seq R525 F502.05127 For	ccggcattattgactgcaataatcattatattgc
Seq R525 F502.05127 Rev	gagaatactttattaatctacaggaatttcttttgatgg

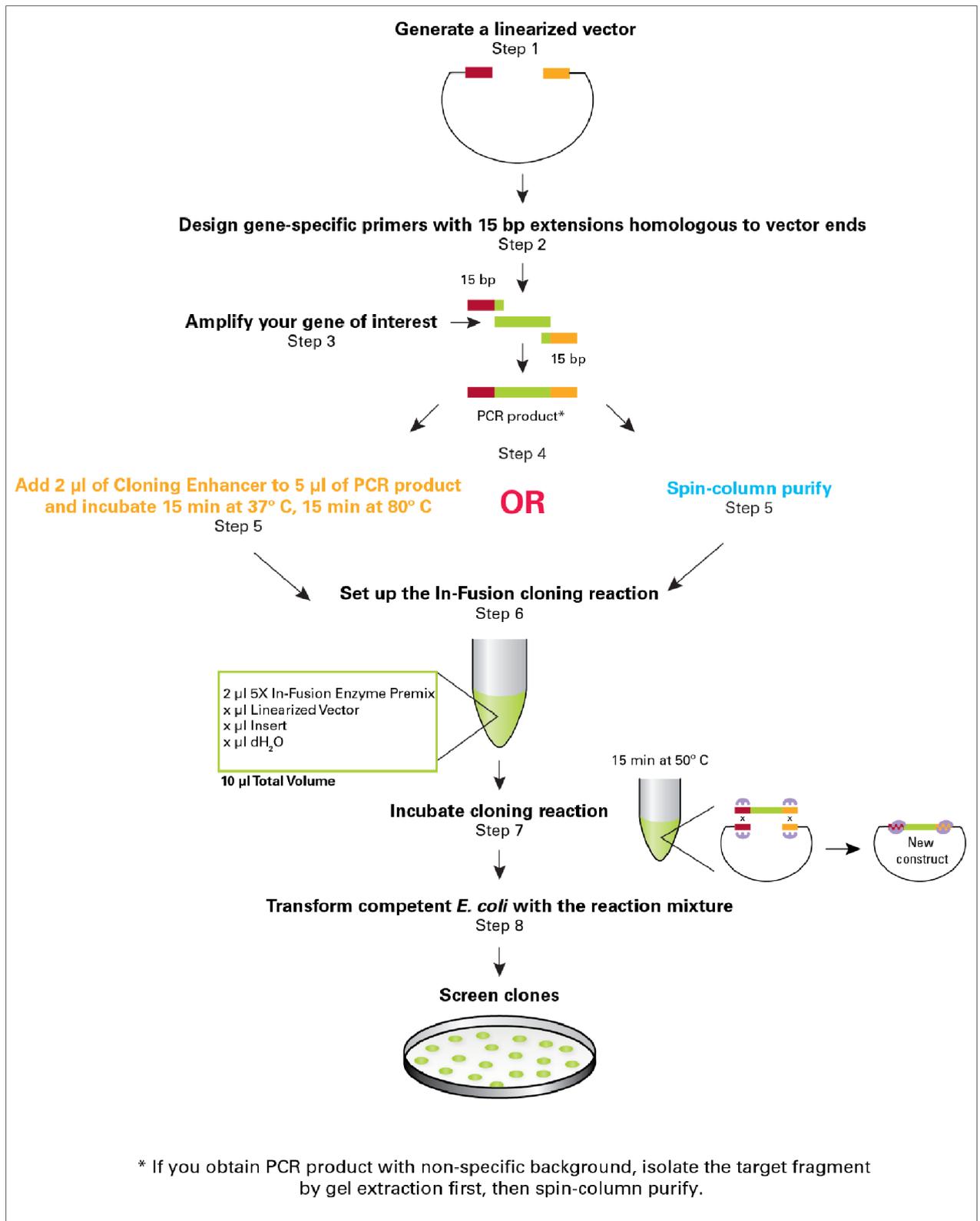


Abb. 10: Schematische Darstellung des In-Fusion-Klonierungsprotokolls (Clontech; www.clontech.com)

2.2.6 *In vivo*-Methylierung und Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für die Transformation von *C. pasteurianum* wurde die verwendete Plasmid-DNA zuvor methyliert, um vor dem Verdau durch Restriktionsendonukleasen von *C. pasteurianum* geschützt zu sein. Dazu wurden die *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttleplasmide mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm ER1821/pFnuDIIMKn eingebracht. Dieser Stamm exprimiert die Methylase FnuDII von dem Plasmid pFnuDIIMKn, sodass eine m5C-Methylierung des Motivs 5'-CGCG-3' erfolgte. Außerdem ist der Stamm Dam+, sodass zusätzlich das Motiv 5'-GATC-3' m6A-methyliert wurde. Durch diese Methylierungen wurde das Shuttleplasmid vor Degradierung durch die Typ II-Endonukleasen CpaAI und CpaI von *C. pasteurianum* geschützt. Die Plasmid-DNA wurde mittels Midiprep (NucleoBond Xtra Midi-Kit von Macherey-Nagel) extrahiert, um ausreichend hohe Konzentrationen für die Transformation von *C. pasteurianum* zu erhalten.

Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym Bsh1236I, einem Isoschizomer von FnuDII, wurde die erfolgreiche Methylierung kontrolliert. Dazu wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit 1 µl Bsh1236I sowie 2 µl FastDigest-Puffer (Life Technologies) in einem 20 µl-Ansatz 2 h bei 37 °C verdaut und auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.7 Transformation

2.2.7.1 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Für die Klonierung wurden kompetente *E. coli* NEB 10β-Zellen verwendet, welche mittels Hitzeschock transformiert wurden.

1 ml einer Übernachtskultur wurde verwendet, um 100 ml LB-Medium anzupflanzen. Die Kultur wurde bei 37 °C und 20 rpm kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht war, und anschließend 15 min. auf Eis gekühlt. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 3300 g bei 4 °C für 10 min.. Das Pellet wurde in 30 ml gekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 4 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerol aufgenommen. 200 µl-Aliquots wurden bei -80 °C eingefroren oder direkt für die Transformation verwendet.

Für die Hitzeschocktransformation wurden 10 µl Plasmid-DNA mit 200 µl kompetenten Zellen 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 30 s bei 42 °C wurden die transformierten Zellen 5 min. auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 750 µl SOC-Medium 60 min. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zur Selektion der Transformanten wurden die Zellen an-

schließend auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol ausgestrichen.

2.2.7.2 Elektroporation von *E. coli*

Für die *in vivo*-Methylierung zum Schutz vor Endonukleasen wurden die *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttleplasmide mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm ER1821/pFnu-DIIMKn eingebracht.

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 5 ml SOB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 200 µl verwendet, um 10 ml SOB anzupfen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 wachsen zu lassen. Die Kultur wurde für 10 min. auf Eis gekühlt und anschließend bei 5000 rpm und 4 °C 10 min. pelletiert. Das Pellet wurde mit 2 ml 10 % Glycerol gewaschen. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt, bevor das Pellet in 10 % Glycerol resuspendiert und in 100 µl-Aliquots aufgeteilt wurde. Die kompetenten Zellen wurden bei –80 °C gelagert oder direkt für die Transformation verwendet.

Ein Transformationsansatz, bestehend aus 100 µl kompetenten Zellen und 1 µg Plasmid-DNA, wurde in einer 0,1 cm-Küvette bei 1,6 V, 2 µF und 200 Ω elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml SOB-Medium wurden die transformierten Zellen 60 min. bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend auf LB-Chloramphenicol-Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen.

2.2.7.3 Transformation von *C. pasteurianum* mittels Konjugation

Die Transformation von *C. pasteurianum* mittels Konjugation wurde nach dem Protokoll von [45] durchgeführt. Das *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttleplasmid wurde zunächst per Hitzeschock-Transformation in den Donorstamm *E. coli* CA434 eingebracht. Von dem transformierten Donor- sowie vom Rezipientenstamm *C. pasteurianum* DSM 525 wurden 1 ml-Kulturen in LB- bzw. 2 x YTG-Medium angesetzt. Der Donor-Kultur wurde Chloramphenicol (25 µg/ml) zur Selektion zugesetzt. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Donorzellen durch Zentrifugation bei 4000 g für 2 min. geerntet. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl der *C. pasteurianum*-Rezipientenzellen resuspendiert. Der Mix aus Donor- und Rezipientenzellen wurde auf eine 2 x YTG-Agarplatte gegeben und 24 h bei 37 °C anaerob kultiviert, ohne die Platte zu invertieren.

Die Transformanten wurden in 1 ml PBS vereint und auf 2 x YTG-Agarplatten ausplattiert, welchen Thiamphenicol (10 µg/ml) zur Selektion für das Plasmid sowie Cycloserin (250 µg/ml) zur Gegenselektion gegen die *E. coli*-Donorzellen zugesetzt war. Die Platten wurden 72 h bei 37 °C kultiviert.

Für die triparentale Konjugation wurde das *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttleplasmid in den Donorstamm *E. coli* ER1821/pFnuDIIMKn eingebracht. *E. coli* CA434 diente als Helferstamm und wurde dem Mix aus Donor- und Rezipientenzellen zusätzlich hinzugegeben. Alle anderen Schritte erfolgten wie für die diparentale Konjugation beschrieben.

Die erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des transformierten Plasmids getestet. Zur Verifizierung des PCR-Ergebnisses wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt; die aus *C. pasteurianum* erhaltene, niedrigkonzentrierte Plasmid-DNA wurde zur Amplifikation in *E. coli* eingebracht und anschließend mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert.

2.2.7.4 Elektrotransformation von *C. pasteurianum*

Die Transformation von *C. pasteurianum* wurde nach dem Elektroporationsprotokoll von Pyne et al. [94] durchgeführt. Elektrokompente Zellen wurden von sporulierten Kolonien hergestellt. Durch einen Hitzeschock von 10 min. bei 80 °C wurden die Sporen zum Auskeimen stimuliert, anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C kultiviert und als Inokulum für die Herstellung der kompetenten Zellen verwendet.

Während der früh-exponentiellen Wachstumsphase (bei einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4) wurden 1,25 % Glycin zur Aufweichung der Zellwand zugegeben. Durch Zugabe von Saccharose wurde eine osmotische Stabilisierung der Zellen erzielt. Nach 2,5 - 3ständiger Inkubation mit Glycin wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in Elektroporationspuffer (270 mM Saccharose, 1 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Natriumphosphat) aufgenommen.

Vor Auslösung des Elektroporationspulses wurden die kompetenten Zellen für 5 min. mit 5 % Ethanol inkubiert, um die Zellmembran zu solubilisieren. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 25 µF und $\infty \Omega$ (12–14 ms).

5–20 µg DNA wurden für die Transformation von 600 µl elektrokompenten Zellen verwendet. Die Plasmid-DNA wurde zum Schutz vor *C. pasteurianum*-Restriktionsendonukleasen vor der Transformation *in vivo* methyliert [94]. Die resultierenden *C. pasteurianum*-Mutanten wurden mittels 7 µg/ml Thiamphenicol selektiert.

2.2.8 Plasmid-Curing

Zur weiteren Verwendung eines transformierten *C. pasteurianum*-Stammes wurde das zuvor eingebrachte Shuttleplasmid wieder entfernt. Dazu wurden die transformierten Zellen parallel auf Agarplatten mit und ohne Thiamphenicol ausgestrichen. Alle zwei Tage erfolgte ein Ausstrich der einzelnen Klone von der Nicht-Selektionsplatte auf frische Platten mit und ohne Thiamphenicol, solange bis ein Klon kein Wachstum auf Thiamphenicol mehr zeigte. Der Verlust des zuvor transformierten Plasmids wurde mittels Kolonie-PCR verifiziert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Präparation von Zelllysaten

Zelllysate von *C. pasteurianum* R525 und *C. pasteurianum* PC wurden aus Übernachtskulturen in RCM-Medium hergestellt. Ein Kulturvolumen entsprechend einer OD_{600} von 25 wurde geerntet und in 1 ml 100 mM Tris-Puffer (pH 8) aufgenommen. Die Zellyse erfolgte mit dem Fastprep Homogenisator (MP biomedical) in 4 Zyklen (6 m/s, 40 s). Zellreste wurden durch Zentrifugation entfernt; der Überstand wurde direkt für die weitere Analyse verwendet.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [11]. 1:10-Verdünnungen der Zelllysate sowie eine Standard-Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) von 0 bis 0,5 mg/ml wurden in Triplikaten in eine 96-Wellplatte pipettiert und mit Protein-Assay-Färbelösung (BioRad) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der BSA-Standardkurve mit der Proteinkonzentration korreliert.

2.3.3 SDS-PAGE

Eine 20 µg Protein entsprechende Menge Zelllysate wurden mit 4 x Laemmli-Puffer (Tab. 16) versetzt und 10 min. bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden zusammen mit dem Größenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) auf ein 12 %

SDS-Gel (Tab. 17) geladen und bei 80–120 V separiert [60]. Die Proteinbanden wurden mit Roti-Blue quick Färbelösung (Roth) sichtbar gemacht.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers (4 x) für die SDS-PAGE

Komponente	Konzentration	Menge/l
Glycerol	20 %	4 ml
20 % SDS	8 %	8 ml
Bromphenolblau	0,02 %	0,004 g
β -Mercaptoethanol	4 %	1 ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	200 mM	4 ml

Tabelle 17: Zusammensetzung des SDS-Gels

Komponente	Trenngel (12 %) (ml)	Sammelgel (4 %) (ml)
40 % Acrylamid (29:1)	9 x	1
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	7,5	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25
H ₂ O	13,035	7,59
10 % SDS	0,3	0,1
TEMED	0,015	0,01
10 % APS	0,15	0,05
Gesamt	30	10

2.3.4 Pyruvatcarboxylase-Aktivitätstest

Der Pyruvatcarboxylase-Aktivitätstest wurde von [91] adaptiert. Dabei wurde die Oxalacetat-Bildung durch eine nachfolgende Citrat-Synthase-Reaktion quantifiziert. Das in dieser Reaktion freiwerdende CoA produziert in Gegenwart von DTNB ein Signal, das bei 412 nm detektierbar ist.

Der 1 ml-Reaktionsansatz (Tab. 18) wurde bis zur Messung auf Eis gekühlt. Die DTNB- und Citrat-Synthase-Lösungen wurden jeweils frisch angesetzt. Bei der Negativkontrolle wurde Pyruvat durch H₂O ersetzt. Unmittelbar vor der Messung wurde der Reaktionsansatz auf 30 °C vorgewärmt und 50 μ l Zellysate entsprechend 0,2 mg Gesamtprotein wurden zugegeben. Die Absorption bei 412 nm wurde bei 30 °C spektrophotometrisch gemessen.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Pyruvatcarboxylase-Reaktionspuffers

Komponente	Stocklösung	Menge (µl)	Konzentration
H ₂ O	-	480	-
Tris-HCl pH 8	1 M	90	0,09 mM
NaHCO ₃	0,5 M	100	0,05 mM
MgCl ₂	0,1 M	50	0,005 mM
Acetyl-CoA	1 mM	100	0,0001 mM
ATP	0,1 M	50	0,005 mM
DTNB	0,0039 g/ml in EtOH	25	0,0975 µg/l
Citrat-Synthase	1000 U/ml	5	0,005 U/l
Pyruvat (H ₂ O)	0,1 M	50	0,005 mM

Aus den Meswerten für die Absorption wurde die spezifische Pyruvatcarboxylaseaktivität wie folgt berechnet:

$$VA = \frac{1000 V_{(K)} D \left(\frac{dA}{dt} (P) - \frac{dA}{dt} (K) \right)}{\epsilon V_{(L)} F} \quad (2.1)$$

mit

VA = Volumenaktivität (U/ml)

$V_{(K)}$ = Küvettenvolumen (µl)

D = Verdünnungsfaktor des Zelllysates

$dA/dt_{(P)}$ = Absorptionsänderung der Probe/min.

$dA/dt_{(K)}$ = Absorptionsänderung der Kontrolle/min.

ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient für reduziertes DTNB (13,6 l/mmol bei einer Schichtdicke von 1 cm)

$V_{(L)}$ = Volumen des Zelllysates (µl)

F = Konzentrationsfaktor des Zelllysates

Die spezifische Enzymaktivität wurde berechnet durch:

$$\text{Spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{\text{Volumenaktivität (U/ml)}}{\text{Proteinkonzentration (mg/ml)}} \quad (2.2)$$

3 Ergebnisse

3.1 Transformation von *C. pasteurianum*

Das *engineering* des zellulären Metabolismus basiert auf genetischen Manipulationen wie der (Über-)Expression oder Deletion spezifischer Gene. Um diese Manipulationen zu ermöglichen, stellt die effiziente Transformation von Fremd-DNA eine grundlegende Bedingung dar. Das erste Ziel war daher, eine Methode für den Transfer von Fremd-DNA in *C. pasteurianum* in ausreichenden Raten zu etablieren.

3.1.1 Test verschiedener DNA-Transfermethoden für die Transformation von *C. pasteurianum*

Für Clostridien werden hauptsächlich zwei Methoden für den DNA-Transfer verwendet: Konjugation und Elektrotransformation. Beide Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet um herauszufinden, welche Technik die besten Ergebnisse für *C. pasteurianum* liefert.

3.1.1.1 Konjugation

Für die Konjugation wurde das Protokoll von Heap et al. [45] verwendet. Dieses Protokoll ist für die Transformation von Clostridien etabliert, wurde für *C. pasteurianum* jedoch noch nicht getestet. Es wurde der konjugative Transfer des *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttleplasmids pMTL85141 untersucht. Dieser Vektor enthält einen gram-positiven und einen gram-negativen Replikationsursprung (*repL* und *colE1*) sowie ein Chloramphenicol-/Thiamphenicol-Resistenzgen (*catP*) und eine *multiple cloning site* (MCS) (Abb. 11 C). Als Donor diente der *E. coli*-Stamm CA434. Die Konjugation wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.7.3 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten ausgestrichen, welche Thiamphenicol für die Selektion auf das Plasmid pMTL85141 sowie Cycloserin für die Gegenselektion gegen den Donorstamm enthielten.

Während auf den Kontrollplatten, auf denen nur Donor- oder nur Rezipientenzellen ausgestrichen worden waren, kein Wachstum zu beobachten war, waren nach drei Tagen anaerober Kultivierung vereinzelte Kolonien auf der Konjugantenplatte sichtbar. Mittels Kolonie-PCR wurde überprüft, ob die Klone das Plasmid pMTL85141 enthielten.

Alle getesteten Klone wiesen in der Kolonie-PCR die erwartete, pMTL85141-spezifische Bande auf (Abb. 11 A). Um auszuschließen, dass das positive Ergebnis durch eine Kontamination mit verbliebenen Donorzellen verursacht wurde, wurde die Plasmid-DNA zur weiteren Analyse aus den Konjuganten extrahiert. Da die Extraktion von Plasmid-DNA aus *C. pasteurianum* nur sehr geringe Konzentrationen liefert, wurde die extrahierte DNA zur Amplifikation in *E. coli* eingebracht. Die aus *E. coli* extrahierte DNA wurde mittels XhoI-Restriktionsverdau analysiert. Bis auf einen Klon (Klon 1) wiesen alle Proben das für pMTL85141 erwartete Bandenmuster auf (Abb. 11 B). Das positive Ergebnis konnte zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Transformation von größeren Plasmiden blieb ohne Erfolg. Ebenso konnte das beschriebene Ergebnis für das Plasmid pMTL85141 nicht reproduziert werden; wiederholte Versuche eines konjugativen Transfers des Plasmids blieben erfolglos.

Neben der robusten Zellwand stellt die Aktivität von Endonukleasen bei *C. pasteurianum* ein Hindernis für den Transfer von Fremd-DNA dar. Durch Methylierung der Plasmid-DNA kann diese teilweise vor dem Verdau durch die Endonukleasen geschützt werden. Für die *in vivo*-Methylierung kann der *E. coli*-Stamm ER1821/pFnuDIIMKn verwendet werden [94]. Die Methylierung der Erkennungssequenz 5'-CGCG-3' durch die Methylase FnuDIIM schützt das Plasmid vor Degradation durch die Endonuklease CpaAI. Außerdem erfolgt in dem Stamm eine Dam-Methylierung (5'-GATC-3'), welche die Shuttleplasmide zusätzlich vor der Endonuklease CpaI schützt. Um zu testen, ob eine Methylierung der Plasmid-DNA den Erfolg der Konjugation steigern kann, wurde eine triparentale Konjugation durchgeführt, bei der der Stamm ER1821/ pFnuDIIMKn als Donor verwendet wurde; *E. coli* CA434 diente hier als Helferstamm (Abb. 5 B). Nach erfolgter Konjugation wurden keine Kolonien auf den Thiamphenicol-Cycloserin-Selektionsplatten zu finden. Mit der triparentalen Konjugation konnte keine Transformation von *C. pasteurianum* erreicht werden.

3.1.1.2 Elektroporation

Um das Elektroporationsprotokoll von [94] zu testen, wurde *C. pasteurianum* DSM 525 mit dem *E. coli*-*C. pasteurianum*-Shuttlevektor pMTL85141 [45] transformiert. Bei Verwendung von 5 µg methylierter Plasmid-DNA pro Transformationsansatz wurden Thiamphenicol-resistente Klone erhalten. Mittels Kolonie-PCR wurde überprüft, ob diese Klone

Ergebnisse

die für pMTL85141 spezifische Bande aufwiesen. Alle getesteten Klone zeigten die erwartete Bande (Abb. 11 D). Das Vorhandensein des Vektors in diesen Klonen konnte durch Sequenzierung bestätigt werden.

Die Elektrotransformation von *C. pasteurianum* mit dem Vektor pMTL85141 war reproduzierbar, allerdings war die Transformationseffizienz mit bis zu 10 Kolonien/ μg Plasmid-DNA sehr gering. Die Transformation von anderen Vektoren mit einer Größe über 8-9 kb blieb ohne Erfolg.

Der Vergleich beider Transformationsmethoden zeigt, dass die Elektroporation gegenüber der Konjugation die besseren Ergebnisse liefert (Tab. 19).

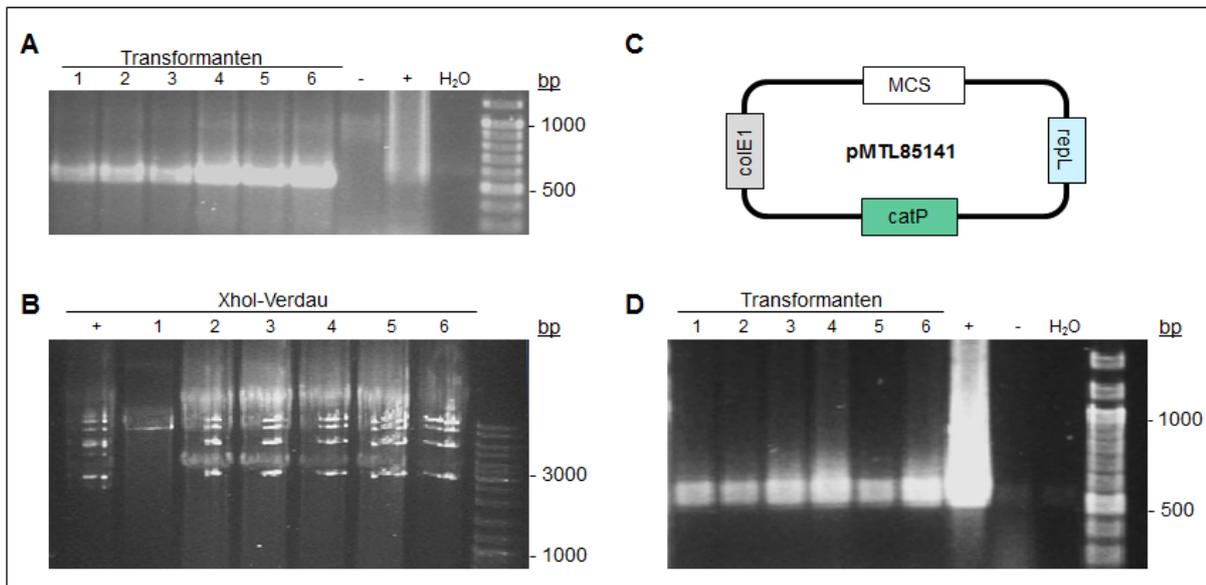


Abb. 11: Transformation von *C. pasteurianum* mittels Konjugation und Elektroporation. A: Kolonie-PCR zur Überprüfung des Erfolgs des konjugativen Plasmid-Transfers. - = Kolonie-PCR von nicht-transformiertem Klon; + = PCR mit pMTL85141 als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle. B: XhoI-Verdau der mittels Konjugation transformierten Klone zur Verifizierung des Vorhandenseins des Plasmids pMTL85141. + = XhoI-Verdau des Plasmids pMTL85141. C: Schematische Darstellung des *E. coli-C. pasteurianum*-Shuttleplasmids pMTL85141. MCS = *multiple cloning site*; *catP* = Chloramphenicol-/Thiamphenicol-Resistenzgen; *colE1* = gram-negativer Replikationsursprung; *repL* = gram-positiver Replikationsursprung. D: Kolonie-PCR zur Überprüfung des Erfolgs der Transformation mit dem Plasmid pMTL85141 mittels Elektroporation. + = PCR mit pMTL85141 als Template; - = Kolonie-PCR von nicht-transformiertem Klon; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle.

Tabelle 19: Vergleich verschiedener Transformationsmethoden hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Transformation von *C. pasteurianum*. CFU = *colony-forming units*.

	Konjugation	Elektroporation
Transformation des Leervektors pMTL85141	✓	✓
Transformation größerer Plasmide (8-9 kb)	-	-
Transformationseffizienz	10^{-8} CFU/Rezipient	10 CFU/ μ g DNA
Reproduzierbarkeit	-	✓

3.1.2 Generierung eines *C. pasteurianum*-Stammes mit gesteigerter Transformationseffizienz

Die Elektrotransformation von *C. pasteurianum* DSM 525 nach dem Protokoll von [94] erzielte in wiederholten Versuchen im Rahmen dieser Arbeit sowie in vorangehenden Arbeiten keine ausreichenden DNA-Transferraten, die eine zielgerichtete genetische Manipulation und Optimierung dieses Stammes ermöglichen würden. Um eine höhere Transformationseffizienz zu erhalten, wurde folgendes Vorgehen gewählt [108]: Ausgehend von der Vermutung, dass die vereinzelt Transformanten spontan entstandene Mutanten darstellen, welche Mutationen erworben haben, die ihnen die DNA-Aufnahme ermöglichen, wurden die im ersten Versuch erhaltenen Transformanten selektiert und charakterisiert: Die einzelnen Klone wurden zunächst durch serielle Ausstriche auf nicht-selektiven Agarplatten dazu gebracht, das transformierte Plasmid wieder zu verlieren. Nach erfolgreichem Plasmid-Curing wurden die Transformanten mit dem gleichen Plasmid, pMTL85141, retransformiert, und die Effizienz der Transformation wurde mit der des vorangehenden Experimentes verglichen. Ein Klon konnte auf diese Weise selektiert werden, welcher nach Re-Transformation eine deutlich gesteigerte DNA-Transferrate aufwies. Die Effizienz der DNA-Aufnahme durch Elektrotransformation war im Vergleich zum parental Stamm, *C. pasteurianum* DSM 525, ca. 50 x erhöht (Abb. 12). Die gesteigerte Transformationseffizienz war reproduzierbar und ermöglichte neben dem Transfer des Leervektors die Transformation größerer Plasmide. Der selektierte, elektrokompetente Klon wird im Folgenden *C. pasteurianum* R525 genannt.

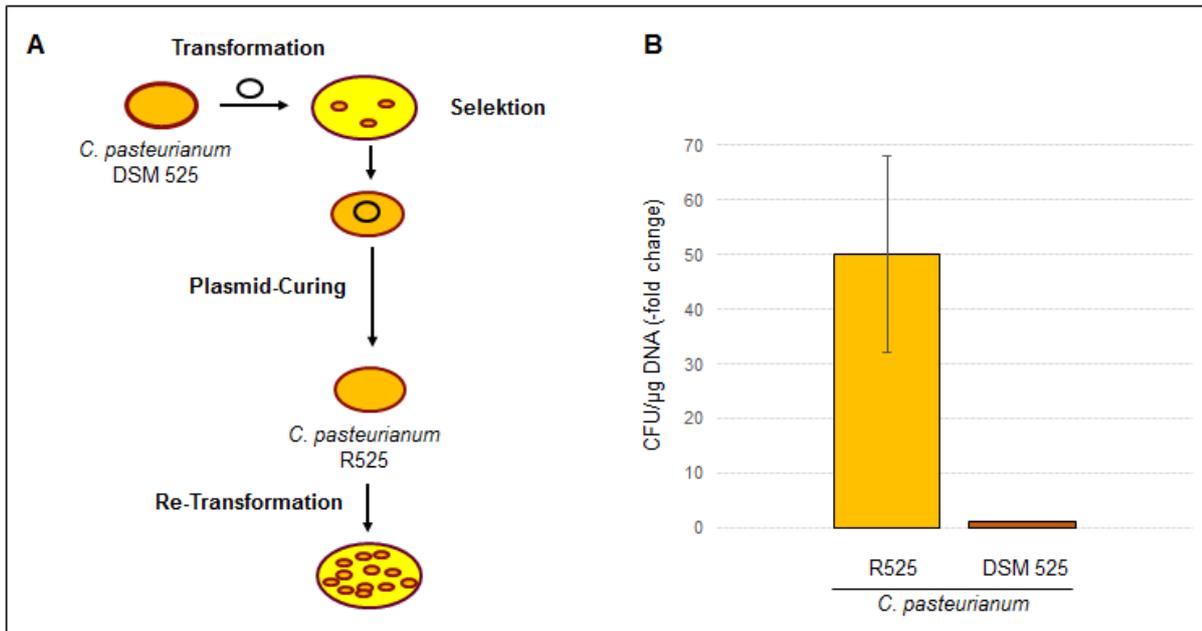


Abb. 12: Steigerung der Transformationseffizienz von *C. pasteurianum*. A: Schematische Darstellung des Protokolls zur Selektion elektrokompetenter Klone (nach [108]). B: Transformationseffizienz des Klones R525 im Vergleich zum parentalen Stamm DSM 525 (n = 3). CFU = colony-forming units.

3.1.3 Charakterisierung des elektrokompetenten *C. pasteurianum* R525-Stammes

Um herauszufinden, welche Mutationen für die gesteigerte Transformationseffizienz verantwortlich sind, wurde das Genom des *C. pasteurianum*-Stammes R525 sequenziert (BGI, Hong Kong). Die Genomsequenz des R525-Stammes wurde mit der des parentalen Stammes *C. pasteurianum* DSM 525 verglichen. Mit 4285458 bp wurde eine Coverage von 99,99% erzielt. Insgesamt wurden zwei Insertionen (1 und 3 bp) und zwei Deletionen (5 und 10 bp) gefunden (Abb. 13 A); davon betraf die 3 bp-Insertion die codierende Sequenz des R525-Stammes. Außerdem wurden 11 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) gefunden, von denen sich 5 in der codierenden Sequenz befanden, darunter 4 synonyme und ein nicht-synonymer SNP.

Die Insertion war in dem Gen F502_06873 lokalisiert, welches für eine Transposase codiert (Tab. 20). Durch Insertion der drei Basen CTG wurde an Position 78 des Proteins die Aminosäure Alanin addiert. Die Transposase F502_06873 verfügt über drei funktionale Domänen: eine DNA-Bindungsdomäne, eine Transposasedomäne und eine Integrase-domäne. Von der Mutation betroffen war die DNA-Bindungsdomäne (Abb. 13 B).

Bei dem zweiten mutierten Protein handelte es sich um das hypothetische Protein

F502_05127. Hier war an Position 467 ein Alanin durch ein Valin ersetzt (durch Mutation des Codons GCA zu GTA) (Tab. 20). Dieses Protein ist ein prognostiziertes integrales Membranprotein mit mehreren helikalen Transmembrandomänen von unbekannter Funktion. Die Mutation befand sich in einem nicht-helikalen Bereich (Abb. 13 C).

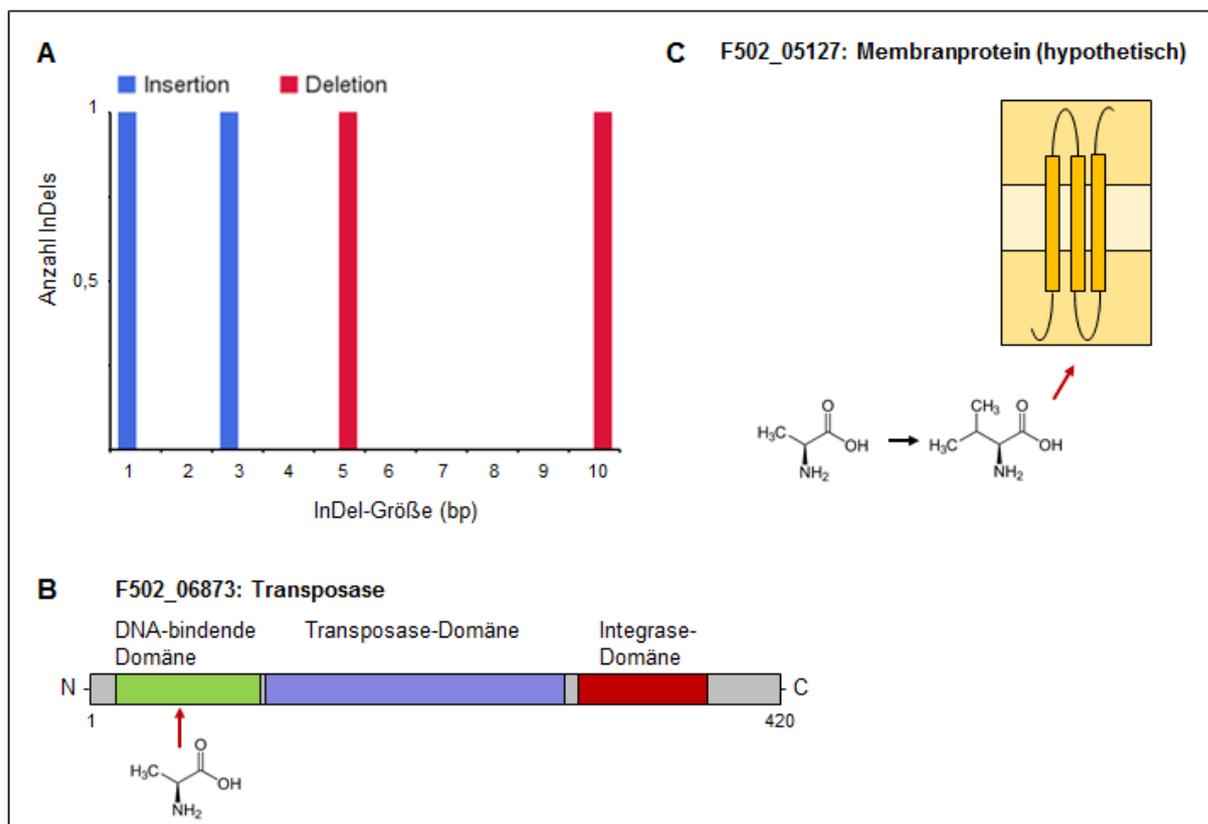


Abb. 13: Ergebnisse der Genomsequenzierung des elektrokompetenten *C. pasteurianum*-R525-Stammes. A: Im R525-Stamm gefundene Insertionen und Deletionen (InDels) der Genomsequenz des R525-Stammes im Vergleich zum parental Stamm *C. pasteurianum* DSM 525. B, C: Grafische Darstellung der Lokalisation der gefundenen Mutationen in den Proteinen F502_06873 (B) und F502_05127 (C).

Tabelle 20: Ergebnisse der Genomsequenzierung des *C. pasteurianum*-R525-Stammes. Gefundene Mutationen im Vergleich zum parentalen DSM 525-Stamm. +, - = *sense*- bzw. *antisense*-DNA-Strang.

Name	Funktion	Region	Mutation	Effekt
Transposase von IS1604-Element (F502_06873)	DNA-bindendes Protein, Nukleotidyltransferase	1696210-1695644 (-)	Insertion: CTG	Insertion von Alanin (DNA-bindende Domäne)
Hypothetisches Protein (F502_05127)	Integrales Membranprotein	2798836-2800216 (+)	GCA-GTA	Alanin - Valin (Nicht-Transmembrandomäne)

Zur phänotypischen Charakterisierung wurde der R525-Stamm in Bioreaktoren kultiviert und hinsichtlich seines Wachstums und seiner Produktbildung analysiert. Als Kontrolle diente der parentale Stamm *C. pasteurianum* DSM 525. Die Kultivierung erfolgte unter Verwendung von Cosubstrat, bestehend aus 80 g/l Glycerol und 10 g/l Glukose als Kohlenstoffquellen.

Der R525-Stamm zeigte eine etwas geringere Wachstumsrate ($\mu_{\max} = 0,210 \pm 0,001/\text{h}$ im Vergleich zu $0,261 \pm 0,004/\text{h}$ für den DSM 525-Stamm) und erreichte eine geringere finale Biomassekonzentration (Abb. 14 A und D). Das Substrat wurde vom R525-Stamm komplett metabolisiert, während bei der Kontrolle das Glycerol nicht vollständig verbraucht wurde. Der Kohlenstofffluss erfolgte beim R525-Stamm verstärkt zu den Produkten: Das Verhältnis von Alkohol- zu Biomasseproduktion aus dem verwendeten Substrat war zugunsten der Alkoholproduktion signifikant erhöht (Abb. 15 A). Während beim DSM 525-Stamm hauptsächlich Butanol gebildet wurde, war das Hauptprodukt des R525-Stammes 1,3-PDO (Abb. 14 B und E).

Das Verhältnis von 1,3-PDO-zu Butanolproduktion war beim R525-Stamm mit 2,39 im Vergleich zu 0,21 beim DSM 525-Stamm signifikant erhöht (Abb. 15 D). Darüber hinaus wurde bei dem R525-Stamm eine vermehrte Säureproduktion beobachtet: Die Gesamtsäurebildung war im Vergleich zur Kontrolle mehr als verdoppelt, wobei Acetat, Formiat und Laktat nur leicht erhöht waren; Butyrat war stark erhöht mit 6,1 g/l im Vergleich zu 2,4 g/l beim Kontrollstamm (Abb. 14 C und F und Abb. 15 B).

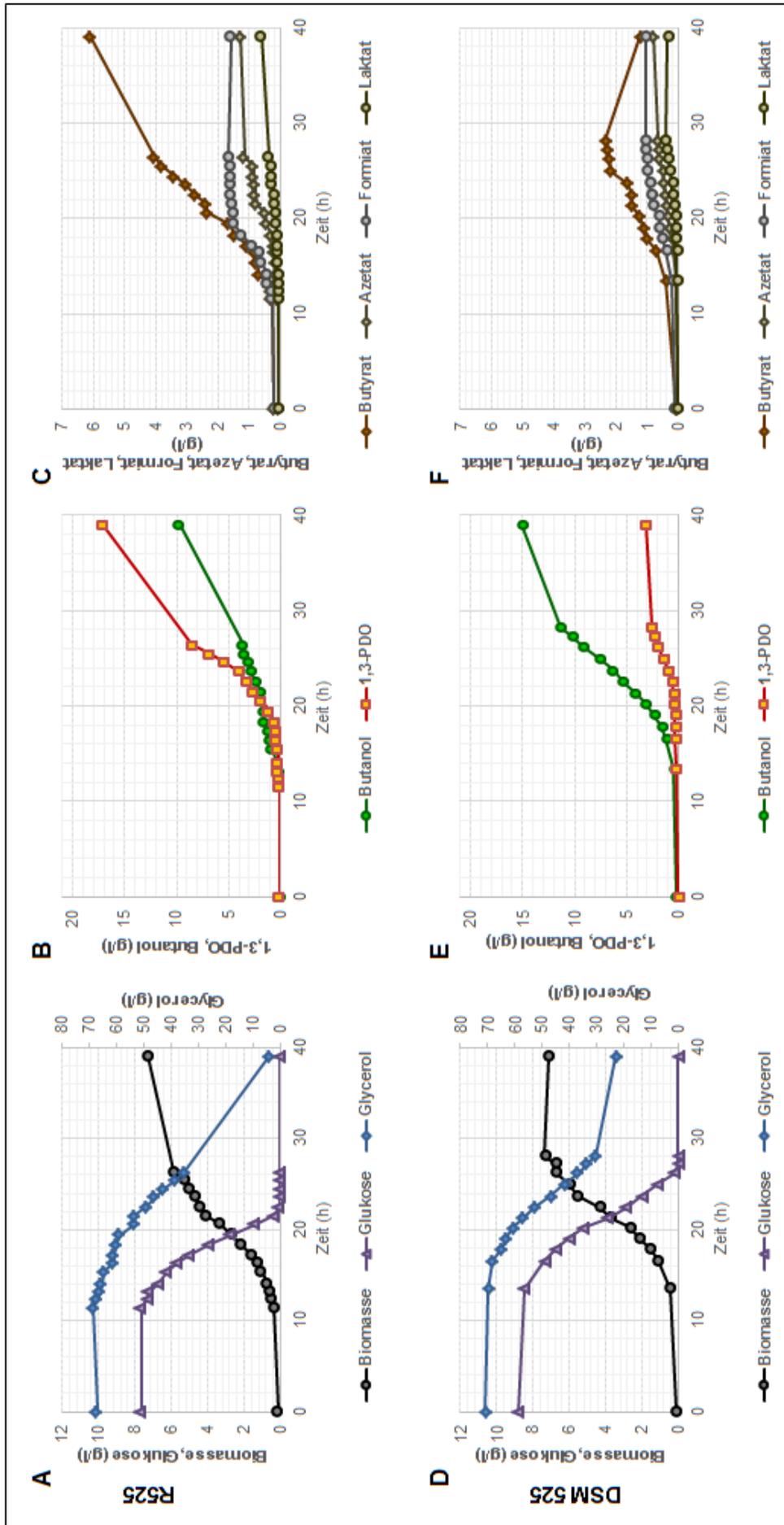


Abb. 14: Fermentationsergebnisse des *C. pasteurianum* R525-Stammes auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat im Vergleich zum DSM 525-Stamm. A, D: Wachstum und Substratverbrauch. B, E: Produktion von 1,3-PDO und Butanol. C, F: Produktion der Säuren Butyrat, Acetat, Formiat und Laktat.

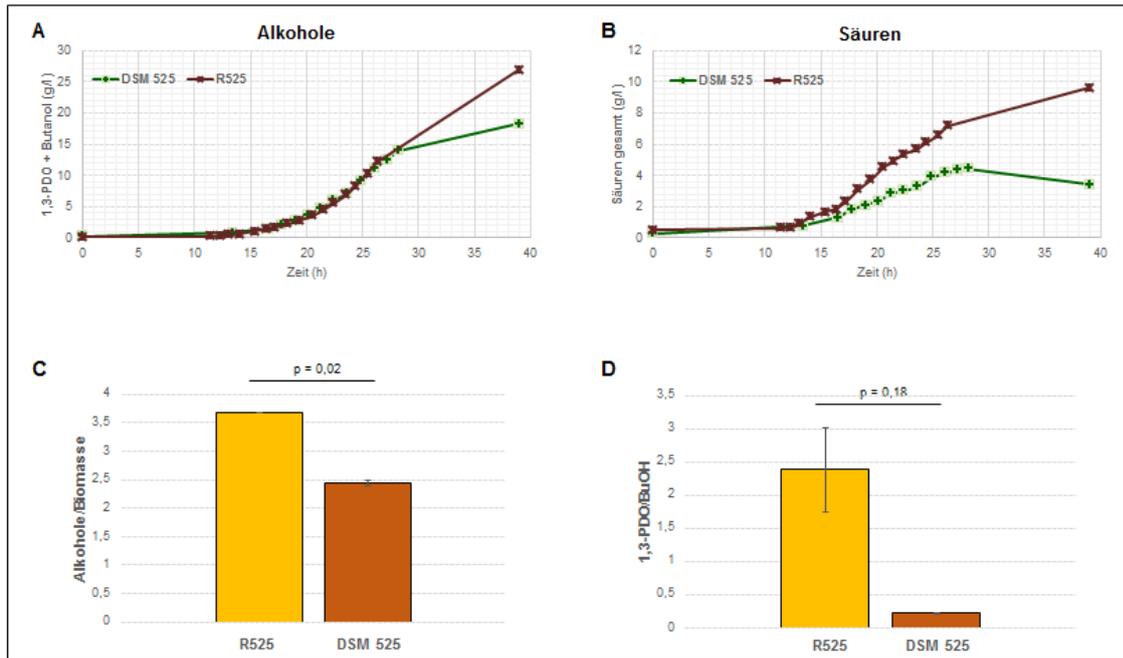


Abb. 15: Analyse der Fermentationsprodukte des *C. pasteurianum* R525-Stammes auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat. A: Gesamtproduktion der Alkohole 1,3-PDO und Butanol des R525- und DSM 525-Stammes. B: Gesamtsäureproduktion des R525- und DSM 525-Stammes. C: Verhältnis von Alkohol-zu Biomasseproduktion. D: Verhältnis von 1,3-PDO- zu Butanolproduktion (n = 2).

3.2 Metabolic Engineering von *C. pasteurianum* durch Verschiebung des Kohlenstoffflusses am Pyruvat-Acetyl-CoA-Knotenpunkt

In vorhergehenden Studien zur Cosubstratfermentation von *C. pasteurianum* war beobachtet worden, dass unmittelbar nach Glukoseverbrauch ein Wachstumsstopp erfolgte, obwohl Glycerol als Substrat ausreichend vorhanden war [104]. Eine Proteomanalyse hatte gezeigt, dass das Enzym Pyruvatcarboxylase in der glukoselimitierten Phase der Fermentation deutlich herunterreguliert war. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass durch eine gesteigerte Aktivität des Enzyms Pyruvatcarboxylase die Substratnutzung und somit das Wachstum sowie die Produktion von *C. pasteurianum* in Cosubstratfermentationen optimiert werden kann.

Basierend auf dem elektrokompenten R525-Stamm wurde das Enzym Pyruvatcarboxylase als primäres Target für die Optimierung des Stammes gewählt. Durch homologe Überexpression sollte die Umsetzung von Glycerol in der glukoselimitierten Phase der Cosubstratfermentation gesteigert werden.

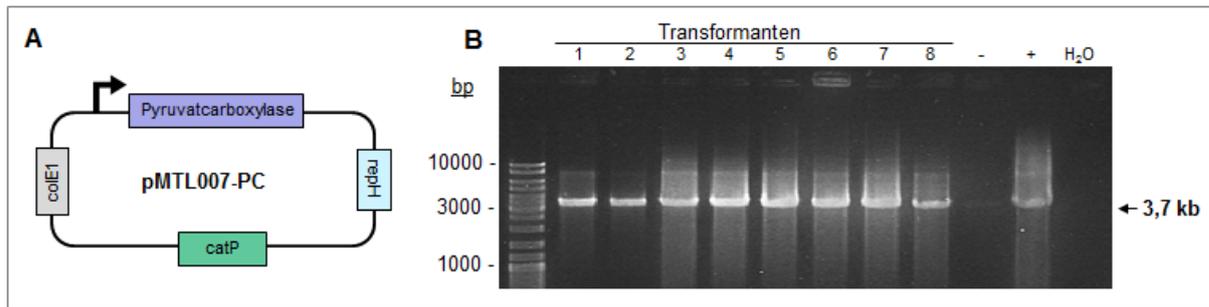


Abb. 16: Generierung einer Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante von *C. pasteurianum*. A: Schematische Darstellung des PC-Überexpressionsvektors. *catP* = Chloramphenicol-/Thiamphenicol-Resistenzgen; *colE1* = gram-negativer Replikationsursprung; *repL* = gram-positiver Replikationsursprung. B: Kolonie-PCR zur Selektion von Transformanten. - = Kolonie-PCR von nicht-transformiertem Klon; + = PCR mit pMTL007-PC als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle.

3.2.1 Generierung einer *C. pasteurianum*-Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante

Für die homologe Überexpression wurde der Pyruvatcarboxylasevektor pMTL007-PC designed, kloniert und nach *in vivo*-Methylierung in *C. pasteurianum* R525 eingebracht (Abb. 16 A). Das Vorhandensein von pMTL007-PC in den transformierten Klonen auf den Selektionsplatten wurde durch Kolonie-PCR überprüft und durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 16 B). Die SDS-PAGE von Zelllysaten der PC-Mutante zeigte eine gesteigerte Expression im Vergleich zum Wildtyp: Sowohl das 130 kDa-Homotetramer als auch das 65 kDa-Dimer waren in erhöhter Menge vorhanden (Abb. 17 A).

Nachfolgend wurde die Pyruvatcarboxylaseaktivität der Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurde ein Enzymaktivitätstest durchgeführt, in dem die Formation des Produktes Oxalacetat mit Hilfe einer nachfolgenden Citratsynthase-Reaktion bestimmt wurde [91]. Die spezifische Aktivität pro Gesamtprotein wurde aus den Zelllysaten von PC-Mutante und Wildtyp (R525) berechnet. Im Vergleich zum Wildtyp war die Pyruvatcarboxylase-Aktivität bei der PC-Mutante ca. fünfmal erhöht (Abb. 17 B). Die Generierung einer *C. pasteurianum*-Mutante mit gesteigerter Pyruvatcarboxylase-Aktivität war erfolgreich.

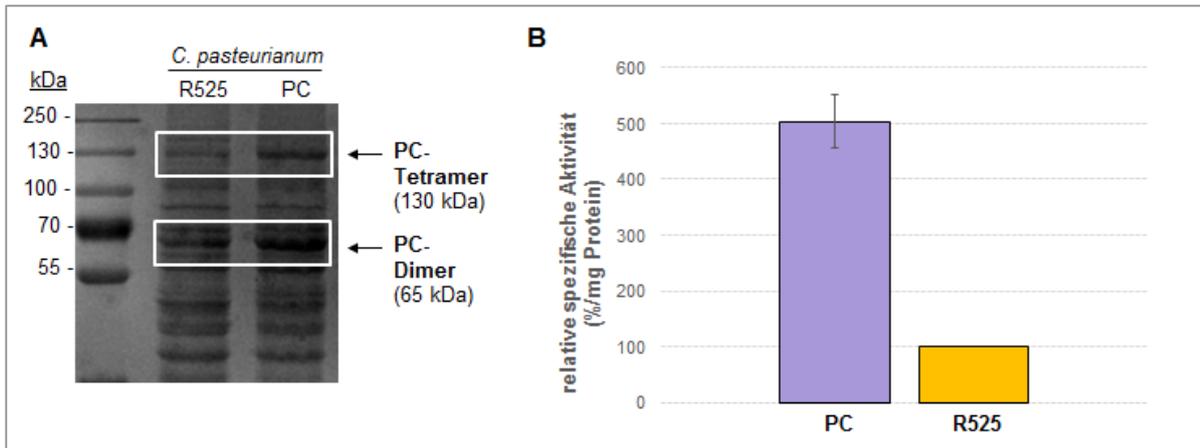


Abb. 17: Biochemische Charakterisierung der Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante von *C. pasteurianum*. A: SDS-PAGE zur Bestimmung des Pyruvatcarboxylase-Expressionslevels. B: Pyruvatcarboxylase-Aktivitätstest der PC-Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm R525 (n = 3).

3.2.2 Charakterisierung der *C. pasteurianum*-Pyruvatcarboxylase-Mutante

Das Wachstum und die Produktbildung der PC-Mutante wurden auf Cosubstrat unter kontrollierten Bedingungen im Bioreaktor untersucht. Die zur Verfügung gestellte Glukose war nach 22-24 Stunden vollständig verbraucht (Abb. 18 A und D). Eine verstärkte Metabolisierung des Glycerols nach Glukoseverbrauch wurde nicht beobachtet; der Glycerolverbrauch der PC-Mutante nach Glukoselimitierung war sogar im Vergleich zur Cosubstrat-Phase sowie im Vergleich zum R525-Wildtypstamm vermindert (Tab. 21). Da eine Wachstumsinhibierung nach Glukoselimitierung in Cosubstrat-Fermentationen mit der Herunterregulierung der Pyruvatcarboxylase assoziiert worden war [104], wurden die Wachstumsraten (μ) vor und nach Glukoselimitierung ermittelt. Das Verhältnis der Wachstumsrate nach Glukoselimitierung zur Wachstumsrate mit Glukose war bei der PC-Mutante geringer als beim Wildtyp (Tab. 21). Die Mutante erreichte außerdem eine geringere finale Biomassekonzentration (Abb. 18 A). Die homologe Überexpression der Pyruvatcarboxylase in *C. pasteurianum* führt somit weder zu einer gesteigerten Glycerolnutzung noch zu einem gesteigerten Wachstum.

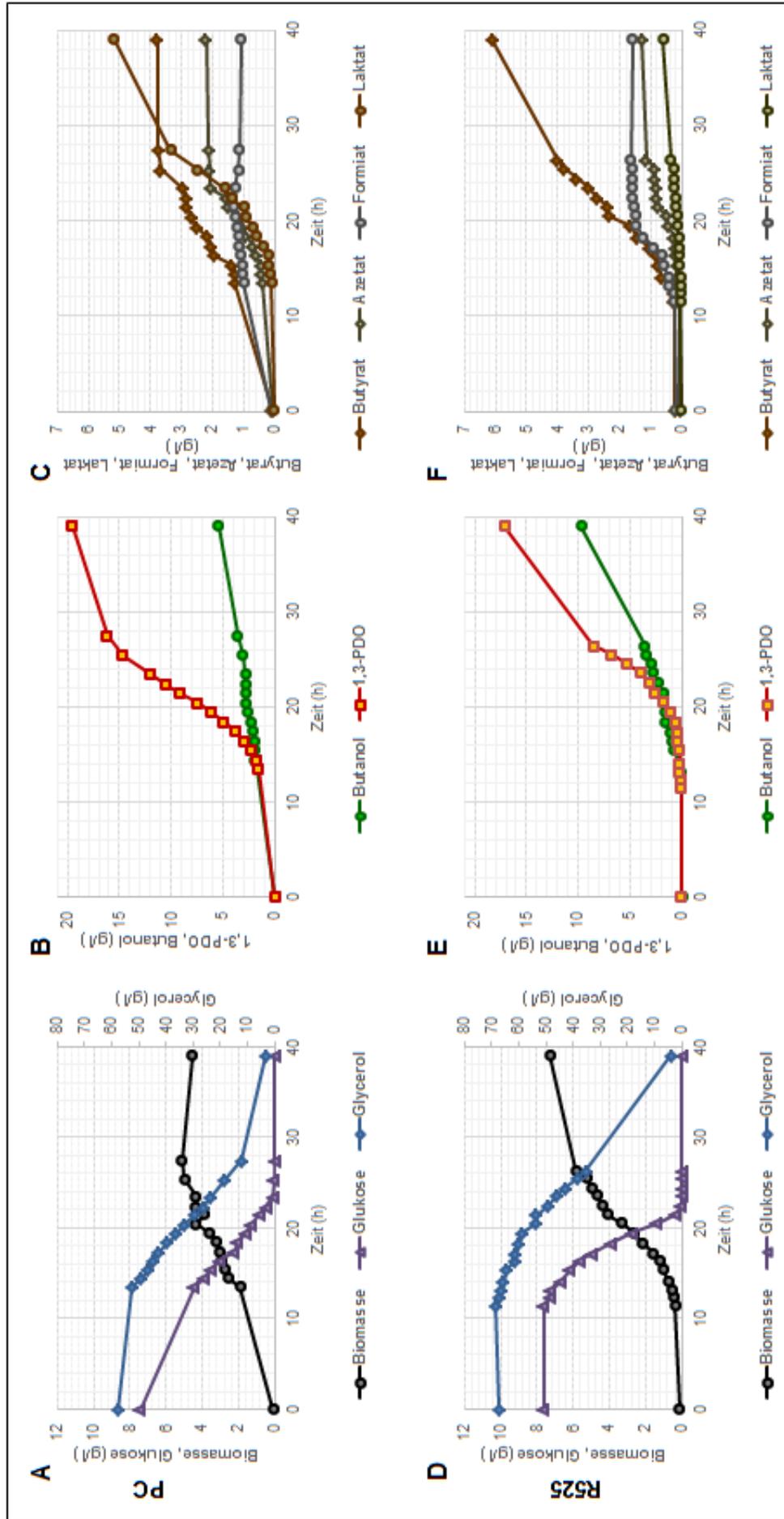


Abb. 18: Fermentationsergebnisse der *C. pasteurianum*-PC-Mutante auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat im Vergleich zum R525-Wildtypstamm. A, D: Wachstum und Substratverbrauch. B, E: Produktion von 1,3-PDO und Butanol. C, F: Produktion der Säuren Butyrat, Acetat, Formiat und Laktat.

Ergebnisse

Die PC-Mutante wurde des Weiteren hinsichtlich ihrer Metabolitenbildung charakterisiert. Die produzierte Menge an Alkoholen (1,3-PDO und Butanol) war insgesamt ähnlich der des Wildtyps, wobei die Produktion früher und schneller erfolgte (Abb. 18 B und E und Abb. 19 A). Außerdem erfolgte eine verstärkte Säureproduktion (Abb. 18 C und F und Abb. 19 B). Im Vergleich zum Wildtyp war eine Verschiebung des Produktspektrums zu stärker reduzierten Produkten zu beobachten: Sowohl 1,3-PDO als auch Laktat wurden vermehrt gebildet (Abb. 21). Die Produkte unterhalb von Acetyl-CoA – Butyrat, Butanol und Acetat – wurden dagegen vermindert gebildet. Obwohl die Pyruvatcarboxylasereaktion mit einer Fixierung von CO₂ einhergeht, war das Verhältnis von gemessenem CO₂ zu Wasserstoff nicht vermindert, sondern erhöht (Abb. 20).

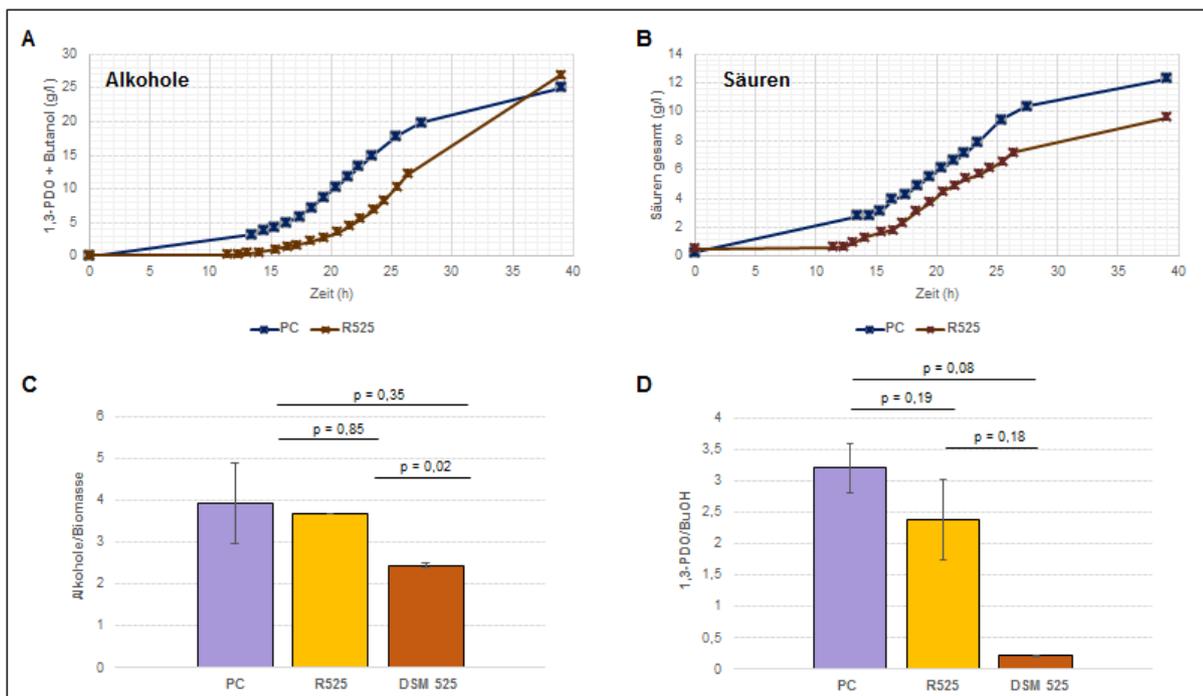


Abb. 19: Analyse der Fermentationsprodukte der *C. pasteurianum*-PC-Mutante auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat. A: Gesamtproduktion der Alkohole 1,3-PDO und Butanol des PC- und R525-Stammes. B: Gesamtsäureproduktion des PC- und R525-Stammes. C: Verhältnis von Alkohol-zu Biomasseproduktion. D: Verhältnis von 1,3-PDO- zu Butanolproduktion (n = 2).

Tabelle 21: Ergebnisse der Fermentation der Pyruvatcarboxylase-Überexpressionsmutante

	PC	R525
Wachstumsrate (μ) vor Glukoselimitierung	$0,344 \pm 0,060$	$0,35 \pm 0,030$
Wachstumsrate (μ) nach Glukoselimitierung	$0,022 \pm 0,010$	$0,172 \pm 0,004$
Biomasse (g/l) bei Fermentationsende (39 h)	$4,909 \pm 0,337$	$7,056 \pm 0,252$
Glycerolverbrauch (g/l) vor Glukoselimitierung	$25,568 \pm 5,772$	$16,057 \pm 2,306$
Glycerolverbrauch (g/l) nach Glukoselimitierung	$23,528 \pm 3,453$	$42,669 \pm 2,534$
C-Wiederfindung	$0,99 \pm 0,001$	$0,99 \pm 0,001$

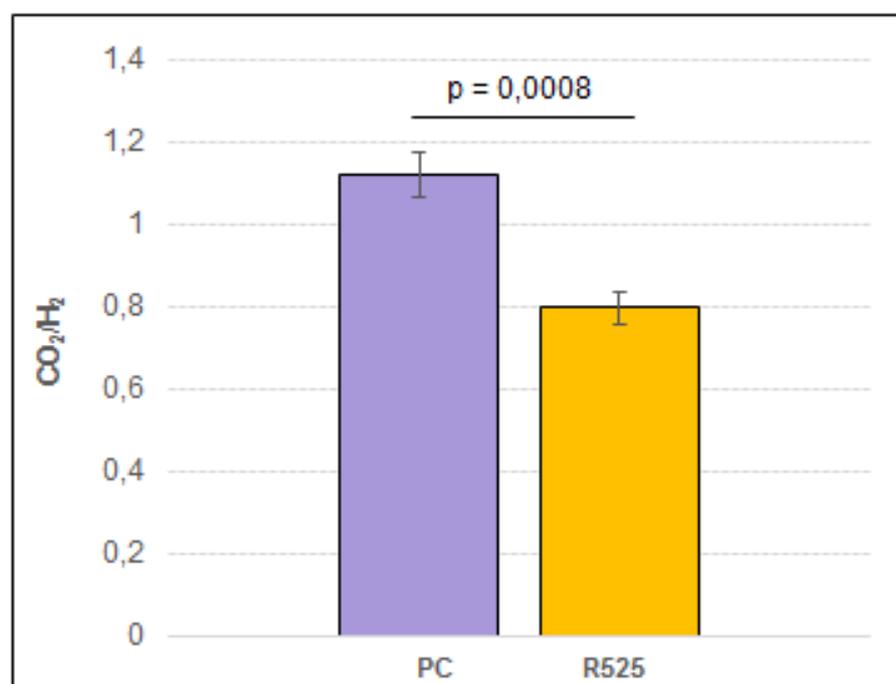


Abb. 20: Analyse der Gasproduktion der *C. pasteurianum*-PC-Mutante auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat. 5% Fehler bedingt durch Milligascounter.

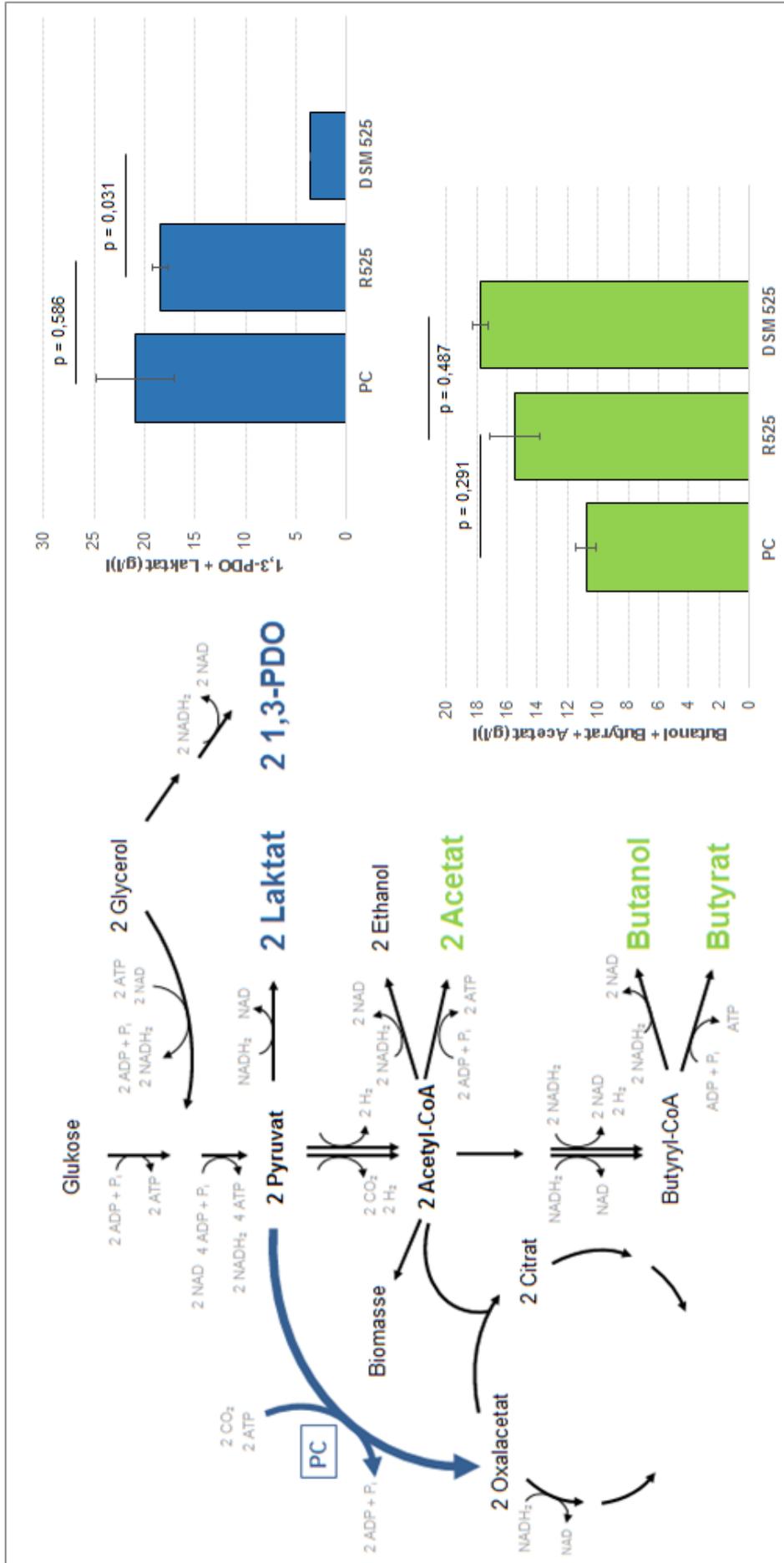


Abb. 21: Pyruvatcarboxylase-Überexpression verschiebt das Produktspektrum von *C. pasteurianum* zu vermehrt reduzierten Produkten (Laktat und 1,3-PDO) und vermindert die Bildung von Acetyl-CoA (Acetat, Butyrat und Butanol) (n = 2).

3.3 *Engineering* von *C. pasteurianum* für eine gesteigerte Butanolproduktion

Butanol ist eines der Hauptprodukte von *C. pasteurianum* und von hohem industriellen Wert. Die Optimierung von *C. pasteurianum* für eine selektive, gesteigerte Butanolproduktion stellt daher ein erstrebenswertes Ziel für das *engineering* dieses Stammes dar. Der 1,3-PDO-Produktionsweg ist einer der wichtigsten konkurrierenden Produktionswege für die Butanolproduktion. Das Ziel war es daher, diesen Pathway auszuschalten und den Kohlenstofffluss in Richtung Butanol auf diese Weise zu steigern. Zu diesem Zweck wurde das Enzym Glyceroldehydratase als Target ausgewählt. Die Glyceroldehydratase katalysiert die Bildung von 3-Hydroxypropionaldehyd aus Glycerol, den ersten Schritt des 1,3-PDO-Pathways. Die Deletion dieses Enzyms sollte die Bildung von 1,3-PDO ausschalten und dadurch die Produktion von Butanol erhöhen.

3.3.1 Deletion der Glyceroldehydratase von *C. pasteurianum*

3.3.1.1 Gendeletion in *C. pasteurianum* mittels ClosTron-Mutagenese

Methoden zur Gendeletion sind bisher in *C. pasteurianum* wenig etabliert. Einige erfolgreiche Deletionen konnten mit Hilfe der ClosTron-Methode in diesem Stamm erzielt werden [95, 97]. Daher wurde zunächst diese Methode gewählt, um das Gen *dhaB*, welches für die große Untereinheit der Glyceroldehydratase codiert, auszuschalten. Aus den verfügbaren modularen ClosTron-Shuttleplasmiden wurde für *C. pasteurianum* das Plasmid pMTL007C-E2 ausgewählt. Wichtige Komponenten dieses Vektors sind der grampositive pCB102-Replikationsursprung, das Chloramphenicol-/ Thiamphenicol (*catP*)-Resistenzgen als Plasmid-Selektionsmarker, das Erythromycin (*erm*)-Resistenzgen als Intron-Selektionsmarker und der konstitutive *fdx*-Promotor von *C. sporogenes*. Das Intron-codierte Protein LtrA ist im Vektor-Backbone enthalten. Die Intron-Sequenz wurde mit Hilfe des ClosTron-Intron-Design-Tools (www.clostron.de) speziell für die Integration in das Gen *dhaB* designt. Dabei wurde innerhalb des Gens die Position 519-520 des codogenen DNA-Stranges zur Integration ausgewählt, da diese die höchste Wahrscheinlichkeit einer Integration des Introns aufweist und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Zerstörung des Gens zur Folge hat. Das resultierende Plasmid pMTL007C-E2 Cpas_dhaB-519-520s wurde von der Firma DNA2.0 synthetisiert und per Sequenzierung überprüft.

Ergebnisse

Die Transformation mit dem Gruppe-II-Intron-Vektor pMTL007C-E2 Cpas_dhaB-519-520s blieb wiederholte Male ohne Erfolg. Es ist bekannt, dass dieser Vektor Restriktions-schnittstellen der CpaAII-Endonuklease von *C. pasteurianum* enthält [95]. Möglicherweise wird die Transformation mit diesem Plasmid durch einen CpaAII-Verdau verhindert. Die CpaAII-Schnittstellen liegen in dem *ltrA*-Gen, welches einen essentiellen Bestandteil der ClosTron-Methode darstellt. In einem Fall, in dem die ClosTron-Methode erfolgreich bei *C. pasteurianum* angewendet worden war, wurde das Shuttleplasmid pSYCP verwendet, in dem durch stille Mutationen alle CpaAII-Schnittstellen entfernt worden waren [95]. Die Transformation des Plasmids pSYCP wurde daher in dieser Arbeit ebenfalls getestet, blieb allerdings ebenfalls ohne Erfolg.

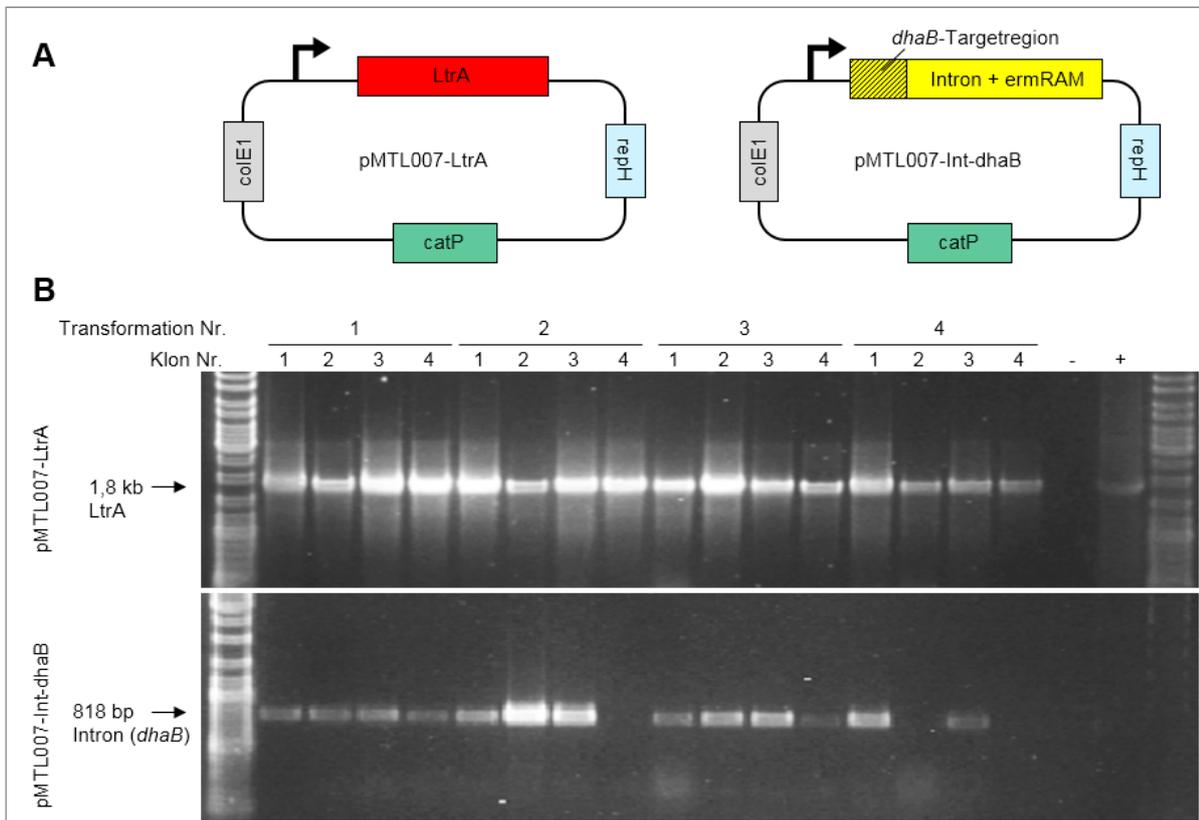


Abb. 22: Transformation von *C. pasteurianum* mit ClosTron-Splitvektoren zur Deletion des Glyceroldehydratasegens *dhaB*. A: Schematische Darstellung der ClosTron-Vektoren zur Deletion von *dhaB*. *catP* = Chloramphenicol-/Thiamphenicol-Resistenzgen; *colE1* = gram-negativer Replikationsursprung; *repL* = gram-positiver Replikationsursprung; *LtrA* = Intron-codiertes Protein; *ermRAM* = Erythromycin-Resistenzgen. B: Kolonie-PCR zur Überprüfung des Erfolgs der Transformation der Vektoren pMTL007-LtrA sowie pMTL007-Int-dhaB. - = Kolonie-PCR von nicht-transformiertem Klon; + = PCR mit pMTL007-LtrA bzw. pMTL007-Int-dhaB als Template.

Im Rahmen zahlreicher Transformationsversuche mit verschiedenen Plasmiden war aufgefallen, dass die Plasmidgröße einen entscheidenden Einfluss auf die Transformationseffizienz von *C. pasteurianum* besitzt. So ließen sich Vektoren mit einer Größe von 3-5 kb problemlos transformieren; bei größeren Plasmiden war die Transformationseffizienz stark beeinträchtigt, Plasmide über 8-9 kb ließen sich überhaupt nicht transformieren. Ein Zusammenhang von Plasmidgröße und Transformationseffizienz war auch bei anderen Mikroorganismen beobachtet worden [85, 118]. Da das Plasmid pMTL007C-E2 Cpas.dhaB-519-520s und auch pSYCP größer als 8 kb sind, könnte der fehlende Erfolg der Transformation in der Plasmidgröße begründet sein. Um zu testen, ob eine Deletion von *dhaB* durch die Verwendung kleinerer Vektoren erreicht werden kann, wurden Split-Vektoren generiert: Ein Vektor enthielt lediglich die *ltrA*-Sequenz von pSYCP (mit mutierten CpaAII-Schnittstellen), der zweite Vektor enthielt das Gruppe II-Intron mit der Targetsequenz für *dhaB*. Die Ko-Transformation der beiden Vektoren war bereits im ersten Versuch erfolgreich. Jeweils vier Klone von vier unabhängigen Transformationen wurden mittels Kolonie-PCR getestet: Alle getesteten Klone enthielten das LtrA-Plasmid, 13 der 16 Klone enthielten beide Plasmide (Abb. 22).

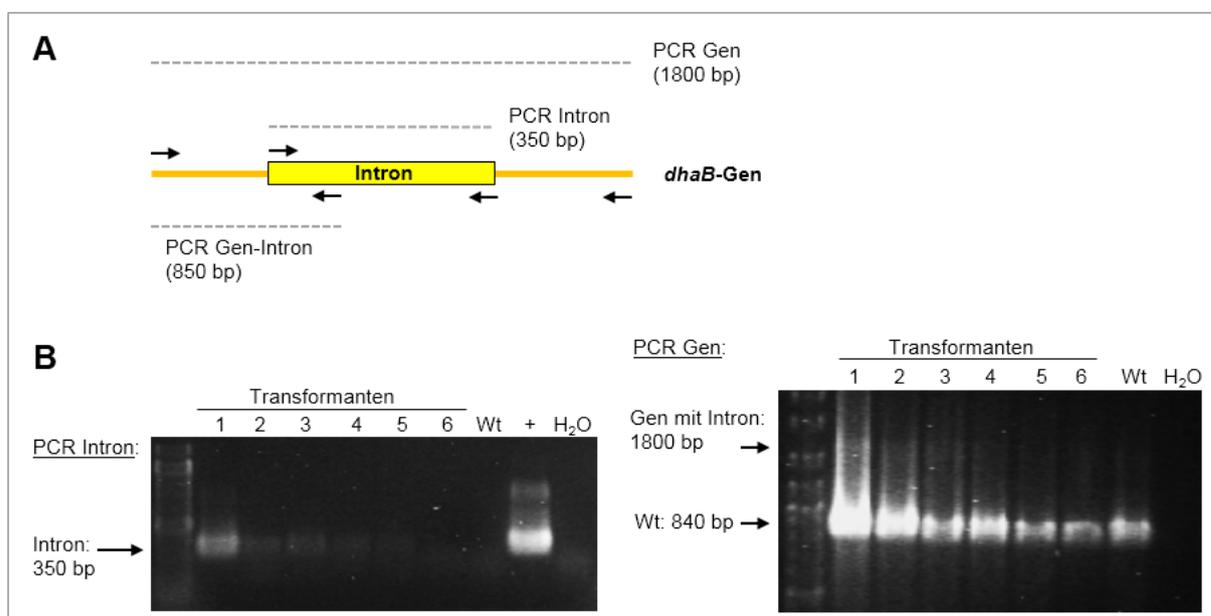


Abb. 23: Test der *C. pasteurianum*-ClosTron-Transformanten auf Intron-Integration in das Gen *dhaB*. A: Schematische Darstellung der durchgeführten PCRs zum Test auf Intron-Integration. B: PCR (Intron und *dhaB*-Gen) von genomischer DNA der Transformanten. Wt = PCR mit Wildtyp-DNA als Template; + = PCR mit Plasmid pMTL007-Int-dhaB als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle.

Zur Selektion auf Integration des Gruppe II-Introns wurden diejenigen Klone, die beide Plasmide enthielten, auf Erythromycin-Thiamphenicol-Agarplatten gestrichen. Eine erfolgreiche Integration des Introns in das Genom von *C. pasteurianum* sollte durch das im Intron enthaltene *erm*RAM in Erythromycin-resistenten Klonen resultieren. Vereinzelt erythromycinresistente Klone wurden erhalten; diese wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Introns getestet. Wie in Abb. 23 zu sehen, war das Gruppe II-Intron in vier von sechs Klonen vorhanden. In einer PCR mit die Integrationsstelle des *dhaB*-Gens flankierenden Primern konnte allerdings lediglich die Wildtypbande detektiert werden. Eine weitere PCR mit einem Primer, welcher im *dhaB*-Gen bindet sowie einem zweiten Primer, der im Intron selbst bindet, zeigte keine Banden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Transformation der *dhaB*-Deletionsvektoren erfolgreich war und in einzelnen Fällen eine Integration des Gruppe II-Introns in das Genom von *C. pasteurianum* stattgefunden hat, jedoch nicht im Bereich des *dhaB*-Gens.

3.3.1.2 Gendeletion in *C. pasteurianum* mittels CRISPR-Cas

Eine alternative Methode für die Deletion von Genen stellt das CRISPR-Cas-System dar. Dieses System wurde bereits für verschiedene Mikroorganismen, darunter einige Clostridienstämme, erfolgreich angewendet. Es wurde gezeigt, dass die Cas9-Nuklease des Typ II-CRISPR-Systems durch ihre Toxizität für *C. pasteurianum* nicht geeignet ist um eine ausreichende Transformationseffizienz zu erzielen [93]. Mit Hilfe des endogenen Typ I-CRISPR-Systems konnte hingegen eine Gendeletion erreicht werden [93]. Daher wurde das endogene Typ I-CRISPR-System für die Deletion von *dhaB* ausgewählt.

Das Design des Typ I-CRISPR-*dhaB*-Deletionsvektors ist in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Wichtige Bestandteile des Vektors sind die Promotor-(5'-) und 3'-Region des CRISPR-Arrays sowie ein von *repeats* flankierter, *dhaB*-spezifischer Protospacer. Außerdem enthält der Vektor ein Reparaturtemplate, bestehend aus zwei 1 kb-Homologiesequenzen, welche der DNA-Sequenz *upstream* und *downstream* der zu deletierenden *dhaB*-Sequenz entsprechen (Abb. 24 A). Die Transformation von *C. pasteurianum* mit dem 5,7 kb großen Plasmid pMTL85141-CRISPR-*dhaB* war in zwei von vier Transformationsversuchen erfolgreich; bei insgesamt zwei von 16 getesteten Klonen konnte die Vektor-spezifische Bande in der Kolonie-PCR nachgewiesen werden (Abb. 24 A). Von diesen Klonen wurde die genomische DNA extrahiert und im Hinblick auf die Deletion von *dhaB* analysiert. Dazu

wurden jeweils PCRs der 3'- und 5'-Grenzen des zu deletierenden Bereiches sowie eine PCR mit flankierenden Primern durchgeführt (Abb. 24 B). 5'- und 3'-Bereich der zu deletierenden Sequenz konnten amplifiziert werden, außerdem war bei beiden Klonen die *dhaB*-Wildtypbande zu sehen. Die Deletion von *dhaB* durch Ausnutzung des endogenen Typ I-CRISPR-Systems war nicht erfolgreich. Wiederholte Versuche sowie ein Anreicherungs-Protokoll zur Verlängerung der Zeit für die homologe Rekombination [134] führten ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis.

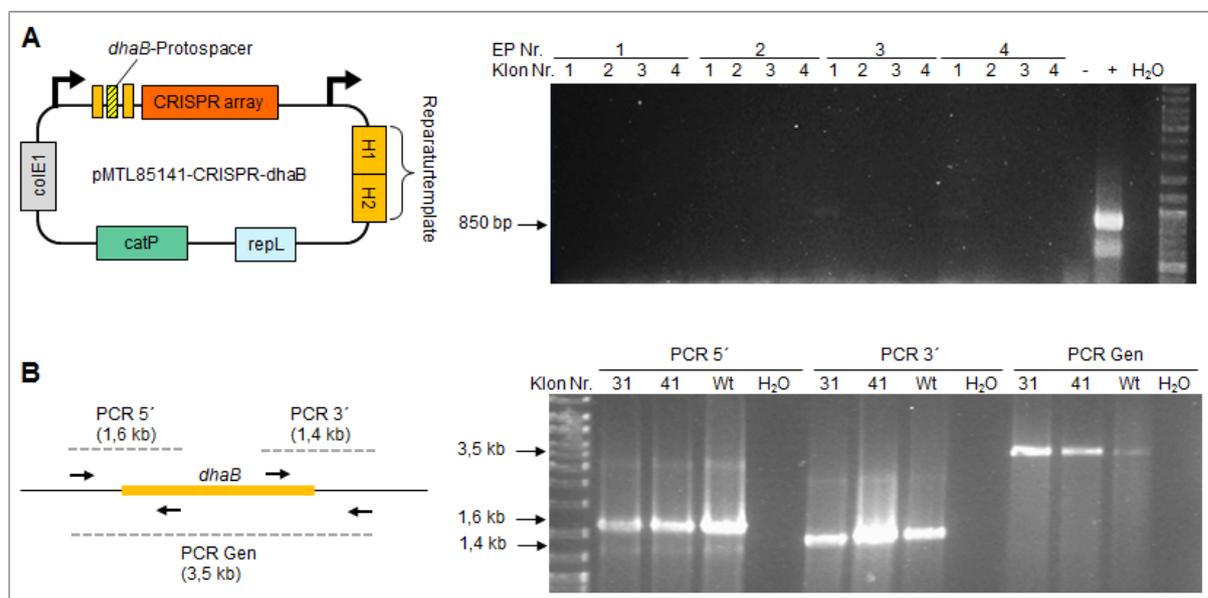


Abb. 24: Transformation von *C. pasteurianum* mit Typ I-CRISPR-Plasmid zur Deletion des Glyceroldehydratasesgens *dhaB*. A: Schematische Darstellung des Typ I-CRISPR-Plasmids pMTL85141-CRISPR-dhaB und Kolonie-PCR zur Überprüfung des Erfolgs der Transformation. *catP* = Chloramphenicol-/Thiamphenicol-Resistenzgen; *colE1* = gram-negativer Replikationsursprung; *repL* = gram-positiver Replikationsursprung; H1, H2 = 1 Kb-Homologiesequenzen *upstream* und *downstream* der Targetregion; - = PCR von nicht-transformiertem Klon; + = PCR mit Plasmid pMTL85141-CRISPR-dhaB als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle. B: PCR von genomischer DNA der Transformanten zum Test auf *dhaB*-Deletion. Wt = PCR mit Wildtyp-DNA als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle.

Parallel zum endogenen Typ I-CRISPR-System wurde eine weitere Gendelektionsmethode getestet, welche auf der Typ II-CRISPR-Cas9-Nickase basiert [64]. Durch Deletion einer Nuklease-Domäne kann das Enzym Cas9 in eine Nickase umgewandelt werden; dieses erzeugt einen DNA-Einzelstrangbruch (*nick*) anstelle eines Doppelstrangbruches und ist somit weniger toxisch für die Zelle. In Kombination mit einem DNA-Template für die Reparatur des Einzelstrangbruches ermöglicht diese Methode die Genomeditierung von Stämmen, die für eine Cas9-Nuklease-Behandlung nicht geeignet sind [64].

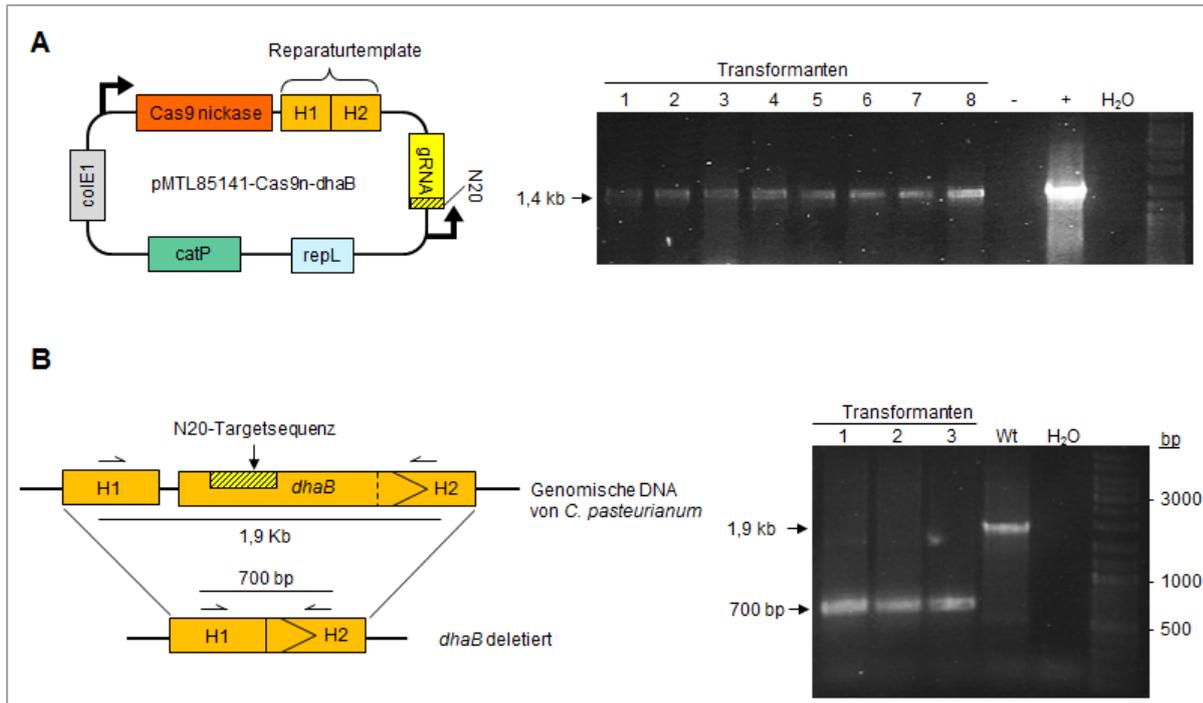


Abb. 25: Deletion des Glyceroldehydratasegens *dhaB* in *C. pasteurianum* R525. A: Schematische Darstellung des Deletionsvektors pMTL85141-Cas9n-dhaB und Kolonie-PCR zur Überprüfung des Erfolgs der Transformation. *catP* = Chloramphenicol-/Thiamphenicol-Resistenzgen; *colE1* = gram-negativer Replikationsursprung; *repL* = gram-positiver Replikationsursprung; H1, H2 = 1 Kb-Homologiesequenzen *upstream* und *downstream* der Targetregion; - = PCR von nicht-transformiertem Klon; + = PCR mit Plasmid pMTL85141-Cas9n-dhaB als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle. B: Schematische Darstellung der erzeugten Mutation und PCR von genomischer DNA zum Test auf Vorhandensein der Deletion. Wt = PCR mit Wildtyp-DNA als Template; H₂O = Nicht-Template-Kontrolle.

Die Generierung des *dhaB*-Deletionsvektors pMTL85141-Cas9n-dhaB ist in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Durch das Design des Reparaturtemplates wurde die zu deletierende Genomsequenz festgelegt. Sie wurde so gewählt, dass die Promotorregion sowie der größte Teil des *dhaB*-Gens vom 5'-Ende aus deletiert wurde. Ein Teil des 3'-Endes von *dhaB* blieb erhalten, da sich in diesem Bereich auf dem komplementären DNA-Strang ein weiteres Gen befand, welches nicht deletiert werden sollte. Die 20 Nukleotid (N20)-Targetsequenz wurde so gewählt, dass sie selektiv nur im *dhaB*-Gen vorkommt, um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden. Die Transformation von *C. pasteurianum* R525 mit dem *dhaB*-Deletionsvektor resultierte in einer großen Anzahl an Transformanten. Per Kolonie-PCR konnte das Vorhandensein des Vektors bestätigt werden (Abb. 25 A). Von drei Transformanten wurde die genomische DNA extrahiert; mittels PCR mit flankierenden Primern wurde das Genom auf das Vorhandensein des Gens *dhaB* getestet. Alle getesteten Klone wiesen eine Bande bei 700 bp auf, welche eine erfolgreiche Deletion anzeigt (Abb. 25

B). Mittels Sequenzierung der PCR-Produkte wurde die erfolgreiche Deletion von *dhaB* bestätigt.

3.3.2 Charakterisierung der *C. pasteurianum-dhaB*-Mutante

Die *dhaB*-Deletionsmutante wurde im Bioreaktor auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat kultiviert und im Vergleich zum Wildtypstamm R525 charakterisiert. Das Wachstum der *dhaB*-Deletionsmutante war durch eine deutlich verlängerte *lag*-Phase gekennzeichnet (Abb. 26 D). In der exponentiellen Phase war die Wachstumsrate (μ_{\max}) mit 0,335 dagegen höher als die des Wildtyps, welcher eine Wachstumsrate von 0,256 aufwies (Tab. 22). 1,3-PDO wurde zu keinem Zeitpunkt gemessen: Die 1,3-PDO-Produktion war erfolgreich eliminiert. Stattdessen war die Butanolproduktion mit 14,4 g/l im Vergleich zum Wildtyp mit 7,6 g/l fast verdoppelt (Abb. 26 E und Tab. 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Fermentation der *dhaB*-Deletionsmutante

	R525	dhaBmut + Glukose	dhaBmut - Glukose
max. Wachstumsrate (μ_{\max})	0,256	0,335	0,199
Biomasse (g/l)	6,7	5,43	2,69
1,3-PDO (g/l)	17,01	0,00	0,00
Butanol (g/l)	7,6	14,4	9,46
Ethanol (g/l)	0,00	0,00	2,58
Butyrat (g/l)	5,64	2,97	0,00
Glycerolverbrauch (g/l)	61,12	53,77	40,27
C-Wiederfindung	0,9551	0,828	0,851

Die Säureproduktion der *dhaB*-Mutante war insgesamt verringert. Während Acetat, Laktat und Formiat in annähernd gleichen Mengen produziert wurden wie beim Wildtyp, war die Butyratproduktion deutlich geringer (Abb. 26 F). Interessanterweise war die gemessene Butyratmenge in der späten Phase der Fermentation, nach Verbrauch der Glukose, abnehmend. Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine Fermentation auf Glycerol-Monosubstrat durchgeführt.

Bei der Glycerol-Monosubstratfermentation war keine Butyratbildung detektierbar (Abb. 26 I). Alle anderen Säuren wurden in ähnlichen Mengen gebildet wie auf Cosubstrat. Hinsichtlich der Alkohole war auch hier keine 1,3-PDO-Produktion zu messen; zusätzlich zu Butanol wurde interessanterweise Ethanol produziert (Abb. 26 H).

Die Butanolausbeute der *dhaB*-Mutante betrug 0,371 bzw. 0,385 mol/mol bei der Verwendung von Cosubstrat bzw. Glycerol-Monosubstrat. Die Ausbeuten des Wildtypstammes betragen 0,228 bzw. 0,292 mol/mol (Abb. 28). Die Butanolausbeute war somit durch die Blockierung der 1,3-PDO-Produktion signifikant erhöht.

Bei der Analyse der C-Verteilung fiel auf, dass bei allen Fermentationen mit der *dhaB*-Mutante ein hoher Anteil an Kohlenstoff nicht in den Produkten wiederzufinden war (Tab. 22 und Abb. 27).

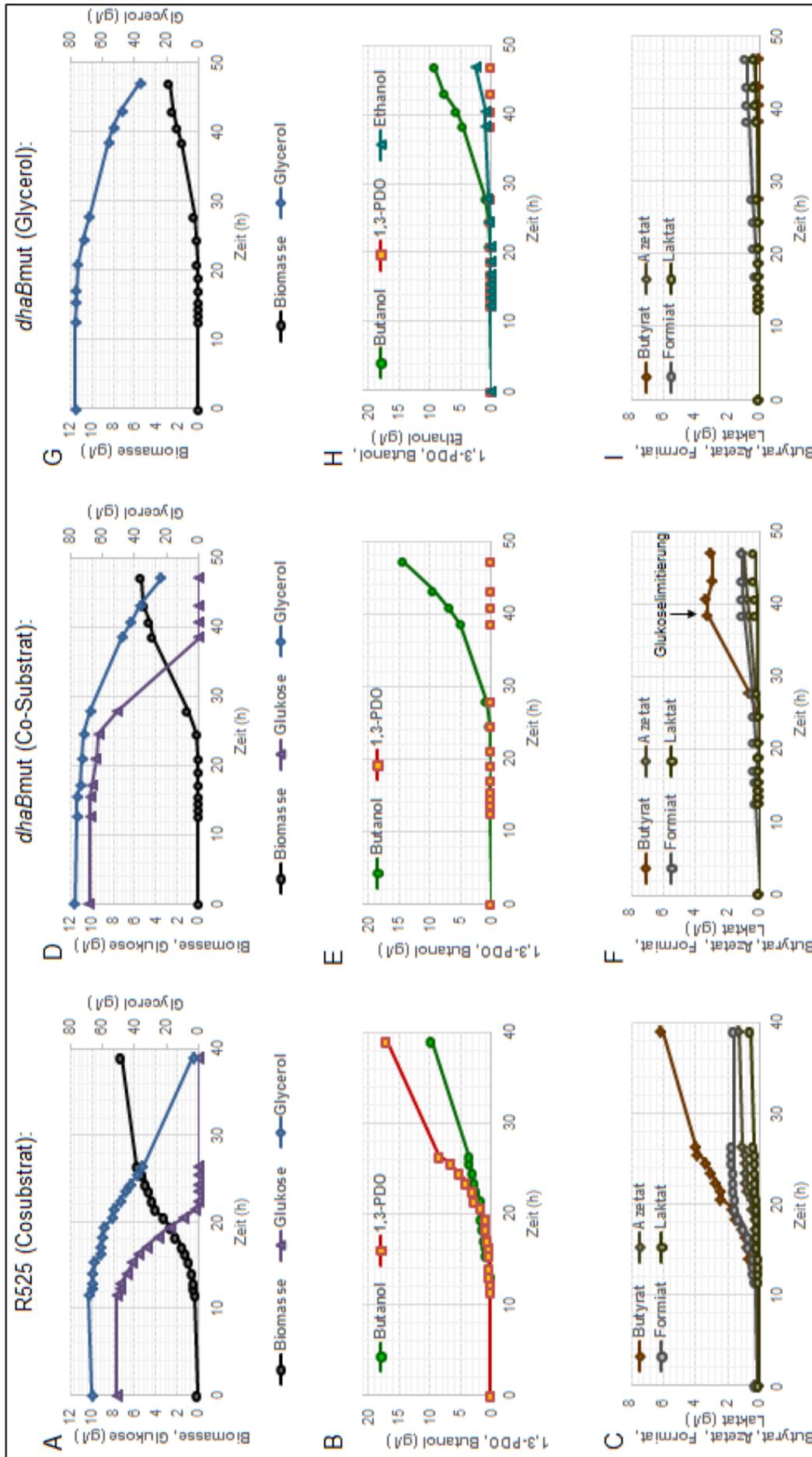


Abb. 26: Ergebnisse der Fermentation der *C. pasteurianum-dhaB*-Mutante auf Cosubstrat und Glycerol-Monosubstrat im Vergleich zum Wildtypstamm R525.

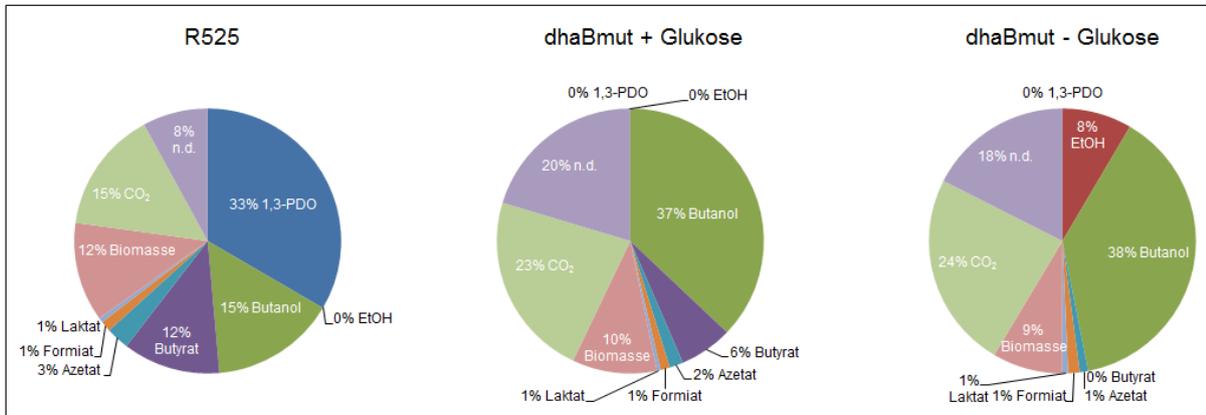


Abb. 27: Kohlenstoffverteilung der Fermentationen mit der *C. pasteurianum*-*dhaB*-Mutante (*dhaBmut*) auf Cosubstrat und Glycerol-Monosubstrat im Vergleich zum Wildtypstamm R525. EtOH = Ethanol; n. d. = nicht detektiert.

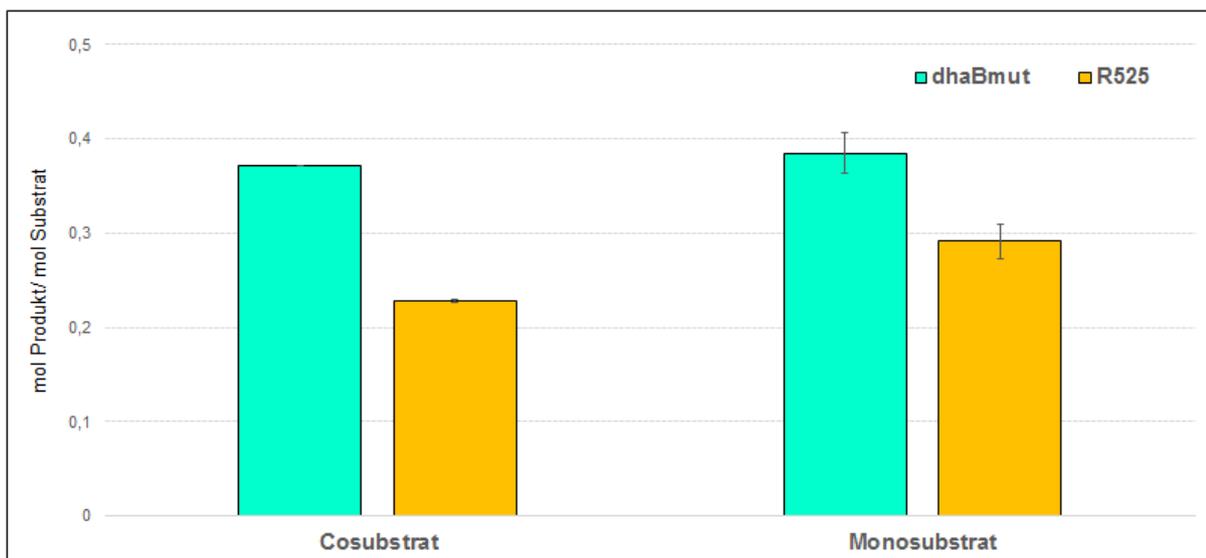


Abb. 28: Butanolausbeute der *C. pasteurianum*-*dhaB*-Mutante (*dhaBmut*) im Vergleich zum Wildtypstamm R525 auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat sowie Glycerol-Monosubstrat (n = 2).

3.3.2.1 Wachstum der *C. pasteurianum-dhaB*-Mutante auf Glycerol

Auf Grund der langen *lag*-Phase der *dhaB*-Mutante war bei den Fermentationen mit diesem Stamm Hefeextrakt schrittweise bis zu einer finalen Konzentration von 5 g/l zugegeben worden, um das Wachstum zu unterstützen. Hefeextrakt enthält eine Reihe von Nährstoffen - Vitamine, Spurenelemente, Stickstoff, Aminosäuren u. a. - in schwankenden Anteilen [119]. Darüber hinaus wird diskutiert, dass Hefeextrakt einen Einfluss auf das Redoxgleichgewicht sowie die Produktverteilung hat [121, 78, 108]. Durch die Verwendung von Hefeextrakt werden somit undefinierte Bedingungen geschaffen, deren Einflüsse nicht eindeutig zu bestimmen sind. Für eine bessere Reproduzierbarkeit wäre es wünschenswert, die Kultivierung ohne zusätzliche Gabe von Hefeextrakt durchführen zu können. Eine alternativer Ansatzpunkt für die Optimierung der Kultivierung stellt das Inokulum dar. In der Tat war bei den Vorkulturen, welche in 50 ml-Anaerobflaschen kultiviert wurden, keine Wachstumsverzögerung beobachtet worden. Daher sollte getestet werden, ob das Wachstum der *dhaB*-Mutante im Bioreaktor durch Optimierung des Protokolls für die Generierung der Vorkulturen verbessert werden kann.

Wie in Abbildung 29 A zu sehen, konnte die *lag*-Phase durch Änderung der Vorkulturzeiten von 24 auf 12 Stunden deutlich verkürzt werden: Die Zellen starteten unmittelbar nach Inokulation des Bioreaktors mit der Produktion von Biomasse. Zwischen 10 und 20 Stunden war allerdings ein Wachstumsstopp zu beobachten, welcher mit einer Verzögerung im Absinken des Redoxpotentials einherging. Nach ca. 20 Stunden war ein Redoxpotential von - 600 mV erreicht und die Zellen zeigten eine zweite Wachstumsphase. Insgesamt wurde eine Biomasse erreicht, die mit der von Wildtyp-Fermentationen vergleichbar war (3,5 g/l) und das Substrat wurde vollständig verbraucht.

Mit dem optimierten Vorkulturprotokoll wurde eine Fermentation in Biobl-Medium mit Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle ohne Zugabe von zusätzlichem Hefeextrakt durchgeführt. Bei dieser Fermentation war ebenfalls eine stark verkürzte *lag*-Phase sowie ein zweiphasiges Wachstum zu beobachten (Abb. 29 B). Die zweite Wachstumsphase begann in diesem Fall erst nach ca. 35 Stunden; zu diesem Zeitpunkt war erst ein Redoxpotential von - 600 mV erreicht. Nach 50 Stunden war eine Biomasse von 3 g/l erreicht. Das Substrat wurde bei dieser Fermentation nicht vollständig verbraucht.

Insgesamt war eine negative Korrelation zwischen Redoxpotential und Wachstum zu beobachten (Abb. 29 A - C). Der direkte Vergleich der Wachstumskurven unter den verschiedenen Bedingungen (Abb. 29 D) zeigt, dass die Optimierung des Inokulums der

Ergebnisse

entscheidende Faktor für die Verkürzung der *lag*-Phase ist, wohingegen die Zugabe von Hefeextrakt zu einem schnelleren Absinken des Redoxpotentials auf - 600 mV führt, was zu einem beschleunigten Wachstum führt, die finale Biomassekonzentration jedoch nicht beeinflusst.

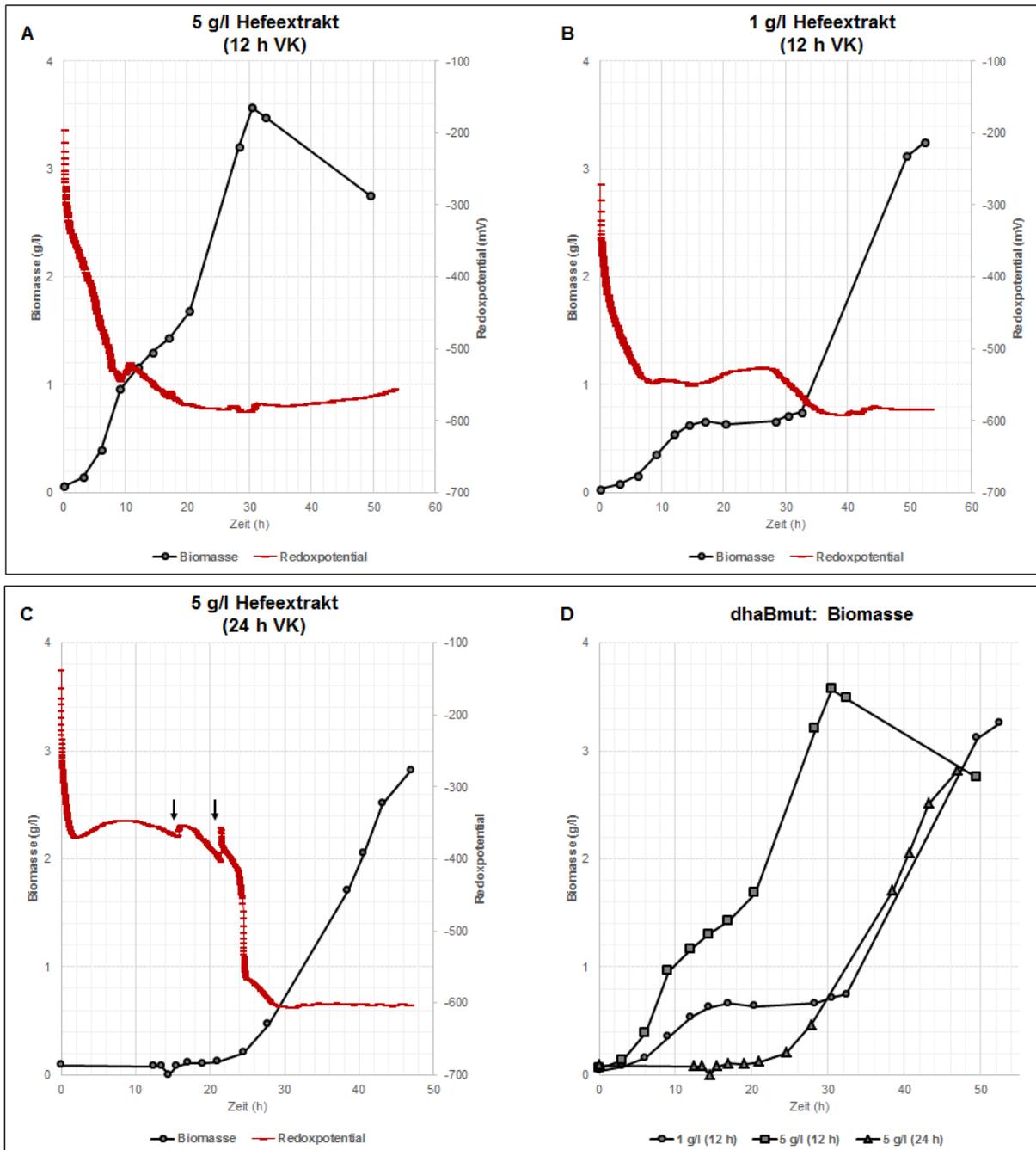


Abb. 29: Wachstum der *C. pasteurianum-dhaB*-Mutante auf Glycerol-Monosubstrat mit unterschiedlichen Konzentrationen von Hefeextrakt und optimierter Vorkultur. A - C: Biomasseproduktion in Korrelation zum Redoxpotential; D: Vergleich der Biomasseproduktion bei unterschiedlicher Konzentration von Hefeextrakt sowie unterschiedlichen Vorkulturzeiten. VK = Vorkultur. Pfeile = Zeitpunkte der Zugabe von Hefeextrakt.

3.3.2.2 Komplementierung der Deletion von *dhaB* in *C. pasteurianum*

Um sicherzugehen, dass die beobachteten Unterschiede zwischen *dhaB*-Mutante und Wildtyp durch die eingeführte Mutation verursacht wurden, wurde ein Revertantenstamm basierend auf der *dhaB*-Mutante kreiert, in dem die *dhaB*-Deletion durch genomische Integration der zuvor deletierten Sequenz komplementiert wurde. Die Generation der Revertante erfolgte analog zu der der *dhaB*-Mutante durch Transformation mit dem Plasmid pMTL85141-*dhaB*-compl. Die Fermentation der Revertante im Vergleich zur *dhaB*-Mutante und zum Wildtyp R525 zeigte, dass das Wachstumsverhalten und die Produktbildung der des Wildtyps entsprachen (Abb. 30). Die bei der *dhaB*-Mutante beobachteten Charakteristika sind somit auf die Deletion von *dhaB* zurückzuführen.

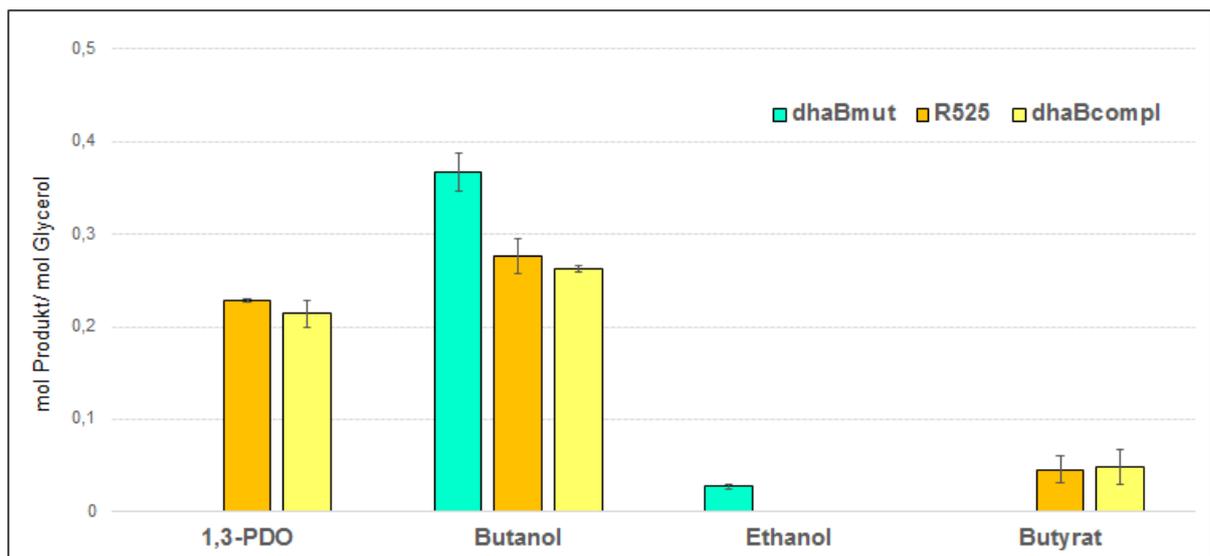


Abb. 30: Ergebnisse der Fermentation der *C. pasteurianum*-*dhaB*-Revertante (*dhaB*compl) im Vergleich zur Deletionsmutante (*dhaB*mut) und zum Wildtypstamm R525. Dargestellt sind die Ausbeuten der Hauptprodukte 1,3-PDO, Butanol, Ethanol und Butyrat. Die Fermentation erfolgte über 48 h in 50 ml-Anaerobflaschen (n = 2).

4 Diskussion

4.1 Transformation von *C. pasteurianum* und Generierung des elektrokompetenten R525-Stammes

Für Clostridien werden hauptsächlich zwei Methoden für den DNA-Transfer verwendet: Konjugation und Elektrotransformation [4, 87, 36, 94, 48, 117]. Beide Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet um herauszufinden, welche Technik die besten DNA-Transferraten für *C. pasteurianum* liefert.

Mittels Konjugation konnte keine reproduzierbare Transformation von *C. pasteurianum* mit Plasmid-DNA erreicht werden. Die Methode der Konjugation hat insbesondere den Vorteil, dass die Barriere der Zellwand umgangen wird. Wäre die Zellwand das wichtigste Hindernis für die Transformation von *C. pasteurianum*, wäre diese Methode der Elektroporation gegenüber vermutlich überlegen. Die Tatsache, dass dies nicht der Fall ist, lässt vermuten, dass die Zellwand nicht die primäre Barriere für den DNA-Transfer darstellt. Die Elektroporation nach dem Protokoll von [94] war erfolgreich, allerdings mit deutlich geringerer Transformationseffizienz. Neben der Solubilisierung der Zellwand und der Methylierung der zu transferierenden DNA war es bei der Elektroporation von Bedeutung, sporulierte, hitzeschockaktivierte Zellen für die Transformation zu verwenden [94]. Während der Sporulation wird eine Vielzahl von Genen differentiell exprimiert [114]. Diese Unterschiede in der Genexpression könnten für die Aufnahme von Fremd-DNA eine Rolle spielen. Die sporulierten Zellen wurden vor der Verwendung für die Transformation durch Hitzeschock aktiviert; die Hitzeschock-Behandlung könnte neben der Stimulation der Germination weitere Effekte hervorrufen. Für *E. coli* und *Salmonella* wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Hitzebehandlung vor der Transformation durch temporäre Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen zu erhöhten DNA-Transferraten führt [34].

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird allgemein als Hindernis für die Transformation von *C. pasteurianum* angesehen, da dieser Effekt auch bei anderen Clostridienstämmen beobachtet worden war [77, 35, 94, 6, 48, 57, 100]. Jedoch wurde weder bei der Konjugation noch bei der Elektroporation durch die Methylierung der CpaI- und CpaAI-Erkennungssequenzen der zu transferierenden Plasmide eine effiziente Transformation ermöglicht. Es ist möglich, dass weitere, bisher nicht identifizierte Endonukleasen in *C. pasteurianum* aktiv sind, deren Erkennungssequenz nicht methyliert wurde und

die somit ungehindert die eindringende Fremd-DNA degradieren konnten. Ebenso ist es möglich, dass noch völlig andere Faktoren für die Transformationseffizienz von *C. pasteurianum* eine Rolle spielen.

Die Elektroporation ist die Transformationsmethode der Wahl insbesondere für gram-positive Bakterien, da sie im Vergleich zu anderen DNA-Transfertechniken eine relativ harsche Methode darstellt. Mittels Elektroporation können DNA-Transferraten von 10^9 - 10^{10} erzielt werden [6]; *C. pasteurianum* zeigt deutlich geringere Raten. Als Grund dafür war v. a. das Vorhandensein teilweise uncharakterisierter Restriktions-Modifikationssysteme vermutet worden [100, 94]. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen, in Übereinstimmung mit einigen neueren Studien, darauf hin, dass es andere Mechanismen sind, die für die Kompetenz von *C. pasteurianum* maßgeblich verantwortlich sind.

Tabelle 23: Mutationen von *C. pasteurianum*-Stämmen mit gesteigerter Transformationseffizienz

Gen	Protein	Funktion	Mutation	Referenz
CLPA_c15890	Transposase	Nukleotidyltransferase	Alanin-Insertion in DNA-Bindedomäne	diese Arbeit
CLPA_c26240	Hypothetisches Protein	Prognostiziertes integrales Membranprotein	Alanin-Valin-Substitution in Nicht-Transmembrandomäne	diese Arbeit
CLPA_c13710	β -Lysin-N6-Azetyltransferase	Lysindegredation	Frameshift - Trunkiertes Protein	[108]
CLPA_c33080	Histidinkinase	<i>Quorum sensing</i>	Frameshift - Trunkiertes Protein	[108]
CLPA_c30550	SMC-Protein (<i>structural maintenance of chromosome</i>)	Chromosomendynamik	Phenylalanin-Valin-Substitution	[39]

Die in dieser Arbeit beobachteten Probleme bei der Reproduktion der Transformationseffizienz von Pyne et al. [94] wurden von anderen Forschern bestätigt [108]. Für das *metabolic engineering* von *C. pasteurianum* war es daher unverzichtbar, zunächst einen Stamm zu generieren, der die Fähigkeit besitzt, DNA mit erhöhter Effizienz aufzunehmen.

Der durch Selektion erhaltene, elektrokompetente *C. pasteurianum*-R525-Stamm unterscheidet sich vom weniger kompetenten Wildtypstamm genotypisch durch zwei Mutationen: Eine Mutation betrifft die DNA-bindende Domäne einer Transposase, die zweite Mutation ist im nicht-helikalen Bereich eines hypothetischen Membranproteins lokalisiert. Transposasen sind durch eine Nukleotidyltransferaseaktivität charakterisiert, welche Chromosomen- bzw. Genom-Rearrangements, Mutationen sowie Veränderungen der DNA-Dosis in der Zelle zur Folge haben können. Die Mutation in der DNA-Bindungsdomäne der Transposase beeinflusst möglicherweise die Bindungsaffinität des Proteins. Eine Inhibition der DNA-bindenden Funktion des Enzyms würde dessen Transposaseaktivität ausschalten. Eine verstärkte Bindungsaffinität könnte dessen Arbeit ebenfalls behindern, da die Integration der transferierten Nukleotide an anderer Stelle des Genoms erschwert wäre. Über die Bedeutung der Mutation des prognostizierten Transmembranproteins lassen sich nur Vermutungen anstellen, da dessen Funktion bisher nicht bekannt ist. Im Hinblick auf die Kompetenz des Stammes ist vorstellbar, dass die Mutation des Transmembranproteins die Zellwandstruktur in einer Weise verändert hat, die diese für DNA-Moleküle durchlässiger macht.

Mit Hilfe des Protokolls von Schwarz et al. [108] wurden inzwischen mehrere *C. pasteurianum*-Stämme mit erhöhter Transformationseffizienz generiert (Tab. 23). Die Sequenzierung des Genoms dieser Stämme zeigte, dass die Mutationen, welche diese Stämme vom schwer transformierbaren Wildtyp unterscheiden, nicht, wie bisher vermutet, die Restriktionsendonukleasen betreffen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen im R525-Stamm weisen nicht auf eine direkte Beeinflussung der Restriktionsendonukleasen hin. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, welche Mechanismen in *C. pasteurianum* darüber hinaus für einen effizienten DNA-Transfer maßgeblich sind. In zwei von vier Stämmen wurden Mutationen der SMC-Proteine gefunden. In den beiden anderen Stämmen waren jeweils zwei Mutationen vorhanden, sodass nicht eindeutig zu sagen ist, welche der beiden betroffenen Gene für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Für die SMC-Proteine scheint eine Funktion für den DNA-Transfer in *C. pasteurianum* eindeutig zu sein. Proteine dieser Familie sind u. a. beteiligt an dynamischen chromoso-

malen Prozessen wie Rekombination, Dosiskompensation und DNA-Reparatur [39]. Der in dieser Arbeit generierte Stamm besitzt eine Mutation in einem Transposasegen; die Nukleotidyltransferaseaktivität der Transposase ist der Funktion der SMC-Proteine sehr ähnlich. Es ist zu vermuten, dass in diesem Stamm ein ähnlicher Mechanismus betroffen ist wie bei den Stämmen mit den mutierten SMC-Proteinen. Eine umfassende und detaillierte Analyse der Funktion der in den kompetenten Stämmen mutierten Gene könnte über die Mechanismen der Transformation von *C. pasteurianum* weiteren Aufschluss geben.

Die Kultivierung des R525-Stammes auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat ergab einige Unterschiede im Vergleich zum parentalen Stamm DSM 525. Während das Wachstum leicht reduziert war, waren die Alkohol- und Säureproduktion erhöht. Signifikante Unterschiede zeigten sich im Produktspektrum: Butanol wurde vermindert gebildet, die 1,3-PDO- und Butyratproduktion war dagegen stark erhöht. Während Wachstum und Produktion beim DSM 525-Stamm nach Glukoseverbrauch eingestellt wurden, waren beim R525-Stamm Biomasse- und Produktkonzentrationen weiterhin ansteigend. Möglicherweise ist die Anpassung des Metabolismus an den Wechsel der Kohlenstoffquelle beim R525-Stamm erleichtert. Alternativ kann der Zeitpunkt des Glukoseverbrauchs beim DSM 525-Stamm auch zufällig mit dem Beginn der stationären Phase zusammengefallen sein, da dieser Stamm in der ersten Phase der Fermentation einen aktiveren Metabolismus zeigte.

Die Produktion von Säuren spielt bei Cosubstratfermentationen mit Clostridien eine wichtige Rolle sowohl für die Generierung von ATP als auch für die Redoxbilanz [103]. Für *C. butyricum* konnte gezeigt werden, dass bei Kultivierung auf Glycerol-/Glukose-Cosubstrat der Glukosekatabolismus hauptsächlich dafür genutzt wurde Energie über die Acetat-/Butyrat-Produktion zu generieren, während Glycerol dafür verwendet wurde, Reduktionsäquivalente durch 1,3-PDO-Produktion zu verbrauchen [1]. Interessanterweise war beim R525-Stamm zu beobachten, dass nach Glukoseverbrauch weiterhin Butyrat produziert wurde, während der DSM 525-Stamm die Säureproduktion unmittelbar nach Glukoseverbrauch einstellte. Vermutlich wurde über die Butyratproduktion die für das Wachstum benötigte Energie in Form von ATP bereitgestellt. Ein Nebeneffekt der verstärkten Säureproduktion ist die vermehrte Bildung von Reduktionsäquivalenten. Die überschüssigen Reduktionsäquivalente, welche beim R525-Stamm während der verstärkten Säureproduktion generiert wurden (2 mol NADH_2 /mol Butyrat) wurden vermutlich für die 1,3-PDO-Produktion verwendet. Da der 1,3-PDO-Produktionsweg hinsichtlich des

Kohlenstoffflusses mit dem Butanol-Produktionsweg in Konkurrenz steht, lässt sich dadurch ebenfalls die geringe Butanolproduktion erklären.

Die beobachteten phänotypischen Unterschiede zwischen *C. pasteurianum* R525 und DSM 525 sind auf die Unterschiede im Genotyp zurückzuführen. Unklar bleibt, welche zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, ausgehend von den detektierten Mutationen, den beobachteten Phänotyp hervorrufen.

4.2 Die Funktion der Pyruvatcarboxylase für den Kohlenstoffmetabolismus von *C. pasteurianum*

Die Pyruvatcarboxylase nimmt eine zentrale Stellung im Kohlenstoffmetabolismus ein. Die Auswirkungen einer verminderten oder verstärkten Aktivität dieses Enzyms sind daher schwer vorauszusagen. Es war vermutet worden, dass eine Herunterregulation von PC für das verlangsamte Wachstum von *C. pasteurianum* unter Glukoselimitierung verantwortlich ist [104]. Diese Hypothese wurde nicht bestätigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen sogar einen gegenteiligen Trend: Die Überexpression der Pyruvatcarboxylase führt zu einer verminderten Metabolisierung von Glycerol und einem reduzierten Wachstum nach Glukoselimitierung (Tab. 21). Sabra et al. [104] hatten die beobachtete Wachstumsinhibierung nach Glukoselimitierung mit der Herunterregulation der Pyruvatcarboxylase korreliert. In der genannten Studie waren neben der Pyruvatcarboxylase weitere Gene gefunden worden, die in der glukoselimitierten Phase der Fermentation herunterreguliert waren. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass ein anderes Gen oder auch eine Kombination aus mehreren der differentiell regulierten Gene für die Wachstumsinhibierung verantwortlich sind.

Die PC-Mutante zeigte eine leicht veränderte Produktverteilung im Vergleich zum Wildtyp. Die Pyruvatcarboxylase-Reaktion ist ATP-abhängig und NADH-neutral, was insgesamt zu einem Anstieg des NADH₂-Pools führt. Die Verschiebung der NADH-Bilanz könnte zu den beobachteten Änderungen im Produktspektrum geführt haben. Da durch die Verschiebung des Kohlenstoffflusses in Richtung Citratzyklus ein verminderter Fluss zu Acetyl-CoA und zu den auf Acetyl-CoA basierenden Produkten stattfindet, muss ein alternativer Weg für die Regeneration von NAD gewählt werden. Bei der Produktion von 1,3-PDO und Laktat wird NAD gebildet. In der Tat waren sowohl 1,3-PDO als auch Laktat in Fermentationen mit der PC-Mutante erhöht.

Störungen des Redox-Gleichgewichtes können außerdem das Wachstum des Stammes negativ beeinflussen. Ein weiterer Grund für die geringere Wachstumsrate der PC-Mutante könnten die Energiekosten für die Überexpression von PC sowie für die katalysierte Reaktion sein, welche ATP-abhängig ist.

Im Hinblick auf die Funktion der Pyruvatcarboxylase ist zu berücksichtigen, dass diese durch ihre zentrale Position im Kohlenstoffmetabolismus zahlreichen Regulationen unterliegen muss, welche beispielsweise den Kohlenstoff je nach Stoffwechselsituation in Richtung Energieproduktion oder Generierung bzw. Abbau von Reduktionsäquivalenten leiten können. So wird ein hohes ATP-Level den Kohlenstofffluss in Richtung Citratzyklus fördern und ein niedriges ATP-Level wird diesen zugunsten einer vermehrten Säureproduktion hemmen. Die beobachteten Verschiebungen im Metabolismus der PC-Mutante können in diesem Zusammenhang als Kompromiss interpretiert werden, bei dem die Zelle versucht durch verstärkte Säureproduktion und vermindertes Wachstum den energieintensiven Kohlenstofffluss zum Citratzyklus auszugleichen und dabei durch ein verändertes Produktspektrum die $\text{NADH}_2/\text{NADH}$ -Balance zu halten.

Die Pyruvatcarboxylasereaktion geht mit der Fixierung von CO_2 einher. Durch die verstärkte PC-Aktivität kann angenommen werden, dass vermehrt CO_2 fixiert wird, was in einer gesteigerten Produktausbeute resultieren könnte. Tatsächlich war die gemessene CO_2 -Menge der PC-Mutante geringer als die errechnete, während sich für den Kontrollstamm errechnete und gemessene CO_2 -Menge deckten (Abb. 34). Eine vermehrte Produktausbeute wurde allerdings nicht erzielt. Unerwarteterweise war das Verhältnis von CO_2 zu H_2 bei der PC-Mutante zugunsten von CO_2 verschoben. Eine Entkopplung von CO_2 - und H_2 -Produktion kann im Metabolismus der *C. pasteurianum*-PC-Mutante an zwei Stellen erfolgen: durch die teilweise Umgehung der Pyruvat-Acetyl-CoA-Reaktion als Folge der PC-Überexpression oder durch verstärkte Nutzung des Ferredoxin-unabhängigen Weges in der Crotonyl-CoA-Butyryl-CoA-Reaktion. Eine detaillierte Stoffflussanalyse mit Messung der intrazellulären Metabolite könnte hier Aufschluss geben.

In anderen Bakterien wird die Pyruvatcarboxylase von der Kohlenstoffquelle reguliert. In *C. glutamicum* beispielsweise ist das Enzym nicht notwendig für das Wachstum auf Glukose, für die Verwendung von Laktat als Substrat ist es jedoch essentiell [92]. Ähnliche Regulationsmechanismen sind auch für *C. pasteurianum* vorstellbar. Falls die Pyruvatcarboxylase in *C. pasteurianum* für das Wachstum auf Glukose essentiell ist, für das Wachstum auf Glycerol jedoch nicht, würde dies zum Einen erklären, weshalb das En-

zym in der glukoselimitierten Phase herunterreguliert ist, und zum Anderen, weshalb eine Überexpression des Enzyms - insbesondere in der Glycerol-Monosubstratphase - nachteilig für das Wachstum des Stammes ist.

4.3 Gendeletion in *C. pasteurianum*

Die ClosTron-Methode ist die gängige Methode zur Gendeletion in Clostridien [25, 16, 140, 62, 69, 67, 95, 97]. Für *C. pasteurianum* ist die Anwendbarkeit dieser Methode limitiert. Durch die geringe Transformationseffizienz des Stammes ist insbesondere der Transfer von ClosTron-Vektoren erschwert. Die Vektoren sind relativ groß und enthalten Restriktionschnittstellen, welche von der Endonuklease CpaAII erkannt werden. Darüber hinaus stellt die geringe *retrohoming*-Effizienz des Gruppe II-Introns eine Limitierung für diese Methode dar. Bisher sind erst zwei Gendeletionen mit Hilfe dieser Methode in *C. pasteurianum* geglückt [95, 97]. In der ersten Studie wurde die Endonuklease CpaAI deletiert [95]. Dies war allerdings nur möglich, nachdem das *ltrA*-Gen des ClosTron-Shuttlevektors durch 98 stille Mutationen so verändert worden war, dass alle Erkennungssequenzen für die Endonuklease CpaAII entfernt worden waren. Außerdem war es notwendig, ein aufwändiges Anreicherungsprotokoll anzuwenden, um die *retrohoming*-Effizienz des Gruppe II-Introns zu steigern und einen reinen Mutantenklon zu erhalten. In der zweiten Studie [97] konnte das Gen *dhaT* von *C. pasteurianum* erfolgreich deletiert werden, jedoch war ein anschließendes Plasmid-Curing nicht möglich, was darauf hinweist, dass der unerwünschte Nebeneffekt einer ektopischen Integration des Introns in einem essentiellen Gen stattgefunden hat. In der Tat wurde das Gruppe II-Intron zusätzlich zu *dhaT* in dem Gen *speA* gefunden. Der Versuch der Deletion weiterer Gene des 1,3-PDO-Pathways blieb ohne Erfolg [97]. Die Autoren rieten selbst von der Verwendung der ClosTron-Methode für *C. pasteurianum* ab (M. Pyne, persönliche Kommunikation). Eine für *C. pasteurianum* besser geeignete Alternative zu finden ist für das effiziente *engineering* dieses Stammes von entscheidender Bedeutung.

Alternativ zur ClosTron-Methode wurde für die Genomeditierung von Clostridien eine Methode entwickelt, welche als *allele-coupled exchange* bezeichnet wird und auf homologer Rekombination beruht [42]. Da aufgrund der geringen Transformationseffizienz die Transformation von linearer DNA bei Clostridien nicht möglich ist, ist es notwendig, die zu integrierende DNA in Form von Plasmiden einzubringen, und damit einhergehend eine

Gegenselektion auf Klone, bei denen durch *single-crossover* das gesamte Plasmid integriert wurde. Die *allele-coupled exchange*-Methode setzt die Generierung einer Mutante voraus, welche durch Gegenselektion von der gewünschten Mutante unterschieden werden kann; somit ist diese Methode ebenfalls relativ aufwändig und langwierig.

In den letzten Jahren hat das CRISPR-Cas-System mehr und mehr an Bedeutung für die Genomeditierung, auch der von Bakterien, gewonnen [51, 65, 123, 84]. In den meisten Fällen wird das Typ II-CRISPR-Cas-System verwendet. Für *C. pasteurianum* wurde in einer Studie das endogene Typ I-System erfolgreich ausgenutzt, um das *cpaAI*-Gen zu deletieren [93]. Das *C. pasteurianum*-Typ IB-CRISPR-Cas-System ist jedoch bislang wenig charakterisiert. So ist beispielsweise nicht bekannt, wodurch die PAM-Sequenz dieses Systems charakterisiert und wo sie lokalisiert ist. Weitere Forschung ist hier notwendig, um die Grundlagen dieses Systems zu verstehen und zuverlässig für die Genomeditierung des Stammes einsetzen zu können. Das Typ II-CRISPR-Cas-System von *S. pyogenes* ist das am Besten charakterisierte und am Meisten verwendete CRISPR-Cas-System. Es ist durch das zentrale Molekül Cas9-Nuklease charakterisiert. Bedingt durch die Lethalität der Anwendung der Cas9-Nuklease bei vielen Bakterien ist diese nicht für alle Mikroorganismen geeignet. Eine weniger zytotoxische Alternative stellt die Cas9-Nickase dar. Eine Gendeletionsmethode basierend auf der Cas9-Nickase war, aufgrund der beschriebenen Limitierungen der anderen zur Verfügung stehenden Methoden, in dieser Arbeit die einzige Möglichkeit, das Gen *dhaB* in *C. pasteurianum* zu deletieren.

4.4 Deletion des 1,3-PDO-Weges in *C. pasteurianum*

Die Manipulation des 1,3-PDO-Produktionsweges wurde bereits in früheren Studien durchgeführt, indem das 1,3-PDO-Dehydrogenase-Gen *dhaT* deletiert wurde [97]. Dabei wurde beobachtet, dass die Deletion von *dhaT* die Produktion von 1,3-PDO zwar reduziert, jedoch nicht komplett ausschaltet. Außerdem wurde die Produktion von 1,2-PDO beobachtet. Ein zusätzliches Problem bei der Deletion der 1,3-PDO-Dehydrogenase könnte die Akkumulation des toxischen Intermediates 3-HP darstellen. In dieser Arbeit wurde daher das Enzym Glyceroldehydratase als Target ausgewählt, welches oberhalb von *dhaT* im 1,3-PDO-Weg fungiert.

Auffällig war bei der Kultivierung der *dhaB*-Mutante die extrem lange *lag*-Phase, welche mit einem im Vergleich zum Wildtyp relativ hohen Redoxpotential einherging. Während

der *lag*-Phase findet eine Anpassung der Mikroorganismen an die äußeren Bedingungen, Mediumzusammensetzung u. a. statt, was im Fall von *C. pasteurianum* insbesondere die Reduzierung der Medienbestandteile beinhaltet. Die Genexpression wird dementsprechend vom extrazellulären Redoxpotential beeinflusst und dient dazu, das intrazelluläre Redoxpotential und den zellulären Metabolismus auszubalancieren [129]. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen Redoxpotential und Wachstum war auch bei den Vorkulturoptimierten Fermentationen zu beobachten: Das zweiphasige Wachstum korrelierte mit dem Absinken des Redoxpotentials in zwei Stufen. Die Zugabe von Hefeextrakt schien das Absinken des Redoxpotentials zu unterstützen. Nichtsdestotrotz konnte die *dhaB*-Mutante in regulärem Biebl-Medium (mit 1 g/l Hefeextrakt) wachsen und eine Biomassekonzentration erreichen, die mit der des Wildtyps vergleichbar war. Selbst in einer Kultivierung in Hefeextrakt-freiem Biebl-Medium konnte ein Wachstum der *dhaB*-Mutante bis zu einer Biomassekonzentration von 1 g/l beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse demonstrieren, dass 1,3-PDO eine wichtige Rolle für die Redoxregulation spielt, insbesondere zu Beginn der Kultivierung. Nichtsdestotrotz ist das Absinken des Redoxpotentials auf einen Wert, welcher ein ungestörtes Wachstum von *C. pasteurianum* erlaubt, auf Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle ohne die Produktion von 1,3-PDO möglich.

Bei allen Fermentation mit der *dhaB*-Mutante war ein hoher Anteil (ca. 20 %) des Kohlenstoffes nicht innerhalb der bekannten Produkte wiederzufinden. Stattdessen war bei der HPLC-Analyse im Chromatogramm ein unbekannter *peak* zu sehen, welcher mittels UV-Detektor bei 32 min. detektierbar war und im Verlauf der Fermentation zunahm (Daten nicht gezeigt). Eine Isolierung und Charakterisierung dieses unbekanntes Metaboliten könnte weitere interessante Erkenntnisse über den Stoffwechsel von *C. pasteurianum* liefern.

Die Deletion der Glyceroldehydratase von *C. pasteurianum* wurde bereits in einer früheren Studie durchgeführt [108]. In der Studie von Schwarz et al. wurde das gesamte *dhaBCE*-Operon deletiert. Darüber hinaus wurde der Promotor des *dhaBCE*-Operons mit entfernt. In dieser Arbeit wurde die große Untereinheit der Glyceroldehydratase, *dhaB*, mit der zugehörigen Promotorregion deletiert (Abb. 31). Es ist zu vermuten, dass die Deletion des Promotors *upstream* von *dhaB* in beiden Fällen die Expression des gesamten Operons ausschaltet. In diesem Fall wäre bei beiden Mutanten der gleiche Phänotyp zu erwarten. Tatsächlich unterschieden sich die beiden Mutanten in ihrem Wachstumsverhalten

und in der Produktbildung erheblich. Während das Wachstum der Glyceroldehydratase-Mutante von Schwarz et al. auf Glycerol kaum möglich war (lediglich in Kombination mit einem Komplexmedium), konnte die *dhaB*-Mutante in dieser Arbeit auf Glycerol in Biobl-Medium wachsen. Nach verlängerter *lag*-Phase wurden Biomassekonzentrationen erreicht, welche mit denen des Wildtyps vergleichbar waren. Während hinsichtlich des Produktspektrums von Schwarz et al., neben der fehlenden 1,3-PDO-Produktion, lediglich leichte Abweichungen in der Säureproduktion beobachtet wurden (leicht erhöhte Laktat- und verminderte Acetatproduktion), war das Produktspektrum der Mutante aus dieser Arbeit signifikant verändert: Neben der fehlenden 1,3-PDO-Produktion war die Butyratproduktion stark vermindert; die Butanolproduktion war signifikant erhöht, außerdem bildete die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp zusätzlich Ethanol. Die Charakterisierung der Glyceroldehydratase-Mutante von Schwarz et al. wurde nicht im Bioreaktor, sondern in Anaerobflaschen durchgeführt. Die weniger kontrollierten Bedingungen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse teilweise erklären, wobei den Ergebnissen aus dem Bioreaktor eine größere Bedeutung hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit beigemessen werden kann. Weitere Unterschiede in der technischen Durchführung, beispielsweise die anfängliche Glycerolkonzentration im Kulturmedium, könnten eine Rolle spielen. Außerdem könnte das Design der jeweiligen Mutante eine Rolle spielen: Obwohl zu vermuten ist, dass die Deletion des Promotors *upstream* von *dhaB* das gesamte Operon ausschaltet, ist dies nicht mit Sicherheit zu sagen. Die starken Unterschiede im Phänotyp weisen vielmehr darauf hin, dass sich die beiden Mutanten genotypisch unterscheiden. Falls die mittlere und die kleine Untereinheit der Glyceroldehydratase der *dhaB*-Mutante exprimiert werden, würde dies einen Hinweis auf die Funktionen der einzelnen Untereinheiten geben. In diesem Fall ließe sich folgende Hypothese aufstellen: Während *dhaB* für die Produktion von 1,3-PDO essentiell ist, sind *dhaC* und/ oder *dhaE* für das Wachstum von *C. pasteurianum* auf Glycerol notwendig.

Hinsichtlich der Konstruktion der Mutante ist weiterhin zu klären, ob das Gen *ddrA*, welches für das Enzym *diol dehydratase reactivating factor* codiert und unmittelbar *downstream* vom *dhaBCE*-Operon lokalisiert ist (Abb. 31), transkribiert wird oder nicht, d. h. ob es der transkriptionellen Kontrolle des selben Promotors unterliegt. In dem Fall müsste dessen Funktion im Hinblick auf den Phänotyp der Mutante mit berücksichtigt werden. *DdrA* ist verantwortlich für das Recycling des Glyceroldehydratase-Cofaktors B12. Das Ausschalten des Cofaktor-Recyclings würde vermutlich ebenfalls die gesamte Funktion

der Glyceroldehydratase blockieren.

Schwarz et al. schlussfolgern aus ihren Beobachtungen basierend auf der Glyceroldehydratase-Mutante, dass die Produktion von 1,3-PDO für das Wachstum von *C. pasteurianum* auf Glycerol essentiell ist [108], wie es auch in verschiedenen früheren Studien vermutet wurde [8, 139, 103, 104]. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass das Wachstum von *C. pasteurianum* auf Glycerol ohne 1,3-PDO-Produktion möglich ist und dass dadurch eine selektive, signifikant erhöhte Butanolproduktion ermöglicht wird, welche mit bis zu 0,385 mol/mol eine der höchsten bisher erreichten Butanolausbeuten darstellt.

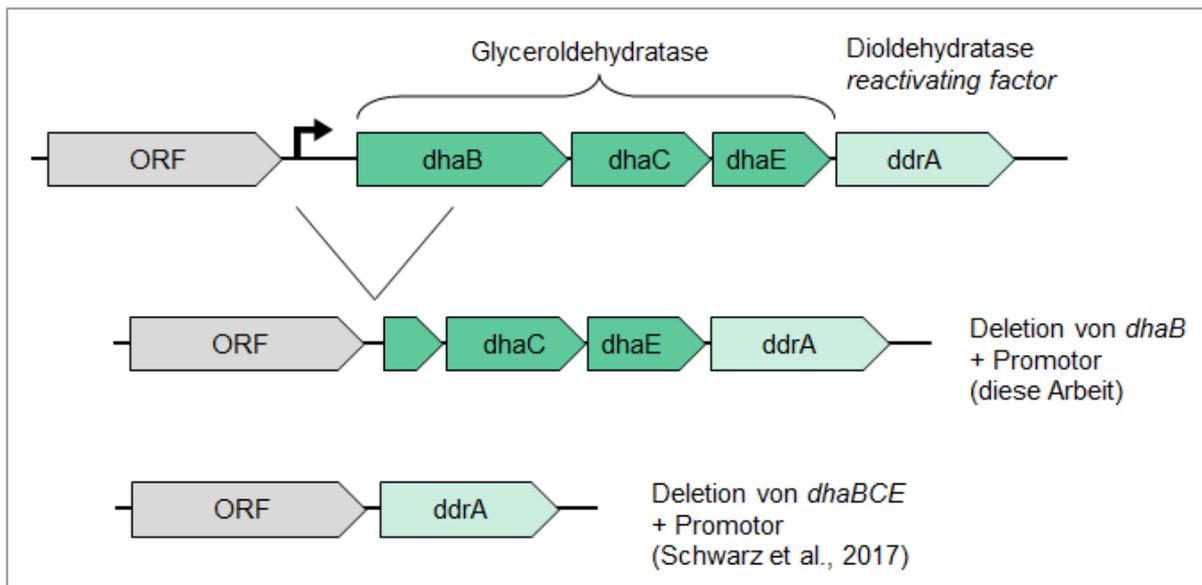


Abb. 31: Mutanten des Glyceroldehydratase-Operons von *C. pasteurianum*. Dargestellt sind das gesamte Operon und die Glyceroldehydratase-Mutanten aus dieser Arbeit sowie von Schwarz et al. [108]. ORF = *open reading frame*.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Problematik der Transformation von *C. pasteurianum* hat seit langer Zeit die volle Ausschöpfung des Potentials dieses Stammes eingeschränkt. Mit dem elektrokompetenten R525-Stamm ist ein bedeutsames Werkzeug geschaffen, um *metabolic engineering* in *C. pasteurianum* zu etablieren und dessen industrielles Potential für die nachhaltige Bioproduktion von Stoffen zu erweitern.

Der *C. pasteurianum*-R525-Stamm weist phänotypische Unterschiede im Vergleich zum DSM 525-Stamm auf, welche auf die Unterschiede im Genotyp zurückzuführen sind. Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, könnte eine Analyse der Funktion der mutierten Gene sowie des Transkriptoms von R525 im Vergleich zu DSM 525 entscheidende Hinweise liefern. Eine Charakterisierung des R525-Stammes unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen (beispielsweise auf Glycerol-Monosubstrat oder unter Eisenlimitierung) könnte ebenfalls zur weiteren Aufklärung beitragen.

Trotz der deutlich gesteigerten Transformationseffizienz ist der DNA-Transfer in *C. pasteurianum* limitiert. Bisher existieren vier *C. pasteurianum*-Stämme mit gesteigerter Transformationseffizienz ([108, 39] und diese Arbeit). Eine umfassende Analyse der Funktion der in diesen Stämmen mutierten Gene könnte die Mechanismen aufklären, welche den DNA-Transfer in *C. pasteurianum* bis heute behindern. Möglicherweise könnte eine Kombination dieser Mutationen in einem Stamm resultieren, dessen Transformationseffizienz noch weiter gesteigert ist.

Die Pyruvatcarboxylase hat sich als weniger geeignetes Target für das *engineering* von *C. pasteurianum* herausgestellt. Wider Erwarten wurden das Wachstum und die Produktivität durch Überexpression der Pyruvatcarboxylase nicht gesteigert. Die veränderten Eigenschaften der Pyruvatcarboxylase-Mutante tragen im Hinblick auf die industrielle Nutzung nicht zu einer Optimierung des Stammes bei. Nichtsdestotrotz liefert die Charakterisierung dieses Stammes neue Erkenntnisse zum Metabolismus von *C. pasteurianum*. Detailliertere Erkenntnisse könnten mit Hilfe dieses Stammes durch die Messung intrazellulärer Metabolite, insbesondere Oxalacetat und weiterer Citratzyklus-Intermediate, gewonnen werden.

Die Gendeletion in *C. pasteurianum* konnte, erstmalig in diesem Stamm, erfolgreich mittels CRISPR-Cas9-Nickase durchgeführt werden. Durch Deletion der Glyceroldehydratase-Untereinheit *dhaB* konnte die Butanolproduktion signifikant und selektiv gesteigert wer-

den. Darüber hinaus wurde erstmals gezeigt, dass das Wachstum von *C. pasteurianum* auf Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle ohne die Produktion von 1,3-PDO möglich ist. Dies weist darauf hin, dass ein alternativer Mechanismus zur Redoxregulation in *C. pasteurianum* verwendet wird. Die Messung der Wasserstoffproduktion der *dhaB*-Mutante sowie die metabolische Flussanalyse könnten weitere Anhaltspunkte liefern, um den vermuteten Mechanismus zu beweisen. Hinsichtlich der Funktion der Glyceroldehydratase konnte gezeigt werden, dass *dhaB* für die 1,3-PDO-Produktion essentiell ist. Die Generierung weiterer Mutanten, bei denen die anderen Enzymuntereinheiten - *dhaC* und *dhaE* - deletiert sind, würde Aufschluss darüber geben, welche spezifische Funktion diese weiteren Teile des Enzyms besitzen und die Aufklärung der Funktion der Glyceroldehydratase in *C. pasteurianum* komplettieren.

Durch die Weiterentwicklung der Methoden für das *metabolic engineering* sowie durch die neuen Erkenntnisse hinsichtlich des Metabolismus leisten die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag auf dem Weg zu einer nachhaltigen und konkurrenzfähigen industriellen Bioproduktion von Stoffen durch *C. pasteurianum*.

Literatur

- [1] S Abbad-Andaloussi, J Amine, P Gerard, and H Petitedemange. Effect of glucose on glycerol metabolism by clostridium butyricum dsm 5431. *Journal of applied microbiology*, 84(4):515–522, 1998.
- [2] S Abbad-Andaloussi, E Guedon, E Spiesser, and H Petitedemange. Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1, 3-propanediol production by clostridium butyricum dsm 5431. *Letters in Applied Microbiology*, 22(4):311–314, 1996.
- [3] K Ahrens, K Menzel, A-P Zeng, and W-D Deckwer. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by klebsiella pneumoniae in anaerobic continuous culture: Iii. enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1, 3-propanediol formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5):544–552, 1998.
- [4] STEVEN P Allen and HANS P Blaschek. Electroporation-induced transformation of intact cells of clostridium perfringens. *Applied and environmental microbiology*, 54(9):2322–2324, 1988.
- [5] João RM Almeida, Léia CL Fávoro, and Betania F Quirino. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for biofuels*, 5(1):48, 2012.
- [6] Trond Erik Vee Aune and Finn Lillelund Aachmann. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5):1301–1313, 2010.
- [7] Fabien Barbirato, El Hassan Himmi, Thierry Conte, and André Bories. 1, 3-propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products*, 7(2):281–289, 1998.
- [8] H Biebl. Fermentation of glycerol by clostridium pasteurianum—batch and continuous culture studies. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 27(1):18–26, 2001.
- [9] David Bikard, Asma Hatoum-Aslan, Daniel Mucida, and Luciano A Marraffini. Crispr interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection. *Cell host & microbe*, 12(2):177–186, 2012.
- [10] A Bories, C Claret, and P Soucaille. Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using gluconobacter oxydans. *Process biochemistry*, 26(4):243–248, 1991.
- [11] Marion M Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.

- [12] Mark R Bruder, Michael E Pyne, Murray Moo-Young, Duane A Chung, and C Perry Chou. Extending crispr-cas9 technology from genome editing to transcriptional engineering in the genus *clostridium*. *Applied and environmental microbiology*, 82(20):6109–6119, 2016.
- [13] Afroditi Chatzifragkou and Seraphim Papanikolaou. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(1):13–27, 2012.
- [14] C-K Chen and HP Blaschek. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *clostridium beijerinckii* ba101. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2):170–173, 1999.
- [15] C Claret, JM Salmon, C Romieu, and A Bories. Physiology of *gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3):359–365, 1994.
- [16] Charlien Clauwers, Kristof Vanoirbeek, Laurence Delbrassinne, and Chris W Michiels. Construction of nontoxic mutants of nonproteolytic *clostridium botulinum* nctc 11219 by insertional mutagenesis and gene replacement. *Applied and environmental microbiology*, 82(10):3100–3108, 2016.
- [17] James M Clomburg and Ramon Gonzalez. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in biotechnology*, 31(1):20–28, 2013.
- [18] Gervásio Paulo Da Silva, Matthias Mack, and Jonas Contiero. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, 27(1):30–39, 2009.
- [19] Birgit Dabrock, Hubert Bahl, and Gerhard Gottschalk. Parameters affecting solvent production by *clostridium pasteurianum*. *Applied and environmental microbiology*, 58(4):1233–1239, 1992.
- [20] Rolf Daniel, Thomas A Bobik, and Gerhard Gottschalk. Biochemistry of coenzyme b12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS microbiology reviews*, 22(5):553–566, 1998.
- [21] WD Deckwer. Glycerol conversion to 1, 3-propanediol—a microbial route to a versatile chemical. In *International Congress on Chemicals from Biotechnology, October*, pages 18–20, 1993.
- [22] WD Deckwer, B Günzel, H Biebl, RJ Müller, and FJ Carduck. Glycerol conversion to 1, 3-propanediol: a versatile component for biodegradable plastics. In *Proceedings of the 7th European Conference on Biomass for Energy and Environment, Agriculture and Industry*. Ponte Press, Bochum, Germany, 1992.
- [23] Ruchir P Desai and Eleftherios T Papoutsakis. Antisense rna strategies for metabolic engineering of *clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3):936–945, 1999.
- [24] Rotem Edgar and Udi Qimron. The *escherichia coli* crispr system protects from λ lysogenization, lysogens, and prophage induction. *Journal of bacteriology*, 192(23):6291–6294, 2010.

- [25] Jenny E Emerson, Catherine B Reynolds, Robert P Fagan, Helen A Shaw, David Goulding, and Neil F Fairweather. A novel genetic switch controls phase variable expression of cwpv, a clostridium difficile cell wall protein. *Molecular microbiology*, 74(3):541–556, 2009.
- [26] RG Forage and EC Lin. Dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in klebsiella pneumoniae ncib 418. *Journal of Bacteriology*, 151(2):591–599, 1982.
- [27] Robert G Forage and Michael A Foster. Glycerol fermentation in klebsiella pneumoniae: functions of the coenzyme b12-dependent glycerol and diol dehydratases. *Journal of bacteriology*, 149(2):413–419, 1982.
- [28] JL Fortman, Swapnil Chhabra, Aindrila Mukhopadhyay, Howard Chou, Taek Soon Lee, Eric Steen, and Jay D Keasling. Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. *Trends in biotechnology*, 26(7):375–381, 2008.
- [29] Hongxin Fu, Le Yu, Meng Lin, Jufang Wang, Zhilong Xiu, and Shang-Tian Yang. Metabolic engineering of clostridium tyrobutyricum for enhanced butyric acid production from glucose and xylose. *Metabolic engineering*, 40:50–58, 2017.
- [30] Stefan Marcus Gaida, Andrea Liedtke, Andreas Heinz Wilhelm Jentges, Benedikt Engels, and Stefan Jennewein. Metabolic engineering of clostridium cellulolyticum for the production of n-butanol from crystalline cellulose. *Microbial cell factories*, 15(1):6, 2016.
- [31] R Gallardo, M Alves, and LR Rodrigues. Modulation of crude glycerol fermentation by clostridium pasteurianum dsm 525 towards the production of butanol. *biomass and bioenergy*, 71:134–143, 2014.
- [32] R Gallardo, M Alves, and LR Rodrigues. Influence of nutritional and operational parameters on the production of butanol or 1, 3-propanediol from glycerol by a mutant clostridium pasteurianum. *New biotechnology*, 34:59–67, 2017.
- [33] Dipankar Ghosh, Irma Flore Sobro, and Patrick C Hallenbeck. Stoichiometric conversion of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen: response surface methodology study of the effects of light intensity and crude glycerol and glutamate concentration. *Bioresource technology*, 106:154–160, 2012.
- [34] Pedro Gonzalez, J Samuel, and Teresa Borrás. Increasing dna transfer efficiency by temporary inactivation of host restriction. *Curr. Eye Res*, 14:611–617, 1999.
- [35] María González-Pajuelo, Isabelle Meynial-Salles, Filipa Mendes, Jose Carlos Andrade, Isabel Vasconcelos, and Philippe Soucaille. Metabolic engineering of clostridium acetobutylicum for the industrial production of 1, 3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering*, 7(5):329–336, 2005.
- [36] María González-Pajuelo, Isabelle Meynial-Salles, Filipa Mendes, Philippe Soucaille, and Isabel Vasconcelos. Microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol: physiological comparison of a natural

- producer, *clostridium butyricum* vpi 3266, and an engineered strain, *clostridium acetobutylicum* dg1 (pspd5). *Applied and environmental microbiology*, 72(1):96–101, 2006.
- [37] Edward M Green and George N Bennett. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *clostridium acetobutylicum* atcc 824. *Applied biochemistry and biotechnology*, 57(1):213, 1996.
- [38] Christin Groeger, Wei Wang, Wael Sabra, Tyll Utesch, and An-Ping Zeng. Metabolic and proteomic analyses of product selectivity and redox regulation in *clostridium pasteurianum* grown on glycerol under varied iron availability. *Microbial cell factories*, 16(1):64, 2017.
- [39] Alexander Grosse-Honebrink, Katrin M Schwarz, Hengzheng Wang, Nigel P Minton, and Ying Zhang. Improving gene transfer in *clostridium pasteurianum* through the isolation of rare hypertransformable variants. *Anaerobe*, 2017.
- [40] LM Harris, L Blank, RP Desai, NE Welker, and ET Papoutsakis. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *clostridium acetobutylicum* with an inactivated *solr* gene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(5):322–328, 2001.
- [41] Benjamin G Harvey and Heather A Meylemans. The role of butanol in the development of sustainable fuel technologies. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 86(1):2–9, 2011.
- [42] John T Heap, Muhammad Ehsaan, Clare M Cooksley, Yen-Kuan Ng, Stephen T Cartman, Klaus Winzer, and Nigel P Minton. Integration of dna into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic acids research*, 40(8):e59–e59, 2012.
- [43] John T Heap, Sarah A Kuehne, Muhammad Ehsaan, Stephen T Cartman, Clare M Cooksley, Jamie C Scott, and Nigel P Minton. The clostron: mutagenesis in *clostridium* refined and streamlined. *Journal of microbiological methods*, 80(1):49–55, 2010.
- [44] John T Heap, Oliver J Pennington, Stephen T Cartman, Glen P Carter, and Nigel P Minton. The clostron: a universal gene knock-out system for the genus *clostridium*. *Journal of microbiological methods*, 70(3):452–464, 2007.
- [45] John T Heap, Oliver J Pennington, Stephen T Cartman, and Nigel P Minton. A modular system for *clostridium* shuttle plasmids. *Journal of microbiological methods*, 78(1):79–85, 2009.
- [46] Marc Heyndrickx, Paul De Vos, Marc Vancanneyt, and Jozef De Ley. The fermentation of glycerol by *clostridium butyricum* lmg 1212t2 and 1213t1 and *clostridium pasteurianum* lmg 3285. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(5):637–642, 1991.
- [47] He Huang, Changsheng Chai, Ning Li, Pete Rowe, Nigel P Minton, Sheng Yang, Weihong Jiang, and Yang Gu. Crispr/cas9-based efficient genome editing in *clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium. *ACS synthetic biology*, 5(12):1355–1361, 2016.
- [48] Katrin CB Jennert, Chantal Tardif, Danielle I Young, and Michael Young. Gene transfer to *clostridium cellulolyticum* atcc 35319. *Microbiology*, 146(12):3071–3080, 2000.

- [49] Torbjørn Ølshøj Jensen, Thomas Kvist, Marie Just Mikkelsen, Peter Vittrup Christensen, and Peter Westermann. Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *clostridium pasteurianum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(5):709–717, 2012.
- [50] Torbjørn Ølshøj Jensen, Thomas Kvist, Marie Just Mikkelsen, and Peter Westermann. Production of 1, 3-pdo and butanol by a mutant strain of *clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol. *AMB Express*, 2(1):44, 2012.
- [51] Wenyan Jiang, David Bikard, David Cox, Feng Zhang, and Luciano A Marraffini. Rna-guided editing of bacterial genomes using crispr-cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3):233–239, 2013.
- [52] Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. A programmable dual-rna-guided dna endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096):816–821, 2012.
- [53] Sarawut Jitrapakdee, Martin St Maurice, Ivan Rayment, W Wallace Cleland, John C Wallace, and Paul V Attwood. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochemical Journal*, 413(3):369–387, 2008.
- [54] Erin E Johnson and Lars Rehm. The role of 1, 3-propanediol production in fermentation of glycerol by *clostridium pasteurianum*. *Bioresource technology*, 209:1–7, 2016.
- [55] DT Jones, JR Webster, and DR Woods. The formation of simple fruiting body-like structures associated with sporulation under aerobic conditions in *clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*, 116(1):195–200, 1980.
- [56] Michael Karberg, Huatao Guo, Jin Zhong, Robert Coon, Jiri Perutka, and Alan M Lambowitz. Group ii introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *Nature biotechnology*, 19(12):1162–1167, 2001.
- [57] TR Klapatch, AL Demain, and LR Lynd. Restriction endonuclease activity in *clostridium thermocellum* and *clostridium thermosaccharolyticum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 45(1):127–131, 1996.
- [58] Michael Köpke, Claudia Held, Sandra Hujer, Heiko Liesegang, Arnim Wiezer, Antje Wollherr, Armin Ehrenreich, Wolfgang Liebl, Gerhard Gottschalk, and Peter Dürre. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29):13087–13092, 2010.
- [59] Sarah A Kuehne and Nigel P Minton. Clostron-mediated engineering of *clostridium*. *Bioengineered*, 3(4):247–254, 2012.
- [60] Ulrich K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature*, 227(5259):680–685, 1970.

- [61] Sun-Mi Lee, Min Ok Cho, Cheol Hee Park, Yun-Chul Chung, Ji Hyeon Kim, Byoung-In Sang, and Youngsoon Um. Continuous butanol production using suspended and immobilized clostridium beijerinckii ncimb 8052 with supplementary butyrate. *Energy & fuels*, 22(5):3459–3464, 2008.
- [62] Dörte Lehmann, Nadine Radomski, and Tina Lütke-Eversloh. New insights into the butyric acid metabolism of clostridium acetobutylicum. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(5):1325–1339, 2012.
- [63] Nathan S Lewis and Daniel G Nocera. Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43):15729–15735, 2006.
- [64] Qi Li, Jun Chen, Nigel P Minton, Ying Zhang, Zhiqiang Wen, Jinle Liu, Haifeng Yang, Zhe Zeng, Xiaodan Ren, Junjie Yang, et al. Crispr-based genome editing and expression control systems in clostridium acetobutylicum and clostridium beijerinckii. *Biotechnology journal*, 11(7):961–972, 2016.
- [65] Yifan Li, Zhenquan Lin, Can Huang, Yan Zhang, Zhiwen Wang, Ya-jie Tang, Tao Chen, and Xue-ming Zhao. Metabolic engineering of escherichia coli using crispr-cas9 mediated genome editing. *Metabolic engineering*, 31:13–21, 2015.
- [66] James C Liao, Luo Mi, Sammy Pontrelli, and Shanshan Luo. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5):288–304, 2016.
- [67] Fungmin Liew, Anne M Henstra, Michael Kpke, Klaus Winzer, Sean D Simpson, and Nigel P Minton. Metabolic engineering of clostridium autoethanogenum for selective alcohol production. *Metabolic engineering*, 40:104–114, 2017.
- [68] Hongjuan Liu, Yunzhen Xu, Zongming Zheng, and Dehua Liu. 1, 3-propanediol and its copolymers: research, development and industrialization. *Biotechnology journal*, 5(11):1137–1148, 2010.
- [69] Jun Liu, Ting Guo, Xiaoning Shen, Jiahui Xu, Junzhi Wang, Yanyan Wang, Dong Liu, Huanqing Niu, Lei Liang, and Hanjie Ying. Engineering clostridium beijerinckii with the cbei_4693 gene knockout for enhanced ferulic acid tolerance. *Journal of biotechnology*, 229:53–57, 2016.
- [70] Hemachandra Liyanage, Michael Young, and Eva R Kashket. Butanol tolerance of clostridium beijerinckii ncimb 8052 associated with down-regulation of glda by antisense rna. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(1):87–93, 2000.
- [71] Frauke Luers, Markus Seyfried, Rolf Daniel, and Gerhard Gottschalk. Glycerol conversion to 1, 3-propanediol by clostridium pasteurianum: cloning and expression of the gene encoding 1, 3-propanediol dehydrogenase. *FEMS microbiology letters*, 154(2):337–345, 1997.
- [72] Luciana Macis, Rolf Daniel, and Gerhard Gottschalk. Properties and sequence of the coenzyme b12-dependent glycerol dehydratase of clostridium pasteurianum. *FEMS microbiology letters*, 164(1):21–28, 1998.

- [73] Kira S Makarova, Yuri I Wolf, Omer S Alkhnbashi, Fabrizio Costa, Shiraz A Shah, Sita J Saunders, Rodolphe Barrangou, Stan JJ Brouns, Emmanuelle Charpentier, Daniel H Haft, et al. An updated evolutionary classification of crispr–cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(11):722, 2015.
- [74] Alok Malaviya, Yu-Sin Jang, and Sang Yup Lee. Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of clostridium pasteurianum. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(4):1485–1494, 2012.
- [75] Luciano A Marraffini and Erik J Sontheimer. Crispr interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting dna. *science*, 322(5909):1843–1845, 2008.
- [76] Lee D Mermelstein, Eleftherios T Papoutsakis, Daniel J Petersen, and George N Bennett. Metabolic engineering of clostridium acetobutylicum atcc 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnology and bioengineering*, 42(9):1053–1060, 1993.
- [77] Lee D Mermelstein, Neil E Welker, George N Bennett, and Eleftherios T Papoutsakis. Expression of cloned homologous fermentative genes in clostridium acetobutylicum atcc 824. *Nature biotechnology*, 10(2):190–195, 1992.
- [78] Chuloo Moon, Chang Hwan Lee, Byoung-In Sang, and Youngsoon Um. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1, 3-propanediol production from glycerol by clostridium pasteurianum. *Bioresource technology*, 102(22):10561–10568, 2011.
- [79] Ramesh V Nair and Eleftherios T Papoutsakis. Expression of plasmid-encoded aad in clostridium acetobutylicum m5 restores vigorous butanol production. *Journal of bacteriology*, 176(18):5843–5846, 1994.
- [80] JP Nakas, M Schaedle, CM Parkinson, CE Coonley, and SW Tanenbaum. System development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. *Applied and environmental microbiology*, 46(5):1017–1023, 1983.
- [81] Villadsen John Nielsen, Jens and Gunnar Lidén. *Bioreaction Engineering Principles*, volume 2. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- [82] Raymond ES Nwachukwu, Abolghasem Shahbazi, Lijun Wang, Mulumebet Worku, Salam Ibrahim, and Keith Schimmel. Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by enterobacter aerogenes s012. *Amb Express*, 3(1):12, 2013.
- [83] D O’Connor. Report t39-t3. biodiesel ghg emissions, pas, present, and future. *A report to IEA Bioenergy Task 39. In Commercializing Liquid Biofuels from Biomass*, 2011.
- [84] Jee-Hwan Oh and Jan-Peter van Pijkeren. Crispr–cas9-assisted recombineering in lactobacillus reuteri. *Nucleic acids research*, 42(17):e131–e131, 2014.

- [85] Morimasa Ohse, Kuniharu Takahashi, Yasuhiro Kadowaki, and Hideo Kusaoke. Effects of plasmid dna sizes and several other factors on transformation of bacillus subtilis isw1214 with plasmid dna by electroporation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(8):1433–1437, 1995.
- [86] Brian C O’Neill and Michael Oppenheimer. Dangerous climate impacts and the kyoto protocol. *Science*, 296(5575):1971–1972, 2002.
- [87] JD Oultram, M Loughlin, TJ Swinfield, JK Brehm, DE Thompson, and NP Minton. Introduction of plasmids into whole cells of clostridium acetobutylicum by electroporation. *FEMS microbiology letters*, 56(1):83–88, 1988.
- [88] Stephen Pacala and Robert Socolow. Stabilization wedges: solving the climate problem for the next 50 years with current technologies. *science*, 305(5686):968–972, 2004.
- [89] Petra Patakova, Daniel Maxa, Mojmir Rychtera, Michaela Linhova, Petr Fribert, Zlata Muzikova, Jakub Lipovsky, Leona Paulova, Milan Pospisil, Gustav Sebor, et al. Perspectives of biobutanol production and use. In *Biofuel’s Engineering Process Technology*. InTech, 2011.
- [90] Yogita Patil, Madan Junghare, and Nicolai Müller. Fermentation of glycerol by anaerobium acetilylicum and its potential use in biofuel production. *Microbial biotechnology*, 10(1):203–217, 2017.
- [91] J Payne and JG Morris. Pyruvate carboxylase in rhodospseudomonas spheroides. *Microbiology*, 59(1):97–101, 1969.
- [92] Petra G Peters-Wendisch, Volker F Wendisch, Susanne Paul, Bernhard J Eikmanns, and Hermann Sahm. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in corynebacterium glutamicum. *Microbiology*, 143(4):1095–1103, 1997.
- [93] Michael E Pyne, Mark R Bruder, Murray Moo-Young, Duane A Chung, and C Perry Chou. Harnessing heterologous and endogenous crispr-cas machineries for efficient markerless genome editing in clostridium. *Scientific reports*, 6, 2016.
- [94] Michael E Pyne, Murray Moo-Young, Duane A Chung, and C Perry Chou. Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of clostridium pasteurianum. *Biotechnology for biofuels*, 6(1):50, 2013.
- [95] Michael E Pyne, Murray Moo-Young, Duane A Chung, and C Perry Chou. Expansion of the genetic toolkit for metabolic engineering of clostridium pasteurianum: chromosomal gene disruption of the endogenous cpaai restriction enzyme. *Biotechnology for biofuels*, 7(1):163, 2014.
- [96] Michael E Pyne, Murray Moo-Young, Duane A Chung, and C Perry Chou. Antisense-rna-mediated gene downregulation in clostridium pasteurianum. *Fermentation*, 1(1):113–126, 2015.

- [97] Michael E Pyne, Stanislav Sokolenko, Xuejia Liu, Kajan Srirangan, Mark R Bruder, Marc G Aucoin, Murray Moo-Young, Duane A Chung, and C Perry Chou. Disruption of the reductive 1, 3-propanediol pathway triggers production of 1, 2-propanediol for sustained glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and environmental microbiology*, 82(17):5375–5388, 2016.
- [98] N Qureshi and HP Blaschek. Recent advances in abe fermentation: hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* ba101. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(5):287–291, 2001.
- [99] Romain Richard, Sophie Thiebaud-Roux, and Laurent Prat. Modelling the kinetics of transesterification reaction of sunflower oil with ethanol in microreactors. *Chemical engineering science*, 87:258–269, 2013.
- [100] DIANE F RICHARDS, PAUL E LINNETT, JOHN D OULTRAM, and MICHAEL YOUNG. Restriction endonucleases in *Clostridium pasteurianum* atcc 6013 and *C. thermohydrosulfuricum* dsm 568. *Microbiology*, 134(12):3151–3157, 1988.
- [101] Richard J Roberts. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic acids research*, 15(Suppl):r189, 1987.
- [102] FE Ruch, J Lengeler, and ECC Lin. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of bacteriology*, 119(1):50–56, 1974.
- [103] Wael Sabra, C Groeger, PN Sharma, and An-Ping Zeng. Improved n-butanol production by a non-acetone producing *Clostridium pasteurianum* dsmz 525 in mixed substrate fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(9):4267–4276, 2014.
- [104] Wael Sabra, Wei Wang, Sruthi Surandram, Christin Groeger, and An-Ping Zeng. Fermentation of mixed substrates by *Clostridium pasteurianum* and its physiological, metabolic and proteomic characterizations. *Microbial cell factories*, 15(1):114, 2016.
- [105] Tahereh Sarchami, Erin Johnson, and Lars Rehmann. Optimization of fermentation condition favoring butanol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum* dsm 525. *Bioresource technology*, 208:73–80, 2016.
- [106] Uwe Sauer and Bernhard J Eikmanns. The pep—pyruvate—oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria: We dedicate this paper to Rudolf K. Thauer, director of the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology in Marburg, Germany, on the occasion of his 65th birthday. *FEMS microbiology reviews*, 29(4):765–794, 2005.
- [107] Helmut Schütz and Ferdinand Radler. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(2):169–178, 1984.
- [108] Katrin M Schwarz, Alexander Grosse-Honebrink, Kamila Derecka, Carlo Rotta, Ying Zhang, and Nigel P Minton. Towards improved butanol production through targeted genetic modification of *Clostridium pasteurianum*. *Metabolic engineering*, 40:124–137, 2017.

- [109] Markus Seyfried, Rolf Daniel, and Gerhard Gottschalk. Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme b12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Journal of bacteriology*, 178(19):5793–5796, 1996.
- [110] Gerald D Shockman and JF Barren. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 37(1):501–527, 1983.
- [111] Tomas Sinkunas, Giedrius Gasiunas, Christophe Fremaux, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. Cas3 is a single-stranded dna nuclease and atp-dependent helicase in the crisp/cas immune system. *The EMBO journal*, 30(7):1335–1342, 2011.
- [112] KL Smiley and M Sobolov. A cobamide-requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming lactobacillus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 97(3):538–543, 1962.
- [113] George Stephanopoulos, Aristos A Aristidou, and Jens Nielsen. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. Academic press, 1998.
- [114] Patrick Stragier and Richard Losick. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics*, 30(1):297–341, 1996.
- [115] Katherine A Taconi, Keerthi P Venkataramanan, and Duane T Johnson. Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* atcc® 6013™ utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source. *Environmental progress & sustainable energy*, 28(1):100–110, 2009.
- [116] Takamasa Tobimatsu, Tadahiro Sakai, Yasuharu Hashida, Nika Mizoguchi, Shozo Miyoshi, and Tetsuo Toraya. Heterologous expression, purification, and properties of diol dehydratase, an adenosylcobalamin-dependent enzyme of *Klebsiella oxytoca*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 347(1):132–140, 1997.
- [117] Andrew C Tolonen, Elsa Petit, Jeffrey L Blanchard, Tom Warnick, and Susan B Leschine. Technologies to study plant biomass fermentation using the model bacterium *Clostridium phytofermentans*. *Biological conversion of biomass for fuels and chemicals*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pages 114–139, 2013.
- [118] Nathalie Turgeon, Christian Laflamme, Jim Ho, and Caroline Duchaine. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* atcc 14579. *Journal of microbiological methods*, 67(3):543–548, 2006.
- [119] Cenk Undey, Duncan Low, Jose C Menezes, and Mel Koch. *Pat applied in biopharmaceutical process development and manufacturing: an enabling tool for quality-by-design*. CRC Press, 2011.
- [120] Merton F Utter and D Bruce Keech. Formation of oxaloacetate from pyruvate and co2. *Journal of Biological Chemistry*, 235(5):PC17–PC18, 1960.

- [121] Belem Vargas-Ochoa, Jorge Mejía-Barajas, Mónica Clemente-Guerrero, Salvador Manzo-Avalos, Rafael Salgado-Garciglia, and Alfredo Saavedra-Molina. Evaluation of antioxidant activity from different yeast extracts. *The FASEB Journal*, 30(1 Supplement):1174–22, 2016.
- [122] Keerthi P Venkataramanan, Judy J Boatman, Yogi Kurniawan, Katherine A Taconi, Geoffrey D Bothun, and Carmen Scholz. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *clostridium pasteurianum* atcc 6013. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3):1325–1335, 2012.
- [123] Reuben B Vercoe, James T Chang, Ron L Dy, Corinda Taylor, Tamzin Gristwood, James S Clulow, Corinna Richter, Rita Przybilski, Andrew R Pitman, and Peter C Fineran. Cytotoxic chromosomal targeting by crispr/cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS genetics*, 9(4):e1003454, 2013.
- [124] John C Wallace and SB Easterbrook-Smith. *Pyruvate carboxylase*. CRC Press, 1985.
- [125] Yi Wang, Zhong-Tian Zhang, Seung-Oh Seo, Patrick Lynn, Ting Lu, Yong-Su Jin, and Hans P Blaschek. Bacterial genome editing with crispr-cas9: deletion, integration, single nucleotide modification, and desirable “clean” mutant selection in *clostridium beijerinckii* as an example. *ACS synthetic biology*, 5(7):721–732, 2016.
- [126] Yi Wang, Zhong-Tian Zhang, Seung-Oh Seo, Patrick Lynn, Ting Lu, Yong-Su Jin, and Hans P Blaschek. Gene transcription repression in *clostridium beijerinckii* using crispr-dcas9. *Biotechnology and bioengineering*, 113(12):2739–2743, 2016.
- [127] Zhengxiang Wang, Jian Zhuge, Huiying Fang, and Bernard A Prior. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology advances*, 19(3):201–223, 2001.
- [128] Charles Weizmann. Charles weizmann, September 9 1919. US Patent 1,315,585.
- [129] Mandy Wietzke and Hubert Bahl. The redox-sensing protein rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *clostridium acetobutylicum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(3):749–761, 2012.
- [130] Serge Winogradsky et al. Recherches sur l’assimilation de l’azote libre de l’atmosphère par les microbes. 1895.
- [131] Daiana Wischral, Jianzhi Zhang, Chi Cheng, Meng Lin, Lucas Monteiro Galotti De Souza, Fernando L Pellegrini Pessoa, Nei Pereira, and Shang-Tian Yang. Production of 1, 3-propanediol by *clostridium beijerinckii* dsm 791 from crude glycerol and corn steep liquor: process optimization and metabolic engineering. *Bioresource technology*, 212:100–110, 2016.
- [132] Uwe Witt, Rolf-Joachim Müller, Josef Augusta, Hartmut Widdecke, and Wolf-Dieter Deckwer. Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1, 3-propanediol. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 195(2):793–802, 1994.

- [133] Addison V Wright, James K Nuñez, and Jennifer A Doudna. Biology and applications of crispr systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 164(1):29–44, 2016.
- [134] Tao Xu, Yongchao Li, Zhou Shi, Christopher L Hemme, Yuan Li, Yonghua Zhu, Joy D Van Nostrand, Zhili He, and Jizhong Zhou. Efficient genome editing in clostridium cellulolyticum via crispr-cas9 nickase. *Applied and environmental microbiology*, 81(13):4423–4431, 2015.
- [135] Chuang Xue, Jingbo Zhao, Lijie Chen, Shang-Tian Yang, and Fengwu Bai. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by clostridium acetobutylicum. *Biotechnology Advances*, 2017.
- [136] Syed Shams Yazdani and Ramon Gonzalez. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current opinion in biotechnology*, 18(3):213–219, 2007.
- [137] Ido Yosef, Moran G Goren, and Udi Qimron. Proteins and dna elements essential for the crispr adaptation process in escherichia coli. *Nucleic acids research*, 40(12):5569–5576, 2012.
- [138] A-P Zeng, H Biebl, H Schlieker, and W-D Deckwer. Pathway analysis of glycerol fermentation by klebsiella pneumoniae: regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(9):770–779, 1993.
- [139] An-Ping Zeng and Hanno Biebl. Bulk-chemicals from biotechnology: the case of 1, 3-propanediol production and the new trends. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 74(2):239–259, 2002.
- [140] Jie Zhang, Ya-Jun Liu, Gu-Zhen Cui, and Qiu Cui. A novel arabinose-inducible genetic operation system developed for clostridium cellulolyticum. *Biotechnology for biofuels*, 8(1):36, 2015.

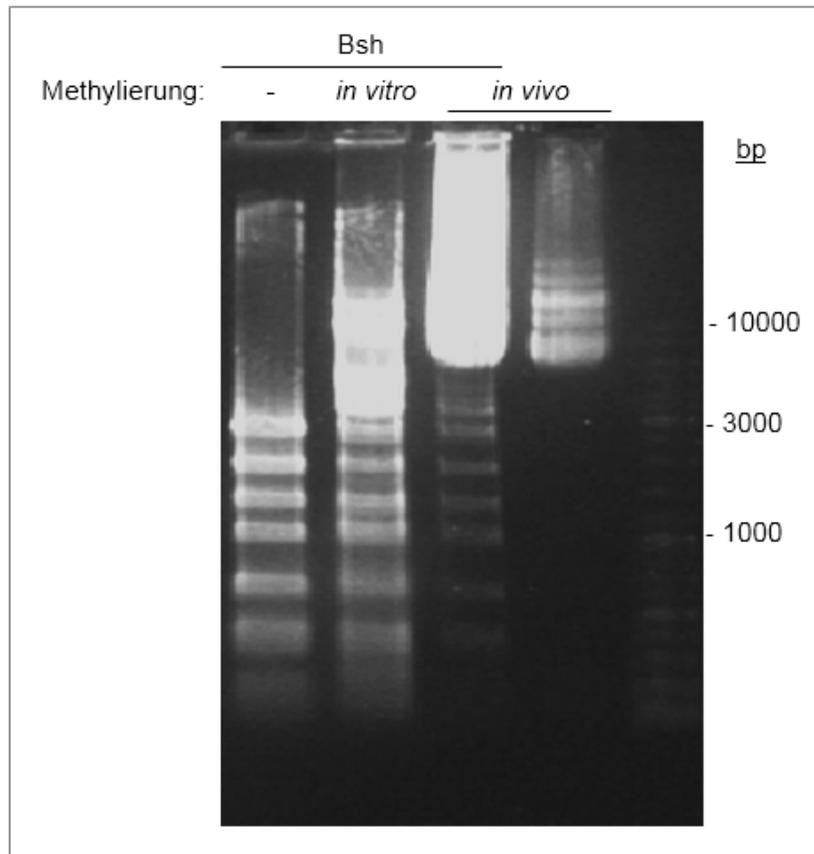


Abb. 32: Methylierung des *E. coli-C. pasteurianum*-Shuttlevektors zur Deletion von *dhaB*. Überprüfung des Erfolges der *In vivo*-Methylierung im Vergleich zur *In vitro*-Methylierung durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Bsh1236I, einem Isoschizomer von CpaAI.

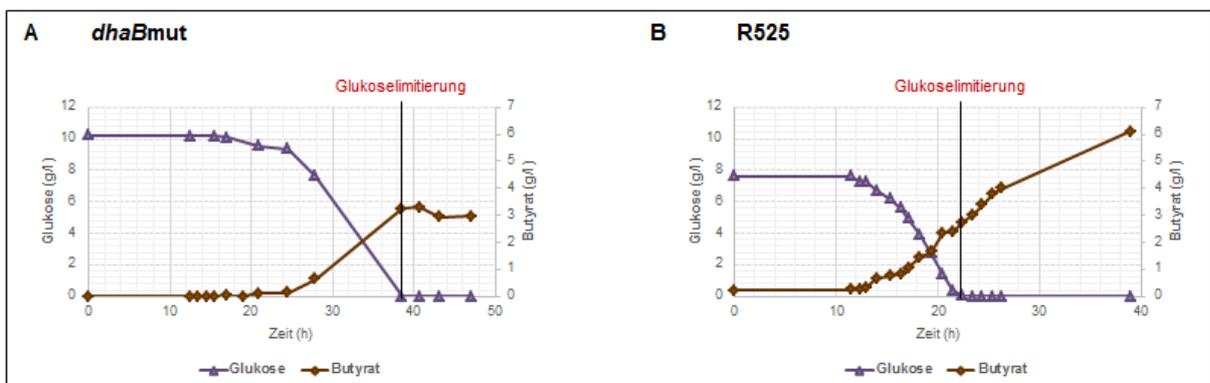


Abb. 33: Zeitpunkt der Glukoselimitierung in Korrelation zur Butyratproduktion der *C. pasteurianum-dhaB*-Mutante (A) und des Wildtyps R525 (B).

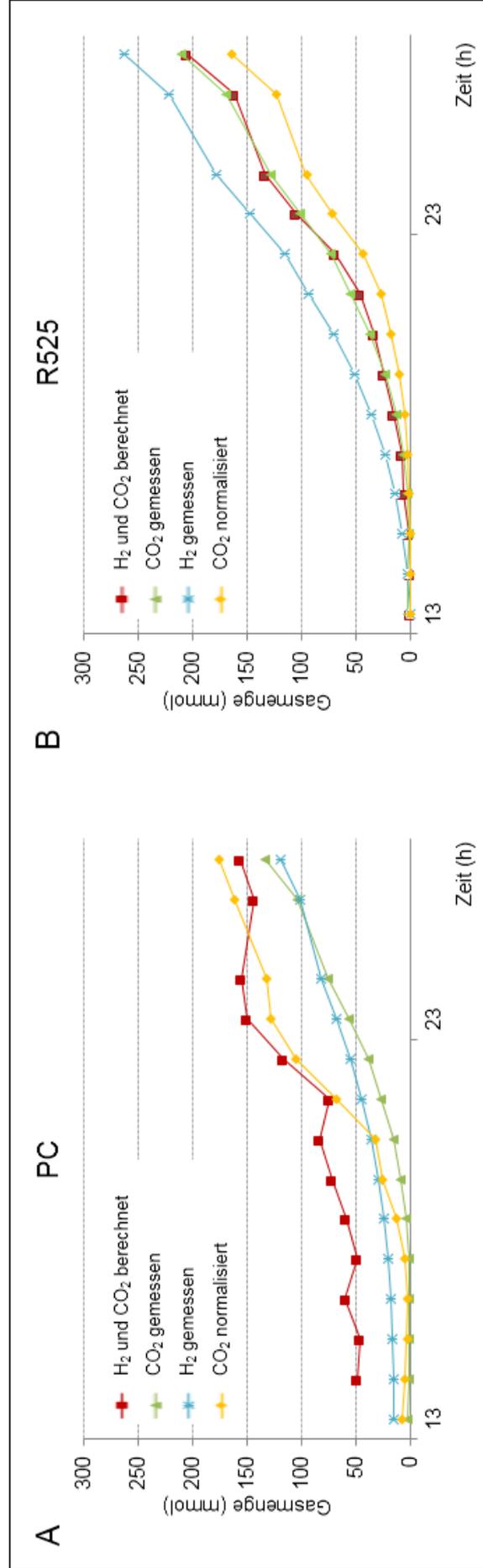


Abb. 34: Produktion von H₂ und CO₂ (berechnet und gemessen) der *C. pasteurianum*-PC-Mutante (A) im Vergleich zum Wildtyp R525 (B).

Name	Schmitz
Vorname	Rebekka
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	29.06.1983
Geburtsort, -land	Münster, Deutschland
08.1989 - 07.1993	Martin-Luther-Grundschule in Münster
08.1993 - 06.2003	Schillergymnasium und Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Münster
10.2003 - 09.2006	Kinderkrankenpflege-Ausbildung an der St. Franziskus-Schule für Gesundheitsberufe in Münster
10.2006 - 06.2010	Tätigkeit als Kinderkrankenschwester in Münster und auf Borkum
10.2008 - 09.2011	Studium (Medizinische Biologie) an der Universität Duisburg-Essen, Abschluss: Bachelor of Science
10.2011 - 10.2013	Studium (Molecular Life Sciences) an der Universität Hamburg, Abschluss: Master of Science
12.2013 - 12.2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, Hamburg
03.2015 – 12.2017	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik, Technische Universität Hamburg-Harburg
seit 01.2018	Elternzeit