

Entwicklung von molekularbiologischen Werkzeugen für den sekundären Gärer *Clostridium kluyveri*

Martina Irene Schneider

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Science der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

2. Prof. Dr. Michael Schloter

Die Dissertation wurde am 04.01.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die TUM School of Life Science am 21.03.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	VIII
Summary	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Clostridien als Biokatalysatoren in der Biotechnologie.....	1
1.1.1 Metabolische Eigenschaften der Clostridien.....	1
1.1.2 Clostridien als vielfältige Synthese-Plattformen durch genetische Modifikation	1
1.1.3 Syngas als Ausgangsstoff für bakterielle Fermentationsprozesse	3
1.1.4 Potential von Clostridium Co-Kulturen auf Syngas	4
1.2 Fluoreszenzmarkierung zur Überwachung von synthetischen Co-Kulturen	6
1.2.1 Strategien zur Überwachung von Co-Kulturen während der Fermentierung	6
1.2.2 Fluoreszenzproteine für die Anwendung in Clostridien	7
1.2.3 Die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	8
1.3 Der sekundäre Gärer <i>Clostridium kluyveri</i>	9
1.3.1 Ein historischer Rückblick zu <i>C. kluyveri</i>	9
1.3.2 Energiegewinnung über reverse- β -Oxidation und C-Kettenverlängerung.....	10
1.4 Restriktions-/Modifikationssysteme	12
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Organismen, Plasmide, Gene und Genome	16
2.1.1 Organismen	16
2.1.2 Plasmide	17
2.1.3 Gene und Genome	19
2.2 Reagenzien und technische Gase.....	20
2.2.1 Kommerzielle Kits, Enzyme und Puffer	20
2.2.2 Selbst hergestellte Puffer	22
2.2.3 Technische Gase	22

Inhaltsverzeichnis

2.3	Medien und Medienzusätze	23
2.3.1	Aerobe Medien für <i>Escherichia coli</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.3.2	Anaerobe Medien für <i>Clostridium kluyveri</i>	24
2.3.3	Medienzusätze	27
2.3.4	Selektionsmarker	30
2.4	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	30
2.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	30
2.4.2	Kultivierung von Clostridien für mikrobiologische Arbeiten	30
2.4.3	Glycerin-Stocks für <i>E. coli</i>	31
2.4.4	Glycerin-Stocks für Clostridien	31
2.4.5	<i>C. kluyveri</i> Sporensuspension	31
2.4.6	Heterotrophe Co-Kultivierung in Serumfläschchen auf Glukose	31
2.4.7	Vorkulturen für den Rührkesselreaktor (LST für Bioverfahrenstechnik, TUM)	32
2.4.8	Autotrophe Co-Kultivierung im Rührkesselreaktor	33
2.4.9	Kultivierung von <i>C. kluyveri</i> im Rührkesselreaktor	33
2.5	Mikrobiologische Methoden	34
2.5.1	Durchlichtmikroskopie	34
2.5.2	Bestimmung der optischen Dichte im Photometer	34
2.5.3	Bestimmung der optischen Dichte mit dem Densitometer	35
2.5.4	Minimale Hemmkonzentration (MHK) in Flüssigmedium mit 96-Well-Platten	35
2.5.5	Minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Festmedium	36
2.5.6	Identifizierung von Bakterien anhand des 16S rRNA-Moleküls	36
2.6	Molekularbiologische Techniken	36
2.6.1	Extraktion von chromosomaler DNA aus Clostridien	36
2.6.2	Isolierung von Plasmid DNA	37
2.6.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	37
2.6.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
2.6.5	Präparative Polymerase-Kettenreaktion	37

Inhaltsverzeichnis

2.6.6	Analytische Polymerase-Kettenreaktion	38
2.6.7	16S rRNA-Polymerase-Kettenreaktion	39
2.6.8	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	39
2.6.9	Kontrollverdau von Plasmiden	40
2.7	Methoden zur Konstruktion von Plasmiden.....	40
2.7.1	Gibson Assembly (Gibson <i>et al.</i> 2009).....	40
2.7.2	Restriktionsbasierte Plasmidkonstruktion	41
2.7.3	Konstruktion von potenziellen Plasmiden für die <i>in vivo</i> Methylierung	42
2.7.4	Konstruktion von Thiolase-Expressionsplasmiden	43
2.7.5	Konstruktion von Basisvektoren für das <i>codBA</i> -basierte Plasmidsystem	44
2.7.6	Konstruktion von <i>codBA</i> -Deletionsplasmiden für das <i>C. kluyveri</i> Typ-II RM-Systems ..	44
2.8	Untersuchung von Restriktionsendonukleasen in <i>C. kluyveri</i>	45
2.8.1	Herstellung eines Zellextraktes, modifiziert nach Yang <i>et al.</i> (2016)	45
2.8.2	Restriktionsendonuklease Aktivitäts-Assay.....	46
2.9	Methoden zur Transformation von DNA.....	47
2.9.1	Hitzeschock Transformation von <i>E. coli</i>	47
2.9.2	Tri-parentale Konjugation von <i>C. kluyveri</i>	47
2.10	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	48
2.10.1	Oligonukleotidgensonden	48
2.10.2	Design und Analyse von FISH Oligonukleotidgensonden	49
2.10.3	Zellfixierung für FISH, modifiziert nach Amann (1995)	49
2.10.4	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	50
2.10.5	Epifluoreszenzmikroskopie.....	51
2.11	Arbeit mit RNA.....	51
2.11.1	Zellaufschluss mit der Kugelmühle.....	51
2.11.2	RNA-Isolierung mit dem TRIzol™ Reagenz.....	52
2.11.3	RNA-Isolierung mit dem FastRNA™ Pro Blue Kit.....	52
2.11.4	DNase I Verdau	53

Inhaltsverzeichnis

2.11.5	Fällung der RNA.....	53
2.11.6	Reverse Transkription.....	54
2.12	qRT-PCR Analysen.....	54
2.12.1	Etablierung des qRT-PCR Assays.....	54
2.12.2	Durchführung der qRT-PCR Messungen.....	55
2.12.3	Relative Quantifizierung.....	55
2.13	Sequenzierungen.....	56
2.13.1	Sanger Sequenzierung.....	56
2.13.2	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNAseq).....	56
2.14	Analytische und quantitative Methoden.....	57
2.14.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für organischen Säuren und Alkoholen.....	57
2.14.2	Bestimmung des Gesamtzellproteingehalts mit dem Bradford Assay.....	57
2.15	Software, Datenbanken und Onlineprogramme.....	57
2.15.1	Plasmidkonstruktion.....	57
2.15.2	Analyse von Genen und Genomen.....	58
2.15.3	Diagramme und Abbildungen.....	58
2.15.4	Analyse von Transkriptomdaten.....	59
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Entwicklung von neuen FISH-Sonden für <i>C. kluveri</i> und <i>C. carboxidivorans</i>	60
3.1.1	Vorversuche mit der für <i>C. kluveri</i> publizierte 16S rRNA FISH-Sonde KCLZ.....	60
3.1.2	Design von 23S rRNA Oligonukleotidsonden für <i>C. kluveri</i> und <i>C. carboxidivorans</i>	61
3.1.3	<i>In silico</i> Probe-Match Analysen für ClosKluy und ClosCarb.....	62
3.2	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für die FISH Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb.....	64
3.2.1	Bestimmung der Optimalen Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer ...	64
3.2.2	Lysozym-Behandlung für Gram-positive Clostridien.....	65
3.2.3	Bestätigung der Bindungsspezifität von ClosKluy und ClosCarb im Labor.....	66
3.3	Anwendung der FISH-Sonden für <i>C. kluveri</i> und <i>C. carboxidivorans</i> im Co-Kultur Kontext	68

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Hybridisierungsexperimente mit einer heterotrophen Co-Kultur	68
3.3.2	Hybridisierungsexperimente mit Proben einer autotrophen Co-Kultur	70
3.4	Etablierung eines festen Mediums für die genetische Arbeit mit <i>C. kluyveri</i>	71
3.4.1	Identifizierung eines geeigneten Puffersystems für das <i>C. kluyveri</i> Festmedium.....	71
3.4.2	Wachstum von <i>C. kluyveri</i> mit Acetat, Succinat und NaHCO ₃	73
3.4.3	Definition eines festen <i>C. kluyveri</i> Mediums: „TM 4040“	73
3.5	Minimale Hemmkonzentrationen für die genetische Arbeit mit <i>C. kluyveri</i>	75
3.5.1	Test verschiedener Antibiotika für die Selektion	75
3.5.2	Test von 5-FU und 5-FC für die Gegenselektion.....	77
3.6	Überwindung der Restriktions-/Modifikations-Systeme in <i>C. kluyveri</i>	77
3.6.1	Identifizierung potenzieller RM-System Gencluster im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM555 ^T 77	
3.6.2	Konstruktion von putativen Methylierungsplasmiden für <i>C. kluyveri</i>	79
3.6.3	Analyse der putativen Methylierungsplasmide mit einem zellfreien Extrakt (ZFE)	81
3.7	Transkonjugation von Shuttleplasmiden in <i>C. kluyveri</i>	83
3.7.1	Etablierung eines Konjugationsprotokolls für <i>C. kluyveri</i>	83
3.7.2	Nachweis einer ersten erfolgreichen Plasmidtranskonjugation in <i>C. kluyveri</i>	84
3.7.3	Test von verschiedenen Gram-positiven Replikons für Shuttleplasmide in <i>C. kluyveri</i>	85
3.8	Thiolase-Überexpression im <i>C. kluyveri</i> Wildtypstamm.....	87
3.8.1	Die Thiolasen im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM555 ^T	87
3.8.2	Generierung von <i>C. kluyveri</i> Transkonjuganten mit Thiolase-Expressionsplasmiden...	88
3.8.3	Phänotypische Analyse der <i>C. kluyveri</i> Transkonjuganten CK_Ra9#K2A und CK_Ra9#K2B	89
3.8.4	Nachweis der <i>C. acetobutylicum</i> Thiolase-mRNA im <i>C. kluyveri</i> Transkonjuganten mittels qRT-PCR	91
3.9	Konstruktion von <i>codBA</i> -Basisvektoren für <i>C. kluyveri</i>	92
3.9.1	Empty Shuttleplasmid pMS1_fdx	92
3.9.2	Empty Shuttleplasmid pMS1_upp und pMS2_upp	92
3.9.3	<i>In frame</i> Deletionsplasmide für das putativen Typ-II RM-Systems in <i>C. kluyveri</i>	93

Inhaltsverzeichnis

3.10	Untersuchung der CO-Toxizität in <i>C. kluyveri</i> durch Transkriptomanalyse.....	94
3.10.1	Fermentation von <i>C. kluyveri</i> mit kurzzeitiger CO-Begasung	94
3.10.2	Transkriptomanalyse von <i>C. kluyveri</i> mit bzw. ohne CO-Begasung	94
4	Diskussion.....	96
4.1	Design von FISH-Sonden für Co-Kulturen.....	96
4.1.1	Auswahl einer geeigneten Bindestelle für die Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb	96
4.1.2	Analyse der Bindungsspezifität von ClosKluy und ClosCarb.....	96
4.1.3	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für ClosKluy und ClosCarb	98
4.1.4	Limitierung der heterotrophen Glukose Co-Kultur von <i>C. kluyveri</i> und <i>C. carboxidivorans</i>	98
4.1.5	Praktische Anwendung der FISH-Sonden im Co-Kulturkontext	99
4.2	TM 4040 als neue festes Medium für <i>C. kluyveri</i>	100
4.2.1	Anforderungen an das neue feste <i>C. kluyveri</i> Medium.....	100
4.2.2	Die wichtige Rolle von CO ₂ für das Wachstum von <i>C. kluyveri</i>	101
4.2.3	Auswahl eines geeigneten Puffersystems für das Festmedium.....	101
4.2.4	Eine optimierte Substratzusammensetzung für das <i>C. kluyveri</i> Festmedium.....	102
4.3	Vorbereitungen für die genetische Arbeit mit <i>C. kluyveri</i>	104
4.3.1	Antibiotikasensitivität von <i>C. kluyveri</i>	104
4.3.2	Eliminierung von <i>E. coli</i> nach der Konjugation.....	105
4.3.3	Etablierung eines Konjugationsprotokolls für <i>C. kluyveri</i>	106
4.4	<i>In vivo</i> Methylierungssystem zur Überwindung der RM in <i>C. kluyveri</i>	107
4.4.1	Charakterisierung der potenziellen RM-Systeme in <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	107
4.4.2	Plasmidübertragung mittels <i>in vivo</i> Methylierung	109
4.4.3	Mögliche Auswirkung der Restriktionssysteme auf die Transformationseffizienz	110
4.4.4	Promotoren für die <i>in vivo</i> Methylierung in <i>E. coli</i>	112
4.5	Herausforderungen bei der Arbeit mit den <i>codBA</i> -Genen.....	114
4.5.1	Voraussetzungen für die Verwendung von <i>codBA</i> in <i>C. kluyveri</i>	114
4.5.2	Unterschiede der <i>codBA</i> -Basisvektoren	114

Inhaltsverzeichnis

4.5.3	Mögliche Probleme mit dem clostridialen <i>codBA</i> -Gen aus pChN in <i>E. coli</i>	115
4.5.4	Suche nach einem geeigneten Promotor für <i>codBA</i> in <i>E. coli</i>	116
4.5.5	Auswahl einer passenden Flanken-Insertionsstelle bei <i>codBA</i> -Plasmiden	117
4.5.6	Arbeit mit dem sekundären Gärer <i>C. kluyveri</i>	118
4.5.7	Auswahl eines geeigneten Gram-positiven Replikationsursprungs	119
4.6	Metabolic Engineering der C-Kettenverlängerung von <i>C. kluyveri</i>	121
4.6.1	Enzyme der C-Kettenverlängerung von <i>C. kluyveri</i>	121
4.6.2	Das Thiolase-Gencluster von <i>C. kluyveri</i>	121
4.6.3	Episomale Expression einer Thiolase aus <i>C. acetobutylicum</i> in <i>C. kluyveri</i>	123
4.6.4	Metabolic Engineering auf Basis der nativen <i>C. kluyveri</i> Thiolasen	124
4.6.5	Metabolic Engineering über eine Alkohol Aldehyd Dehydrogenase (AdhE).....	126
4.6.6	Untersuchungen zur CO-Sensitivität von <i>C. kluyveri</i>	126
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	129
5	Literaturverzeichnis.....	131
6	Anhang.....	148
6.1	Primersequenzen.....	148
6.2	Plasmidkarten.....	153
6.3	Potenzielle RM-System-Gene im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	157
6.4	Potenzielle Thiolase-Gene im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	158
6.5	Transkriptomanalyse	158
6.6	Chemikalien und Geräte.....	161
	Abkürzungsverzeichnis	163
	Tabellenverzeichnis	164
	Abbildungsverzeichnis.....	166
	Veröffentlichungen.....	168
	Danksagung	169

Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die CO₂-neutrale Synthese von Chemikalien und Biokraftstoffen über autotrophe, acetogene Fermentation einen großen Bedeutungszuwachs erfahren. Hierbei wird ein Gasgemisch aus CO, CO₂ und H₂ (= Syngas) über autotrophe, acetogene Bakterien wie *Clostridium carboxidivorans* hauptsächlich zu Ethanol und Acetat umgesetzt. Sekundäre Gärer wie *Clostridium kluyveri* nutzen diese Fermentationsprodukte zur Energiegewinnung und verlängern dabei über reverse β -Oxidation die C-Ketten organischer Säuren. *C. kluyveri* ist daher nicht nur als Partner für die Co-Kultivierung mit acetogenen Bakterien von Interesse, sondern könnte für diesen Zweck auch durch Metabolic Engineering optimiert werden. Bis jetzt wurde jedoch noch kein Protokoll zur Transformation von *C. kluyveri* mit DNA publiziert.

Zum Monitoring der Co-Kultur während der autotrophen Fermentation wurden mit ClosKluy und ClosCarb Sequenzen für neue, auf *C. kluyveri* bzw. *C. carboxidivorans* abzielende Oligonukleotidsonden für *Fluorescence-in-situ-hybridization* (FISH) auf Basis einer aktuellen 23S rRNA-Datenbank abgeleitet. Die am Computer und im Labor durchgeführten Analysen ergaben hierbei eine hohe Spezifität für die *C. kluyveri* spezifische Sonde ClosKluy. Die auf *C. carboxidivorans* abzielende ClosCarb-Sonde ist nicht streng artspezifisch, da sie zwar nicht an Zellen von *C. kluyveri*, aber möglicherweise an Zellen von *C. scatologenes* bzw. *C. drakei* bindet. Für beide Sonden lag das Formamidooptimum im Hybridisierungspuffer bei 30 % (v/v). Mit ClosKluy und ClosCarb war eine individuelle Fluoreszenzmarkierung der Zellen zur Unterscheidung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* in unterschiedlichen Co-Kulturproben möglich.

Für die genetische Arbeit mit *C. kluyveri* wurde zunächst TM 4040 erfolgreich als neues festes Medium für diesen Stamm etabliert. In diesem wurden die C-Quellen Ethanol, Acetat, Succinat und NaHCO₃ mit dem Zwitterionenpuffer MOPS kombiniert. Eine Analyse des Genoms von *C. kluyveri* DSM 555^T zeigte 21 potenzielle, Restriktions-/Modifikations- (RM-) System-assoziierte Gene auf, darunter drei Gencluster für möglicherweise vollständig codierte RM-Systeme. Zur stabilen Übertragung von Fremd-DNA in den Zielorganismus *C. kluyveri* wurden mit fünf potenziellen Methyltransferase- (MTase-) Genen Plasmide für die *in vivo* Methylierung konstruiert. Im Anschluss konnte gezeigt werden, dass verschiedene *Clostridium-E. coli*-Shuttle-Plasmide nicht mehr durch einen zellfreien Extrakt von *C. kluyveri* abgebaut wurden, wenn vorab für die *in vivo* Methylierung ein *E. coli* Stamm mit pCKL_2671 mit dem Typ-II MTase-Gen CKL_2671 verwendet wurde. Dieser Effekt konnte bei *E. coli* Stämmen mit anderen MTase-Genen nicht beobachtet werden, was auf eine dominante Rolle des Typ-II-RM-Systems in *C. kluyveri* hindeutet. Unter Verwendung von pCKL_2671 im für die Konjugation eingesetzten *E. coli* Stamm konnten zum ersten Mal verschiedene Shuttleplasmide erfolgreich in *C. kluyveri* transkonjugiert werden. Diese Shuttleplasmide enthielten

Zusammenfassung

neben einer Thiamphenicol-Resistenzkassette den Gram-positiven Replikationsursprung CB102 oder BP1.

Zur Untersuchung der C-Kettenverlängerung wurde zudem ein Expressionsplasmid mit einem Thiolase-Gen aus *C. acetobutylicum* (CA_RS14790) über tri-parentale Konjugation in *C. kluyveri* eingebracht. Die daraus resultierende Transkonjugante CK_Ra9 zeigte im Vergleich zur Transkonjugante CK_82 mit leerem Plasmid eine gesteigerte Butyrat- und zugleich eine gehemmte Hexanoatbildung, was auf eine wichtige Rolle der Thiolasereaktion auf die Kettenverlängerung der im Gärungsstoffwechsel produzierten Fettsäuren hinweist.

Schließlich erlaubte eine mit *C. kluyveri* in einem Rührkesselreaktor durchgeführte Transkriptomstudie einen ersten Einblick in den molekularen Mechanismus der durch CO induzierten Wachstumsinhibierung in diesem Organismus. Hierbei deuten die erhaltenen Transkriptomdaten darauf hin, dass in diesem Zusammenhang eine reversible Hemmung der [FeFe] Hydrogenasen in *C. kluyveri* relevant sein könnte.

Summary

In recent years, the CO₂-neutral synthesis of chemicals and biofuels via autotrophic, acetogenic fermentation has raised much attention. Here, a mixture of CO, CO₂ and H₂ (= syngas) is converted mainly to ethanol and acetate via autotrophic, acetogenic bacteria such as *Clostridium carboxidivorans*. Secondary fermenters such as *Clostridium kluyveri* use these fermentation products for energy production and while doing so extend the chain length of organic acids via reverse β -oxidation. This makes *C. kluyveri* an interesting partner for co-cultivation with acetogenic bacteria, which could also be optimized for this purpose by metabolic engineering. However, no protocol for the transconjugation of DNA in *C. kluyveri* has been published to date.

For co-culture monitoring during autotrophic fermentation, the two new oligonucleotide probes for *fluorescence-in-situ-hybridization* (FISH), designated ClosKluy and ClosCarb, targeting *C. kluyveri* and *C. carboxidivorans*, respectively, were designed via the use of a comprehensive 23S rRNA database. Experimental and bioinformatic analysis revealed a high specificity for the *C. kluyveri*-specific probe ClosKluy. The ClosCarb probe targeting *C. carboxidivorans* is not strictly species-specific, because ClosCarb possibly also targets *C. scatologenes* or *C. drakei*, but importantly does not bind to cells of *C. kluyveri*. For both probes, the optimal formamide concentration in the hybridization buffer was 30 % (v/v). ClosKluy and ClosCarb allowed individual fluorescent labeling of cells in order to distinguish between *C. kluyveri* and *C. carboxidivorans* in co-culture samples.

For the genetic modification of *C. kluyveri*, TM 4040 was successfully established as a new solid medium for this strain. In TM 4040, the carbon sources ethanol, acetate, succinate and NaHCO₃ were combined with the dipolar (zwitter-ionic) buffer MOPS. Analysis of the *C. kluyveri* DSM 555^T genome sequence revealed 21 potential restriction/modification (RM) -system-associated genes, including three gene clusters for possible complete RM-systems. To achieve stable transfer of foreign DNA into *C. kluyveri*, different *in vivo* methylation plasmids were constructed using five potential methyl transferase (MTase) genes. Subsequently, it was shown that several *Clostridium-E. coli*-shuttle plasmids were no longer degraded by a cell-free extract of *C. kluyveri* when an *E. coli* strain with pCKL_2671 containing the type II MTase gene *CKL_2671* was used for *in vivo* methylation of the plasmids. This effect could not be observed by using *E. coli* strains harboring plasmids carrying other MTase genes, suggesting a dominant role of the type II RM system in *C. kluyveri*. Using pCKL_2671 in the *E. coli* transconjugation host, for the first time several shuttle plasmids could be successfully transconjugated into *C. kluyveri*. These shuttle plasmids contained the Gram-positive origin of replication CB102 or BP1 in addition to a thiamphenicol resistance cassette.

To study chain elongation, an expression plasmid containing a thiolase gene from *C. acetobutylicum* (*CA_RS14790*) was introduced into *C. kluyveri* via tri-parental conjugation. The resulting CK_Ra9

Summary

transconjugants showed increased butyrate and simultaneously reduced hexanoate formation but also inhibited hexanoate formation compared to CK_82 control transconjugants with the empty plasmid. This indicates an important role of the thiolase reaction for the chain length distribution of the fatty acids produced during fermentation.

Finally, a transcriptome study performed with *C. kluyveri* in a stirred tank bioreactor provided a first insight into the molecular mechanism of CO-induced growth inhibition observed for this organism. To this end, the transcriptomic data suggest that reversible inhibition of [FeFe] hydrogenases in *C. kluyveri* may be relevant in this context.

1 Einleitung

1.1 Clostridien als Biokatalysatoren in der Biotechnologie

1.1.1 Metabolische Eigenschaften der Clostridien

Ursprünglich wurde die Gattung *Clostridium* 1880 beschrieben, um Gram-positive, sporenbildende und anaerobe Bakterien zusammenzufassen (Prazmowski 1880). Seitdem befindet sich die Taxonomie dieser Bakteriengruppe in einem stetigen Wandel und die Klassifizierung wurde mehrfach überarbeitet (Collins *et al.* 1994, Lawson *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2018). Ein Grund hierfür ist die stark ausgeprägte phänotypische Heterogenität innerhalb dieser Gruppe. Einige Arten sind pathogen (Paredes *et al.* 2005), darunter die Lebensmittelverderber *Clostridium botulinum* und *Clostridium difficile* (*Clostridioides difficile*). Andere sind wiederum aufgrund ihrer vielseitigen, metabolischen Eigenschaften für die Herstellung von Biokraftstoffen und Chemikalien von besonderem Interesse (Tracy *et al.* 2012). Sie reichen von zellulolytischen über acetogene und solventogene bis hin zu Fettsäure-kettenverlängernden Arten (Charubin *et al.* 2018). Daher ist es nicht verwunderlich, dass ihr Substratspektrum äußerst breit gefächert ist. Es umfasst neben Zucker, Alkoholen, Aminosäuren, Purinen, Pyrimidinen und Polymeren wie Stärke und Zellulose auch Kohlenmonoxid (CO) und Kohlendioxid (CO₂) (Wood 1991, Dürre 2014).

1.1.2 Clostridien als vielfältige Synthese-Plattformen durch genetische Modifikation

Damit ein Clostridium zu einer geeigneten Plattform für die Synthese neuer Produkte entwickelt werden kann, sollte der jeweilige Stamm einige Anforderungen erfüllen. Dazu zählen, neben einem sorgfältig annotierten Genom und einem guten Verständnis der Physiologie auch die Möglichkeit, Werkzeuge zur genetischen Modifikation in diesem Organismus leicht anwenden zu können (Papoutsakis 2015). Dies trifft insbesondere auf einige Vertreter der solventogenen Stämme zu (z.B. *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* und *Clostridium pasteurianum*), welche zur industriellen Produktion von Aceton-Butanol-Ethanol (ABE) eingesetzt werden (Charubin *et al.* 2018). Aber auch Acetogene (*Acetobacterium woodii*, *Clostridium ljungdahlii* und *Clostridium autoethanogenum*) rücken aufgrund ihrer Fähigkeit zur autotrophen CO₂-Fixierung mehr und mehr in den Fokus der genetischen Arbeit (Bengelsdorf *et al.* 2018). Ein Grund ist hierfür, wie in Kapitel 1.1.3 erläutert, die vielversprechende Nutzung acetogener Bakterien für die Syngas-Fermentation. Sie wird bereits von einigen Firmen (Coscata, INEOS Bio, LanzaTech) zur kommerziellen Herstellung von flüssigen Kraftstoffen genutzt (Daniell *et al.* 2012). Daher besteht in diesem Zusammenhang ein besonders großes Interesse an der genetischen Optimierung dieser Stämme.

Einleitung

Eine Möglichkeit zur Verbesserung des Produktspektrums von Acetogenen ist die heterologe Expression von Stoffwechselwegen in diesen Stämmen. Beispielhaft kann in diesem Zusammenhang die genetische Arbeit mit *C. ljungdahlii* genannt werden. In diesen Stamm wurden bisher nicht nur Gene aus *C. acetobutylicum* für die Synthese von Butanol bzw. Aceton (Köpke *et al.* 2010, Banerjee *et al.* 2014), sondern auch Gene zur Hexanol-Biosynthese aus *Clostridium kluyveri* (Lauer *et al.* 2022) erfolgreich eingebracht. Die direkte genetische Modifizierung eines C-Kettenverlängernden Clostridiums wie *C. kluyveri* wurde bisher jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben.

Eines der bekanntesten Werkzeuge zur genetischen Arbeit in Clostridien ist das Clostron System, welches mit einem mobilen Intron der Gruppe II aus dem *ItrB* Gen von *Lactococcus lactis* (LI.ItrB) arbeitet (Heap *et al.* 2007). Auch wenn die damit generierten Mutanten zügig gewonnen werden und relativ stabil sind, können hiermit Gene nicht vollständig eliminiert, sondern durch das im Genom zurückbleibende Intron nur funktional unterbrochen werden (Joseph *et al.* 2018). Für die Generierung von kompletten Gen *Knock-outs* oder *Knock-ins* sind daher Methoden notwendig, die auf zwei aufeinander folgenden, homologen Rekombinationen eines Plasmids ins Genom basieren. Hierfür wird für die initiale chromosomale Integration eine Selektionsmethode (meist mit einem Antibiotikaresistenzmarker) und für die darauffolgende zweite Rekombination eine geeignete Gegenselektionsmethode benötigt. Eine aktuell populäre Gegenselektionsmethode ist CRISPR/Cas9 ("clustered regularly interspaced short palindromic repeats" / "CRISPR-associated proteins") aus *Streptococcus pyogenes* (Joseph *et al.* 2018). Die Anwendung dieses Systems war in der Vergangenheit bei Clostridien insbesondere durch zwei Aspekte ineffektiv. Zum einen kann das Cas9-Enzym mitunter auch unspezifisch schneiden, weshalb die Expression dieses Gens im Zielorganismus sorgfältig zu regulieren ist (Cañadas *et al.* 2019). Zum anderen erfolgt die CRISPR/Cas9 Genom-Editierung über sehr große Plasmide, womit sich Clostridien meist nur schwer transformieren lassen (Wasels *et al.* 2017). Letzteres ist vor allem bei der genetischen Arbeit mit Wildtyp Bakterienstämmen ein großer Nachteil.

Andere Systeme benötigen wiederum einen spezifischen genetischen Hintergrund im Zielorganismus, wie zum Beispiel die Abwesenheit von *galK* (Galactokinase), *pyrF* (Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase) und *upp* (Uracil Phosphoribosyl-transferase) (Ehsaan *et al.* 2016). Das *codBA* System umgeht dieses Problem, indem es für die Gegenselektion das *upp* Gen eines Zielorganismus verwendet und somit die vorherige Deletion dieses Gens unnötig macht. Es ist daher für viele Wildtyp Bakterienstämme gut geeignet (Kostner *et al.* 2013, Huang *et al.* 2018).

1.1.3 Syngas als Ausgangsstoff für bakterielle Fermentationsprozesse

Vor allem im Bereich der Biokraftstoffproduktion spielt die Wahl eines geeigneten Ausgangsstoffs für die Fermentation eine entscheidende Rolle. Wurden früher noch vor allem landwirtschaftliche Nutzpflanzen als Zucker- und Stärke-Quellen für die Herstellung von Biokraftstoffen verwendet, werden dafür heutzutage bevorzugt pflanzliche Abfälle genutzt, um eine Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion zu vermeiden (Naik *et al.* 2010). Trotzdem können auch Fermentationsprozesse mit diesen Substraten noch nicht als nachhaltig angesehen werden, da anzunehmen ist, dass der in der Biomasse enthaltene Kohlenstoff von den Bakterien zumeist nicht vollständig genutzt werden kann (Liew *et al.* 2016). Dies trifft insbesondere auf das in organischen Materialien enthaltene, natürlich vorkommende Lignin zu, welches von anaeroben Bakterien nicht abgebaut werden kann (Khan *et al.* 2019). Die limitierte Abbaubarkeit organischer Biomasse kann auch durch intensiven bakteriellen Synergismus, wie er beispielsweise im Mikrobiom von Biogasanlagen herrscht, nur schwer überwunden werden (Lynd *et al.* 2002, Zverlov *et al.* 2014). Und auch die komplexen chemischen Strukturen in Plastikabfällen, darunter insbesondere aromatische Polyester, gelten als nahezu vollständig resistent gegenüber bakteriellem Abbau (Müller *et al.* 2001).

In diesem Zusammenhang bietet die bakterielle Gasfermentation einige entscheidende Vorteile. Hierbei dient Synthesegas (kurz: Syngas) als Ausgangsstoff für die Gewinnung von biobasierten Kraftstoffen und anderen Produkten (Bengelsdorf *et al.* 2013). Syngas setzt sich hauptsächlich aus Kohlenmonoxid (CO), Kohlendioxid (CO₂) und Wasserstoff (H₂) zusammen (Diender *et al.* 2016, Liew *et al.* 2016). Zur Gewinnung von Syngas werden kohlenstoffhaltige Materialien bei hohen Temperaturen (600-1.000°C) und Druck (>30 bar) unter sauerstofflimitierten Bedingungen verbrannt (Breault 2010, Griffin *et al.* 2012). Damit können theoretisch alle kohlenstoffhaltigen organischen und anorganischen Abfälle in Syngas umgewandelt werden. Durch die unvollständige Verbrennung steht im Anschluss der in den Ausgangsstoffen enthaltene Kohlenstoff nahezu vollständig für den Fermentationsprozess zur Verfügung (Liew *et al.* 2016). Zudem wird Syngas auch als CO-reiches Abfallgas bei verschiedenen industriellen Prozessen in die Atmosphäre freigesetzt, wodurch es zudem auch maßgeblich zur Emission schädlicher Treibhausgase beiträgt (Molitor *et al.* 2016a).

Insgesamt kann Syngas daher als eine vielversprechende Rohstoffbasis für umweltfreundliche Produktionsverfahren eingestuft werden. Die Weiterverarbeitung des Syngas in Chemikalien und Kraftstoffe kann sowohl über chemisch-thermische Verfahren (Fischer-Tropsch) als auch über Bakterien als Biokatalysatoren erfolgen (Bengelsdorf *et al.* 2013). Letztere zeichnen sich hierbei insbesondere durch eine Toleranz bezüglich Verunreinigungen und schwankenden Zusammensetzungen des Syngases aus (Griffin *et al.* 2012).

Mögliche Biokatalysatoren für fermentative Syngasverwertung sind acetogene Bakterien, da diese über den Wood-Ljungdahl bzw. Reduktiven Acetyl-CoA Weg Kohlenstoff fixieren können, indem sie CO und/oder CO₂ mit H₂ reduzieren (Ljungdahl 1986, Wood 1991). Das bei der Fermentation von Syngas freigesetzte Produktspektrum ist vielfältig und reicht von Acetat über verschiedene andere Säuren (Lactat, Butyrat, Hexanoat) und 2,3-Butanediol bis hin zu den Lösungsmitteln Ethanol, Butanol und Hexanol (Bengelsdorf *et al.* 2018). Neben *A. woodii* sind innerhalb der Gruppe der acetogenen Bakterien vor allem die Clostridien bisher am besten charakterisiert worden (Schiel-Bengelsdorf *et al.* 2012).

Fermentationsstudien haben bereits gezeigt, dass mit dem acetogenen *Clostridium carboxidivorans* eine Umsetzung von CO-reichen Mischgasen zu Alkoholen im Labor möglich ist (Phillips *et al.* 2015, Doll *et al.* 2018, Rückel *et al.* 2021). Der Batchfermentationsprozess läuft mit *C. carboxidivorans* in zwei Phasen ab. Während der ersten Phase werden vor allem Säuren gebildet („acidogene Phase“), wodurch der pH im Medium absinkt. Diese Änderung des pH-Werts induziert eine zweite Phase, bei welcher die zuvor gebildeten Säuren zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert werden („solventogene Phase“) (Ukpong *et al.* 2012).

Insgesamt bildet *C. carboxidivorans* aus CO vor allem kurzkettige Alkohole. So resultierten drei unterschiedliche Batchfermentationen mit *C. carboxidivorans* nach Doll *et al.* (2018) in 26-58 mM Ethanol, wohingegen wenn überhaupt lediglich Spuren von Butanol und Hexanol nachweisbar waren. Durch eine Optimierung des Prozesses konnte die Synthese von Ethanol auf 71 mM gesteigert werden, die Butanol- und Hexanol-Menge blieb hingegen nahezu unverändert (9,4 mM bzw. 0,9 mM). Hexanol ist aufgrund seiner höheren Energiedichte jedoch besser für die Verwendung in Kraftstoffen geeignet als Ethanol oder Butanol (De Pours *et al.* 2017). Daher wäre eine möglichst effektive Synthese von Hexanol aus CO/CO₂ durch *C. carboxidivorans* wünschenswert. Da die Konstruktion eines rekombinanten acetogenen Stamms bisher leider nur wenig erfolgreich war (Bengelsdorf *et al.* 2018), wäre eine Co-Kultivierung von *C. carboxidivorans* mit einem C-Kettenverlängernden Organismus wie *C. kluyveri* vielversprechend.

1.1.4 Potential von Clostridium Co-Kulturen auf Syngas

Potenziell bieten bakterielle Co-Kulturen für biotechnologische Anwendungen im Vergleich zu Monokulturen einige Vorteile. In synthetischen Co-Kulturen können nicht nur Organismen mit verschiedenen Fermentationstypen, sondern auch mit der Fähigkeit zum Abbau unterschiedlicher Substrate miteinander kombiniert werden. Damit steht bei Fermentationen mit bakteriellen Co-Kulturen im Vergleich zu den Monokulturen sowohl eine größere Auswahl an möglichen Substraten, als auch von Endprodukten zur Verfügung (Du *et al.* 2020).

Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten wurde insbesondere an synthetischen Co-Kulturen mit solventogenen oder zellulolytischen Clostridien geforscht (Du *et al.* 2020). Doch auch acetogene und kettenverlängernde Clostridien könnten in Kombination für Co-Kulturen vielversprechend sein. So könnte in diesen Fermentationen Syngas anstatt von Biomasse als Ausgangssubstrat eingesetzt werden, wodurch der Kohlenstoff besser für die Bakterien verfügbar ist (vgl. Kapitel 1.1.3). Zudem könnten die kurzkettigen Fermentationsprodukte von acetogenen Clostridien (Ethanol, Acetat) durch einen kettenverlängernden Co-Kultur-Partner wie beispielsweise *C. kluyveri* zu mittelkettigen Produkten umgesetzt und dadurch energetisch aufgewertet werden (Gildemyn *et al.* 2017). *C. kluyveri* ist ein sekundärer Gärer, welcher durch die Vergärung von Ethanol und Acetat längerkettige Produkte bildet. Der hierfür zugrunde gelegte Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.1 auf Seite 11 veranschaulicht.

Bisher wurde *C. kluyveri* unter anderem mit den acetogenen Bakterien *C. ljungdahlii* (Richter *et al.* 2016b), *C. autoethanogenum* (Diender *et al.* 2016) oder auch *Clostridium aceticum* (Fernández-Blanco *et al.* 2022) co-kultiviert. Gemeinsam mit *C. ljungdahlii* konnte so bereits Butanol und Hexanol, sowie geringe Mengen an Oktanol in einem Rührkesselreaktor produziert werden (Richter *et al.* 2016b).

Bei Co-Kulturen mit *C. kluyveri* scheint vor allem das vom acetogenen Partner gebildete Ethanol kritisch für die Produktion mittelkettiger Produkte zu sein, da für diesen Stamm das Verhältnis von Ethanol zu Acetat wichtig ist, um die Redox-Bilanz auszugleichen (Seedorf *et al.* 2008). So war beispielsweise bei der Co-Kultur aus *C. kluyveri* mit *C. aceticum* die externe Zugabe von Ethanol für eine effektive Bildung von Butyrat und Hexanoat nötig. Vermutlich war bei diesem Ansatz die Ethanol-Bildungsrate von *C. aceticum* für *C. kluyveri* nicht ausreichend (Fernández-Blanco *et al.* 2022). Die Verfügbarkeit von Ethanol sollte daher bei der Entwicklung von neuen Co-Kultur-Ansätzen mit *C. kluyveri* besonders berücksichtigt werden.

C. carboxidivorans wurde als autotrophe Monokultur auf Syngas bereits detailliert im Labor untersucht (Phillips *et al.* 2015, Doll *et al.* 2018, Rückel *et al.* 2021). Das Wachstum von *C. carboxidivorans* kann ähnlich wie bei anderen acetogenen Clostridien in eine acetogene und eine nachfolgende solventogene Phase eingeteilt werden (Ukpong *et al.* 2012). Allerdings produziert *C. carboxidivorans* schon zu Beginn der Syngas-Fermentation nachweislich Ethanol. So konnten in der Syngas-Fermentation von Doll *et al.* (2018) mit *C. carboxidivorans* in der acetogenen Phase bereits 71 mM Ethanol und 50 mM Acetat gemessen werden. Bei einer vergleichbaren Syngas-Fermentation mit *C. ljungdahlii* nach Richter *et al.* (2016a) betragen die gemessenen Produktmengen der acetogenen Phase hingegen 12 mM Ethanol und 84 mM Acetat. Aufgrund der Beobachtung von Doll *et al.* (2018) könnte *C. carboxidivorans* ein geeigneter Co-Kultur-Partner für *C. kluyveri* sein. Damit ist

diese Co-Kultur ein neuer, vielversprechender Ansatz für die Produktion von mittelkettigen Alkoholen aus Syngas.

1.2 Fluoreszenzmarkierung zur Überwachung von synthetischen Co-Kulturen

1.2.1 Strategien zur Überwachung von Co-Kulturen während der Fermentierung

Bei der Entwicklung neuer Co-Kulturen steht insbesondere die Optimierung von Fermentationsparametern im Vordergrund. Ein wichtiger zu untersuchender Parameter ist hierbei der pH-Wert des Mediums, welcher sowohl das Wachstum, als auch die Metabolitproduktion der im Fermenter koexistierenden Organismen beeinflussen kann (Ganigue *et al.* 2016, Richter *et al.* 2016b). Die Stabilität des Systems lässt sich in diesem Zusammenhang anhand der Biomasse-Zusammensetzung verfolgen (Du *et al.* 2020). Dazu muss es jedoch möglich sein, die jeweiligen Organismen in Fermentationsproben eindeutig zu identifizieren. Hierfür stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung.

Zum einen können PCR-basierte Techniken wie die Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet werden. Über diese in der mikrobiologischen Diagnostik häufig eingesetzte Methode können Mikroorganismen in Proben schnell und präzise quantifiziert werden (Postollec *et al.* 2011). Standardmäßige qPCR-Protokolle vervielfältigen jedoch genomische DNA und ermöglichen es somit nicht, zwischen toten und lebenden Zellen zu unterscheiden (Alvarez *et al.* 2013), wobei aber nur letztere aktiv zur Produktbildung beitragen können. Außerdem können über PCR weder morphologische Veränderungen der Zellen, noch ihre Verbindung mit anderen Zellen während der Fermentation überwacht werden. Diese könnten jedoch auch für Co-Kulturen im Labor eine wichtige Rolle spielen. So wurden erst kürzlich für *C. acetobutylicum* mögliche Hinweise auf eine enge Assoziation oder gar heterologe „Fusion“ der Zellen von *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* während der Co-Kultivierung entdeckt (Charubin *et al.* 2020a, Otten *et al.* 2022). Solche „Zellfusionen“ dienen möglicherweise dem Austausch von Zellmaterialien, RNA und Proteinen, wodurch die metabolischen Netzwerke von beiden Organismen intensiv miteinander verknüpft sein sollen, sodass auch normalerweise nicht gebildete Produkte entstehen können (Charubin *et al.* 2019, Charubin *et al.* 2020a).

Um die genannten Einschränkungen zu überwinden, könnten PCR-basierte Quantifizierungstechniken zusätzlich durch klassische, mikrobiologische Verfahren ergänzt werden. Infrage kommen hierzu die Zellzahlbestimmung unter dem Mikroskop oder eine Evaluation der koloniebildenden Einheiten (KBE). Dies ist jedoch zeitaufwändig und ist nicht für Organismen geeignet, welche eine ähnliche Zell- oder Koloniemorphologien aufweisen (Du *et al.* 2020). Alternativ zu den bereits genannten Methoden kann die Dynamik einer bakteriellen Population auch über Durchflusszytometrie überwacht werden. Hierzu werden die einzelnen Organismen vorab mit individuellen

Fluoreszenzmarkierung versehen (Tracy *et al.* 2010, Charubin *et al.* 2018). Bei der Verwendung von Fluoreszenzmarkern in anaeroben Bakterien gilt es jedoch, wie im folgenden Abschnitt näher erläutert, einiges zu beachten.

1.2.2 Fluoreszenzproteine für die Anwendung in Clostridien

Fluoreszenzproteine sind ein unverzichtbares Hilfsmittel für den Bereich der bakteriellen Co-Kulturen. Sie ermöglichen nicht nur eine Unterscheidung zwischen den verwendeten Stämmen, sondern auch eine Überwachung der Kulturdynamiken während eines Fermentationsprozesses (Charubin *et al.* 2018). Allerdings sind viele handelsübliche Fluoreszenzproteine aus verschiedenen Gründen nicht für anaerobe Organismen wie Clostridien geeignet.

So kann das „green fluorescent protein“ (GFP) zwar aufgrund seiner geringen Größe leicht in Bakterien exprimiert werden und erzeugt danach ein starkes Fluoreszenzsignal (Heim *et al.* 1994). Allerdings ist in der ursprünglichen Variante des GFP die Reifung des Fluoreszenzchromophors sauerstoffabhängig (Heim *et al.* 1994), und auch neuere Derivate des GFP müssen im Anschluss an ihre anaerobe Expression noch immer kurzzeitig durch Sauerstoff aktiviert werden. Dadurch sind sie, wenn überhaupt, lediglich für aerotolerante oder fakultativ anaerobe Organismen geeignet (Tracy *et al.* 2010, Charubin *et al.* 2018). Im Gegensatz dazu werden so genannte Flavin-bindende Fluoreszenz-Proteine (FbFP) nicht über Sauerstoff, sondern über ein Flavin-Mononukleotid (FMN) als Cofaktor aktiviert (Drepper *et al.* 2007). Die für die Expression in Clostridien entwickelten FbFP-Derivate „Evoglow“ wurden bereits erfolgreich unter anderem in *C. acetobutylicum*, *C. ljungdahlii* und *Clostridium pasteurianum* verwendet (Bruder *et al.* 2016a, Molitor *et al.* 2016b). Leider sind die von FbFP emittierten, cyan-grünen Fluoreszenzsignale deutlich schwächer als die des ebenfalls grün fluoreszierenden GFP (Gyulev *et al.* 2018).

Aktuell gilt das „fluorescence-activating and absorption-shifting tag“ (FAST) Protein als das am vielversprechendste Reporterprotein für Clostridien. Hier wird durch die Bindung eines nicht-toxischen Fluorogens ein sauerstoffunabhängiges und gleichzeitig helles Fluoreszenzsignal generiert (Plamont *et al.* 2016). Das Fluorogen ist in verschiedenen Varianten mit jeweils unterschiedlichen spektralen Eigenschaften erhältlich (Li *et al.* 2017). Somit ergibt sich ein breites Feld möglicher Anwendungen in anaeroben Organismen, darunter Studien zur Promotoraktivität, Genexpression, oder auch Proteinlokalisierung innerhalb der Zelle (Streett *et al.* 2019, Chekli *et al.* 2020, Flaiz *et al.* 2022, Mook *et al.* 2022). Ähnlich wie das FAST-Protein wurden auch HaloTag und SNAP-Tag bereits erfolgreich als Zwei-Komponenten Reportersysteme zur Markierung der strikten Anaerobier *C. acetobutylicum* und *C. ljungdahlii* verwendet (Streett *et al.* 2019, Charubin *et al.* 2020b). Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von Reportersystemen wie dem FAST ist jedoch die

Transformierbarkeit der jeweiligen Organismen. Obwohl auf dem Gebiet der genetischen Werkzeuge für Clostridien in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden konnten (Minton *et al.* 2016, Joseph *et al.* 2018), ist die Zahl der etablierten Transformationsprotokolle noch immer begrenzt (Charubin *et al.* 2018). Daher sollte eine Fluoreszenzmarkierungsmethode für Clostridien im besten Fall nicht nur unabhängig von Sauerstoff, sondern auch von der Transformierbarkeit der zu untersuchenden Stämme sein.

1.2.3 Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Eine weit verbreitete Methode zur Markierung von Wildtyp-Bakterien ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Die FISH-Methode wurde in den späten 1980er Jahren entwickelt und basiert auf einer spezifischen Bindung von Oligonukleotidsonden an ribosomale RNA-Sequenzen (rRNA) in ganzen, intakten Zellen (DeLong *et al.* 1989, Amann *et al.* 1990a). Es handelt sich um eine kulturunabhängige Identifizierungstechnik für Mikroorganismen in verschiedenen Proben, wie z.B. aus den Bereichen Umwelt (Amann *et al.* 1990a, Pernthaler *et al.* 2002), Medizin (Hogardt *et al.* 2000, Poppert *et al.* 2005, Aistleitner *et al.* 2020) oder Lebensmittelindustrie (Ding *et al.* 2014, Rohde *et al.* 2015). Die FISH ermöglicht zudem in Anschluss an die Zellfärbung eine Vielzahl weiterer Anwendungen. So können beispielsweise über eine Durchflusszytometrie Zellzahlen in einer Probe bestimmt oder diese für nachgeschaltete genomische Anwendungen sortiert werden (Kalyuzhnaya *et al.* 2006, Yilmaz *et al.* 2010).

Und auch für die Überwachung von Co-Kulturen ist die FISH-Methode vielversprechend. So wurde sie bereits erfolgreich zur Quantifizierung von *Clostridium butyricum* und *Rhodobacter sphaeroides* in einer 200 mL Batch Co-Kultur eingesetzt (Fang *et al.* 2006). Die für diese Fluoreszenzmarkierung verwendeten Sonden EUB338 und Chis150 sind jedoch lediglich domänenspezifisch für Bakterien bzw. gruppenspezifisch für die *Clostridium histolyticum*-Gruppe (Clostridium-Cluster I und II) (Amann *et al.* 1990b, Franks *et al.* 1998). Für eine FISH-Markierung einer Clostridium-Co-Kultur, welche zwei Bakterien der gleichen Gattung enthält, sind jedoch speziesspezifische Oligonukleotidsonden nötig, um unerwünschte Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Eine hierfür notwendige Analyse der aktuell verfügbaren, bakteriellen rRNA-Sequenzen aus Online-Datenbanken wie SILVA (Pruesse *et al.* 2007) kann beispielsweise über das Softwarepaket ARB, welches am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München entwickelt wurde (Ludwig *et al.* 2004), erfolgen. Neben phylogenetischen Analysen der Sequenzen bietet sich über ARB eine direkte Möglichkeit zum Design und zur Evaluation von neuen, spezifischen Oligonukleotidsonden-Sequenzen für diverse FISH-Anwendungen (Ludwig *et al.* 2004). Insgesamt zeichnet sich damit die FISH-Technik nicht nur durch eine Sauerstoffunabhängigkeit und eine hohe Spezifität aus. Im Gegensatz zu den gängigen Fluoreszenzprotein-Systemen ist für die Markierung der Zellen vorab keine genetische Modifizierung durch Einführung von DNA in den

Organismus notwendig (Schneider *et al.* 2021), woraus sich ein breit gefächertes, potenzielles Anwendungsgebiet für verschiedene Co-Kulturen ergibt.

1.3 Der sekundäre Gärer *Clostridium kluyveri*

1.3.1 Ein historischer Rückblick zu *C. kluyveri*

Die ersten Reinkulturen von *C. kluyveri* wurden 1941 aus einem syntrophen Konsortium mit der Bezeichnung „*Methanobacterium omelianskii*“ isoliert. Die Konsortien mit *C. kluyveri* zeigten hierbei, im Gegensatz zu anderen Anreicherungskulturen, statt der Produktion von Acetat eine Umsetzung von Alkohol zu Caproat und Butyrat (Barker 1937). Die ursprüngliche Isolierung der Reinkulturen gestaltete sich in diesem Zusammenhang als äußerst schwierig, da zu dem damaligen Zeitpunkt die Nährstoffanforderungen von *C. kluyveri* noch nicht bekannt waren (Barker 1947). So wurde für diese Isolierungen noch ein wenig selektives Minimalmedium mit Ethanol und hohem Hefeextraktgehalt verwendet (Barker *et al.* 1942).

Bereits zu Beginn fielen jedoch die beiden Haupteigenschaften von *C. kluyveri* auf. Zum einen zeigten alle Isolate in Flüssigmedium ein langsames Wachstum mit einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen bei 37 °C. Zum anderen wurden von den Isolaten weder Kohlenhydrate noch Pyruvat abgebaut, dafür aber Ethanol (Barker *et al.* 1942, Bornstein *et al.* 1948a). Weitere Merkmale des stäbchenförmigen, anaeroben Bakteriums sind seine Motilität, der mesophile Temperaturbereich (19-37°C) mit einem Optimum bei 34°C, sowie ein Wachstums-pH-Bereich zwischen 6,0-7,5 mit einem Optimum bei pH 6,8 (Barker *et al.* 1942).

Um die Nährstoffanforderungen von *C. kluyveri* genauer zu verstehen, wurden daraufhin in den folgenden Jahren zahlreiche Studien durchgeführt, woraufhin etwas später die Formulierung eines ersten synthetischen Mediums gelang. Dieses beinhaltet neben Ethanol auch Acetat, anorganische Salze, sowie Biotin und para-Aminobenzoessäure (Bornstein *et al.* 1948a). Zusätzlich zu Butyrat und Caproat konnte auf diesem synthetischen Medium auch Wasserstoff als Hauptfermentationsprodukt von *C. kluyveri* identifiziert werden (Bornstein *et al.* 1948b). Daneben konnte gezeigt werden, dass Acetat auch durch andere organische Säuren wie Propionat oder Butyrat ersetzt werden kann. Zudem spielt CO₂ aus der Atmosphäre für dieses Bakterium ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung (Bornstein *et al.* 1948a). Rund 40 Jahre später konnte ferner auch das Wachstum von *C. kluyveri* auf Ethanol und Succinat nachgewiesen werden (Kenealy *et al.* 1985).

Aus diesen Erkenntnissen wurden in den 80 Jahren seit der Isolierung verschiedene Rezepte für *C. kluyveri* Flüssigmedien abgeleitet. Diese sind nicht nur, wie das DSMZ-52 Standardmedium Ethanol-Acetat-basiert, sondern auch Ethanol-Succinat-basiert wie zum Beispiel das EASY oder das

CM-5 Medium (Kenealy *et al.* 1985, Söhling *et al.* 1993, Weimer *et al.* 2012). Für Fermentationsversuche kam zudem auch bereits ein modifiziertes Tanner Medium zum Einsatz (Bielzer 2019). In diesen synthetischen Medien werden zumeist Puffersysteme wahlweise auf Basis von Phosphat oder Carbonat als Grundlage dafür verwendet, um die Energiegewinnung in *C. kluyveri* genauer untersuchen zu können.

1.3.2 Energiegewinnung über reverse- β -Oxidation und C-Kettenverlängerung

Nicht nur die Nährstoffanforderungen, sondern auch die Energiegewinnung wurde in *C. kluyveri* in den Anfangsjahren nach der Entdeckung dieses Bakteriums genauer untersucht (Thauer *et al.* 1968, Schoberth *et al.* 1969). Zu diesem Zeitpunkt war bereits klar, dass in *C. kluyveri* Ethanol zu Acetat umgesetzt wird, wohingegen Acetat aus dem Medium für die Synthese von Butyrat und Caproat verwendet wird (Barker *et al.* 1945). Beide Reaktionen sind energetisch miteinander gekoppelt, wobei bei der Ethanol-zu-Acetat Reaktion ATP über Substratkettenphosphorylierung generiert wird. Der Mechanismus zur Bildung von H_2 aus NADH konnte in diesem Zusammenhang jedoch erst viel später auf Basis der Genomdaten von *C. kluyveri* plausibel erklärt werden (Seedorf *et al.* 2008). Hieraus wurde das in Abbildung 1.1 dargestellte Reaktionsschema der Ethanol-Acetat-Fermentation, auch reverse β -Oxidation (=RBO) oder C-Kettenverlängerung genannt, abgeleitet.

Für die Synthese von H_2 im Rahmen der RBO spielt der Butyryl-CoA Dehydrogenase Komplex (Bcd/EtfAB) und [FeFe] Hydrogenasen eine zentrale Rolle. In diesem Zusammenhang wird über Elektronen-Bifurkation eine Reduktion von Ferredoxin mit NADH katalysiert. Das Ferredoxin wird im Anschluss für die Ausbalancierung des NADH/NAD⁺ Pools benötigt. Einerseits kann am membrangebundenen, energieumwandelnden Ferredoxin:NAD Oxidoreduktase (RnfA-E) Komplex eine protonenmotorische Kraft generiert werden, welche die Gewinnung von ATP über eine ATP-Synthase ermöglicht (AtpA-I). Andererseits bietet das reduzierte Ferredoxin genug Energie, um die Synthese von H_2 über die [FeFe] Hydrogenasen zu ermöglichen. Durch beide Reaktionen können somit nicht nur Energie gewonnen, sondern auch Redox-Äquivalente ausbalanciert werden (Seedorf *et al.* 2008).

Zudem konnten durch die Genomsequenzierung zentralen Enzyme identifiziert werden, welche an der C-Kettenverlängerung in *C. kluyveri* beteiligt sind. Hierbei sind an der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA der Reihe nach die folgenden Enzyme beteiligt: Acetoacetyl-CoA Thiolase (Thl), NAD- und NADP-abhängige 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (Hbd), 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase (Crt), sowie der bereits erwähnte Bcd/EtfAB Komplex.

Einleitung

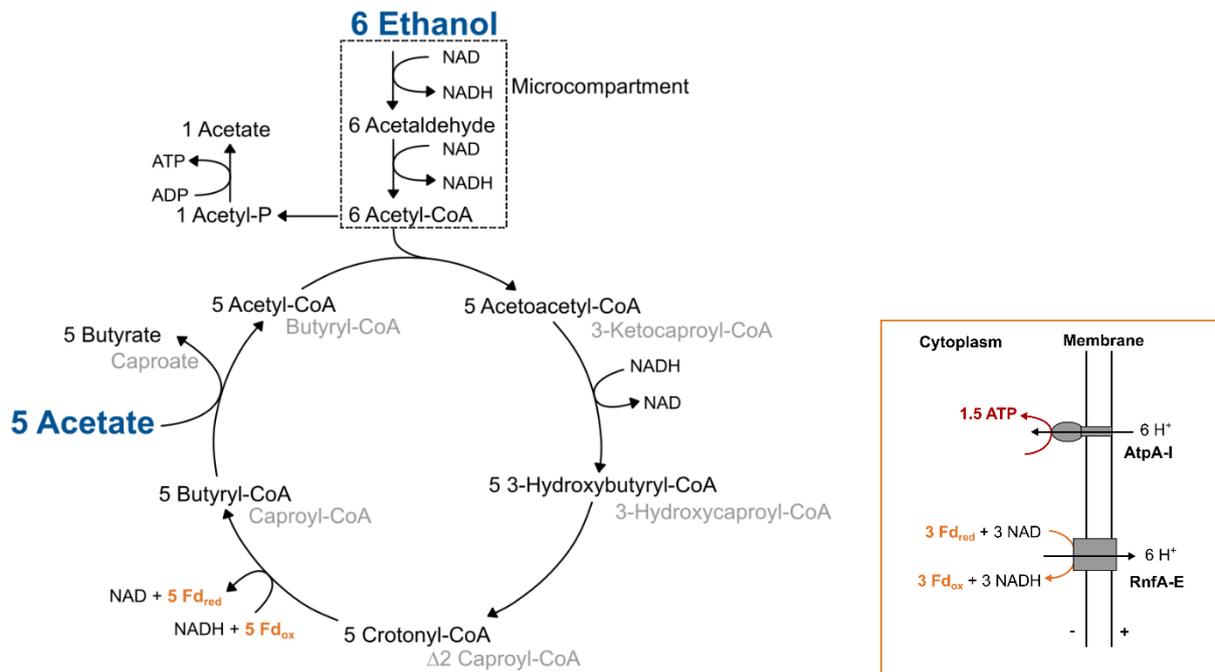


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung des Ethanol-Acetat Stoffwechsels von *C. kluyveri*.

Die Synthese von ATP erfolgt in diesem Stoffwechsel sowohl über die Umsetzung von Ethanol zu Acetat mittels Substratkettenphosphorylierung (schwarzer Kasten), als auch über einen membrangebundenen Ferredoxin:NAD Oxidoreduktase Komplex (RnfA-E) mit einer protonenmotorischen Kraft und einer ATPase (AtpA-I) (oranger umrandetes Feld). Reduziertes Ferredoxin für den RnfA-E Komplex wird während des schrittweisen, zyklischen Kondensationsprozesses von zwei Acetyl-CoA Molekülen am Butyryl-CoA Dehydrogenase Komplex (Bcd/EtfAB) über Elektronen-Bifurkation generiert. Hierbei entstehen unter anderem Butyrat (schwarz) und Caproat (grau). Die Synthese von H₂ über eine [FeFe] Hydrogenase aus Fd_{red} ist nicht abgebildet. Abbildung modifiziert nach Seedorf *et al.* (2008).

Die Reduktion der CoA-Ester zu den korrespondierenden Fettsäuren erfolgt final über eine Butyryl-CoA: Acetat CoA-Transferase (cat3) (Seedorf *et al.* 2008). Die Gene für diese maßgeblich an der C-Kettenverlängerung beteiligten Enzyme konnten so bereits auch in acetogenen Bakterien mit Caproat-Bildung nachgewiesen werden (Wirth *et al.* 2021).

Insgesamt ist die RBO ein zyklischer Prozess, welcher mehrmals hintereinander von den jeweiligen CoA-Estern durchlaufen werden kann, wobei bei jedem Durchgang die C-Kette durch Acetyl-CoA um zwei weitere C-Atome verlängert wird. Somit können über RBO aus Acetat (C₂) theoretisch C₄ bis C₈ Körper gebildet werden (Spirito *et al.* 2014). Bei Fermentationen mit *C. kluyveri* konnten bisher allerdings nur Spuren von Oktanoat nachgewiesen werden (Reddy *et al.* 2018). In Kombination mit einem acetogenen Organismus wie *C. carboxidivorans* können daher kettenverlängernde Organismen dazu eingesetzt werden, C₁-Moleküle direkt in hochwertige, mittelkettige Fettsäuren zu verlängern (Diender *et al.* 2016).

1.4 Restriktions-/Modifikationssysteme

Ein wichtiger Schritt, um den Transfer von DNA in verschiedene Bakterien zu ermöglichen, ist das Überwinden der zelleigenen Restriktions-/Modifikations- (RM-) Barrieren. RM-Systeme sind ein wichtiger Schutzmechanismus vor viraler DNA (Wilson 1991), wobei dieser Mechanismus sehr stammspezifisch ist (Minton *et al.* 2016). Zentral ist hierbei die Aktivität von zelleigenen Restriktionsendonukleasen (REasen). So schneiden diese REasen DNA-Moleküle, sofern diese nicht an bestimmten Erkennungssequenzen stammspezifisch über eine zugehörige Methyltransferase (MTase) methyliert worden sind (Kühnlein *et al.* 1972). Dieser Mechanismus ermöglicht somit das Eliminieren von Fremd-DNA bei gleichzeitigem Schutz der zelleigenen Erbinformation (Price *et al.* 1986, McClelland *et al.* 1988). Die Gene der REasen und MTasen sind zumeist sehr eng miteinander in Form eines RM-Systems verbunden (Wilson 1991, Wilson *et al.* 1991). Ursprünglich wurden bakterielle RM-Systeme lediglich in drei große Gruppen unterteilt (Typ I, II, III), wobei diese Nomenklatur mittlerweile um eine weitere Gruppe (Typ IV) ergänzt worden ist (Roberts *et al.* 2003). Die großen RM-Systemgruppen unterscheiden sich insbesondere in der Zusammensetzung der Untereinheiten, dem Bedarf an Cofaktoren und ihrer jeweiligen Wirkungsweise (Smith *et al.* 1973). Ferner sind mittlerweile zudem auch zahlreiche Untergruppen innerhalb der großen RM-Systemgruppen bekannt (Roberts *et al.* 2003).

Trotz einiger Beispiele, bei denen die Restriktion von DNA durch den Zielorganismus zu vernachlässigen war (Minton *et al.* 2016), gilt die Gruppe der Clostridien dennoch aufgrund ihrer hoch aktiven RM-Systeme als schwer transformierbar (Charubin *et al.* 2018). Zur Überwindung der RM-Systembarrieren des Zielorganismus werden standardmäßig zwei unterschiedliche Methoden angewendet: (1) Identifizierung der Restriktionsaktivität des Stamms über ein Bakterienlysat, gefolgt von der Expression einer passenden MTase in *E. coli* (= *in vivo* Methylierung) oder (2) direkter *Knock-out* der Gene des RM-Systems bzw. REase (Minton *et al.* 2016, Charubin *et al.* 2018). Beide Methoden konnten bereits erfolgreich auf unterschiedliche Clostridien angewendet werden, wobei bei *C. acetobutylicum* (Mermelstein *et al.* 1993, Croux *et al.* 2016), *Clostridium cellulolyticum* (Jennert *et al.* 2000) (Cui *et al.* 2012), *C. pasteurianum* (Pyne *et al.* 2013, Pyne *et al.* 2014) und *C. saccharobutylicum* (Lesiak *et al.* 2014) sowohl die *in vivo* Methylierung, als auch der *Knock-out* zum Einsatz gekommen sind. Daraus lässt sich ableiten, dass beide Methoden ihre Berechtigung bei der genetischen Arbeit mit Clostridien haben.

Früher basierte die Vorhersage und Charakterisierung von RM-Systemen noch häufig auf bakteriellen Zellextrakten (Whitehead *et al.* 1985) oder PCR-basierten Methoden unter anderem mit Bisulfit (Feil *et al.* 1994). Heutzutage stehen durch moderne Methoden wie der „single-molecule real-time“ (SMRT) Sequenzierung (PacBio Technologie, (Eid *et al.* 2009)) zur Untersuchung des Methyloms,

Einleitung

sowie mit der Onlinedatenbank REBASE (Roberts *et al.* 2010) zusätzlich auch genetische Informationen zu putativen REase- und MTase-Genen in zahlreichen Organismen zur Verfügung. Diese können wichtige Informationen dazu liefern, um durch die oben genannten Methoden auch andere, biotechnologisch relevante Mitglieder aus der Gruppe der Clostridien genetisch zugänglich machen zu können.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die folgende Arbeit war Teil des Verbundprojekts „SynCoClos“ aus dem Schwerpunktprogramm „InterZell“ (SPP 2170) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Das gemeinsame Ziel der an SynCoClos beteiligten Arbeitsgruppen war die Etablierung einer stabilen, synthetischen Co-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*. Über diese autotrophe Co-Kultur sollte CO in mittelkettige Alkohole wie 1-Hexanol und 1-Octanol umgesetzt werden. Das Konzept der synthetischen Co-Kultur ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

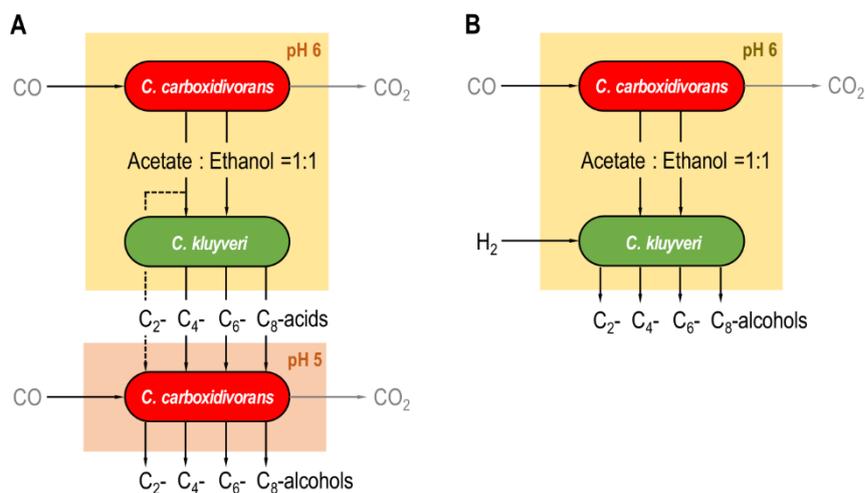


Abbildung 1.2. Konzept der autotrophen Co-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* auf Syngas zur Produktion von mittelkettigen Alkoholen aus CO.

(A) Co-Kultivierung mit den Wildtyp-Stämmen: Das von *C. carboxidivorans* aus CO gebildete Ethanol und Acetat soll von *C. kluyveri* zu Butyrat, Hexanoat und Oktanoat umgesetzt werden (Acetogene Phase und Kettenverlängerung; gelb). Im Anschluss erfolgt eine Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen durch *C. carboxidivorans* (Solventogene Phase; orange). (B) Co-Kultivierung mit einem genetisch modifizierten *C. kluyveri* Stamm hinsichtlich C-Kettenverlängerung und Alkohol-Synthese: Das von *C. carboxidivorans* zu Ethanol und Acetat fermentierte CO wird von *C. kluyveri* direkt während der Acetogenen Phase in Butanol, Hexanol und Oktanol umgesetzt. Hierbei soll ein optimierter RBO-Stoffwechsel in *C. kluyveri* zu einer Steigerung der Oktanol-Produktion in der Co-Kultur beitragen. Modifizierte Abbildung aus dem DFG-Projektantrag von SynCoClos (2018).

Ein Ziel von SynCoClos war die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Anteile der beiden eingesetzten Bakterienarten an der Co-Kultur während der Fermentation. Eine individuelle Markierung der Zellen sollte hierbei über die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) generiert werden. Daher wurden zur FISH-Markierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* geeignete Oligonukleotidsonden definiert. Eine mögliche FISH-Sondensequenz für *C. kluyveri* wurde bereits kürzlich von Hu *et al.* (2018) vorgeschlagen. Die Ableitung neuer Sondensequenzen sollte gegebenenfalls auf Basis der 23S rRNA mit Hilfe des ARB-Softwarepakets nach Ludwig *et al.* (2004) erfolgen. Zudem sollte die Bindungsspezifität der neuen Oligonukleotidsonden sowohl *in silico*, als

Einleitung

auch im Labor evaluiert werden. Die für *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* abgeleiteten FISH-Sonden sollten im Anschluss dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik zur Entwicklung der FC-Messmethode für Fermentationsproben zur Verfügung gestellt werden.

Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch insbesondere auf der Entwicklung eines genetischen Systems für den sekundären Gärer *C. kluyveri*. Die DNA sollte in diesem Zusammenhang bevorzugt mit Hilfe der tri-parentalen Konjugation eingebracht werden. Zunächst sollte ein festes Medium für *C. kluyveri* erarbeitet werden, auf welchem dieser Stamm gut Kolonien ausbilden kann. Die Identifizierung geeigneter Substrate hierzu sollte über Wachstumskurven in flüssigen Medien erfolgen. Parallel zur Etablierung eines geeigneten Konjugationsprotokolls sollen zudem die zelleigenen Restriktions-/Modifikations- (RM-) Systembarrieren in *C. kluyveri* identifiziert und überwunden werden. Zunächst sollen hierzu die zelleigenen, potenziellen MTase-Gene aus *C. kluyveri* zum Einsatz kommen, um damit eine Methodik zur *in vivo* Methylierung bereitzustellen. Gene für die mutmaßlich am stärksten aktiven RM-Systeme sind dann auch logische Ziele für die vollständig Entfernung aus dem Genom von *C. kluyveri*. Um die Voraussetzung für diese und weitere markerfreie *in frame* Deletionen und Insertionen zu schaffen, sollen das *codBA* Plasmidsystem nach Kostner *et al.* (2013) für die Anwendung in *C. kluyveri* erprobt werden, gegebenenfalls nach vorheriger Modifikation.

Im Anschluss an die Etablierung des genetischen Systems für *C. kluyveri* bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Optimierung des RBO-Stoffwechsels in diesem Stamm für die autotrophe Co-Kultivierung mit *C. carboxidivorans* auf Syngas. Zum einen sollte zur Begünstigung der C-Kettenverlängerung die Expressionsstärken von RBO-Genen in *C. kluyveri* modifiziert werden. Als mögliche Modifikationsziele wurden hierzu eine Erhöhung der Thiolase (*thl*) Expression zur Förderung der Acetyl-CoA Kondensationsreaktion, sowie eine Reduktion der CoA-Transferase (*cat3*) Aktivität zur Unterbindung der Umsetzung von CoA-Estern zu den Fettsäuren ausgewählt (vgl. Abbildung 1.2). Zum anderen war ursprünglich geplant, zusätzliche Gene in *C. kluyveri* einzufügen (z.B. *AOR*, *ADH*), damit in diesem Bakterium eine direkte Reduktion der generierten mittelkettigen Fettsäuren in die korrespondierenden Alkohole möglich wird.

Ferner sollte das Transkriptom von *C. kluyveri* unter Co-Kultur-ähnlichen Bedingungen über „Next Generation Sequencing“ mittels Illumina RNAseq untersucht werden. Ziel hierbei war es, über Genexpressionsdaten geeignete Promotoren für die gezielte Regulation von Genen (z.B. *codBA*, *thl* und *cat3*) in *C. kluyveri* zu identifizieren. Zusätzlich sollte der mögliche Einfluss von Stressfaktoren während der autotrophen Co-Kultivierung mit *C. carboxidivorans* auf der Genexpressionsebene von *C. kluyveri* genauer beleuchtet werden. Hierzu wurde beispielhaft die CO-Toleranz von *C. kluyveri* ausgewählt.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen, Plasmide, Gene und Genome

2.1.1 Organismen

Alle Organismen wurden, sofern nicht anders angegeben, über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Leibniz-Institut, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die im Rahmend dieser Arbeit verwendeten aeroben und anaeroben Bakterien sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 gelistet. Alle Stämme wurden, wie in 2.4 beschrieben, kultiviert und gelagert.

Tabelle 2.1. Verwendete Stämme von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*

Stamm	Eigenschaften	Verwendung	Quelle
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i>(Str^R) <i>endA1</i> λ-</i>	Klonierung; Konjugation	Invitrogen
<i>E. coli</i> CA434	<i>E. coli</i> HB101 (<i>thi-1 hsdS20</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>) <i>supE44 recAB ara-14 leuB5proA2 lacY1 galK rpsI20</i> (str ^R) <i>xyl-5 mtl-1</i>) mit dem konjugativen Plasmid R702 (Tra ⁺ , Mob ⁺ , Km ^R , Tc ^R , Sm ^R , Su ^R , Hg ^R)	Konjugation	Purdy <i>et al.</i> (2002)
<i>E. coli</i> DH10 β	Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD139 fhuA</i> Δ <i>lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ80<i>dlacZ</i>ΔM15 <i>recA1 relA1 endA1 nupG rpsL</i> (Str^R) <i>rph spoT1</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)</i>	Klonierung	NEB
<i>E. coli</i> K12	-	FISH	DSMZ
<i>S. aureus</i> DSM 20232	-	FISH	DSMZ

Tabelle 2.2. Verwendete Clostridien Stämme

Art	Stamm Nr. (DSMZ)	Medium	C-Quellen
<i>C. kluyveri</i>	DSM 555 ^T , 556, 557, 562, 563, 564	Hurst modifiziert; DSMZ-52; TM 4040	Acetat, Ethanol und ggf. Succinat (vgl. 2.3.2)
<i>C. carboxidivorans</i>	DSM 15243 ^T	Hurst modifiziert	0,5 % (w/v) Glukose
<i>C. acetobutylicum</i>	DSM 792 ^T	CGM	2,0 % (w/v) Glukose
<i>C. autoethanogenum</i>	DSM 10061	Hurst modifiziert	1,0 % (w/v) Fruktose
<i>C. ljungdahlii</i>	DSM 13528 ^T	ATCC 1754	1,0 % (w/v) Fruktose
<i>C. saccharobutylicum</i>	DSM 13864 ^T	2x YTG	2,0 % (w/v) Glukose

^T Typstamm der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ)

2.1.2 Plasmide

Im Folgenden sind alle Plasmide gelistet, welche im Rahmen dieser Arbeit entweder direkt verwendet oder nach Kapitel 2.7 neu konstruiert worden sind (siehe Tabelle 2.3 – 2.6). Alle hier genannten Plasmide sind in der Sammlung der Arbeitsgruppe Ehrenreich am Lehrstuhl für Mikrobiologie (TUM School of Life Science, Freising, Deutschland) hinterlegt.

Tabelle 2.3. Plasmide für *in vivo* Methylierung

Plasmid	Größe, bp	Eigenschaften	Quelle
pJL2	6.314	Für <i>C. saccharobutylicum</i> ; hsdMSII, P _{T7} , Tc ^R	Lesiak (2015)
pCKL_2314	3.751	Für <i>C. kluyveri</i> ; Derivat von pJL2; P _{T7} , Ckl_2314, Tc ^R	Praktikum Marc Follmer (2021)
pCKL_2332	6.442	Für <i>C. kluyveri</i> ; Derivat von pJL2; P _{T7} , Ckl_2332, Tc ^R	Praktikum Marc Follmer (2021)
pCKL_2938	4.750	Für <i>C. kluyveri</i> ; Derivat von pJL2; P _{T7} , Ckl_2938, Tc ^R	Praktikum Marc Follmer (2021)
pCKL_3239	4.885	Für <i>C. kluyveri</i> ; Derivat von pJL2; P _{T7} , Ckl_3239, Tc ^R	Masterarbeit Lisa Pütthoff (2021)
pCKL_2671	4.165	Für <i>C. kluyveri</i> ; Derivat von pJL2; P _{T7} , Ckl_2671, Tc ^R	Masterarbeit Lisa Pütthoff (2021)
pCKL_2671-Lac	4.193	Für <i>C. kluyveri</i> ; Derivat von pCKL2671; P _{lac} (aus pUC19), Ckl_2671, Tc ^R	Diese Arbeit

Tabelle 2.4. Standardplasmide dieser Arbeit

Plasmid	Größe, bp	Eigenschaften	Quelle
pMTL82151	5.254	pBP1, Cm ^R , ColE1 + tra, MCS	Heap <i>et al.</i> (2009)
pMTL83151	4.476	pCB102, Cm ^R , ColE1 + tra, MCS	Heap <i>et al.</i> (2009)
pMTL84151	6.297	pCD6, Cm ^R , ColE1 + tra, MCS	Heap <i>et al.</i> (2009)
pMTL85151	3.729	pIM13, Cm ^R , ColE1 + tra, MCS	Heap <i>et al.</i> (2009)
pUC19	2.686	pMB1, P _{lac} , LacR binding site, lacZ, Amp ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)

Material und Methoden

Tabelle 2.5. Thiolase-Expressionsplasmide für *C. kluyveri*

Plasmid	Größe, bp	Eigenschaften	Quelle
pMTL82151_ P _{Thl,Cac} _Thl _{Cac}	6.568	pBP1, Cm ^R , ColE1 + tra, MCS, P _{Thl,Cac} + Thl _{Cac} (= CA_RS14790)	Praktikum Karina Krammer (2022)
pMTL82151_ P _{Thl,Csa} _Thl _{Csa}	6.606	pBP1, Cm ^R , ColE1 + tra, MCS, P _{Thl,Csa} + Thl _{Csa} (= CLSA_RS02475)	Praktikum Karina Krammer (2022)

Tabelle 2.6. *codBA* Basis- und Deletionsplasmide für *C. kluyveri*

Plasmid	Größe, bp	Eigenschaften	Quelle
pHE1-C2	7.739	pIM13, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{fdx} (<i>C. sporogenes</i>) + <i>codBA</i> (<i>C. ljungdahlii</i>)	Holger Edelmann (nicht veröffentlicht)
pMS1_fdx	8.497	pCB102, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{fdx} (<i>C. sporogenes</i>) + <i>codBA</i> (<i>C. ljungdahlii</i>)	Diese Arbeit
pMS1_upp	8.458	pCB102, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} (<i>C. ljungdahlii</i>) + <i>codBA</i> (<i>C. ljungdahlii</i>)	Diese Arbeit
pMS1_upp_ Δ2670_JR	10.120	pCB102, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} + <i>codBA</i> , homologe Flanken CKL_2670	Bachelorarbeit Jennifer Reif (2022)
pMS1_upp_ Δ2671	9.682	pCB102, Cm ^R , Ori pBR322, homologe Flanken CKL_2669 - CKL_2671 <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} + <i>codBA</i>	Diese Arbeit
pMS1_upp_ Δ2671_JR	10.491	pCB102, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} + <i>codBA</i> , homologe Flanken CKL_2669 - CKL_2671	Bachelorarbeit Jennifer Reif (2022)
pMS2_upp	9.241	pBP1, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} (<i>C. ljungdahlii</i>) + <i>codBA</i> (<i>C. ljungdahlii</i>)	Bachelorarbeit Jennifer Reif (2022)
pMS2_upp_ Δ2670_JR	10.903	pBP1, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} + <i>codBA</i> , homologe Flanken CKL_2670	Bachelorarbeit Jennifer Reif (2022)
pMS2_upp_ Δ2671_JR	10.553	pBP1, Cm ^R , Ori pBR322, <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , P _{upp} + <i>codBA</i> , homologe Flanken CKL_2669 - CKL_2671	Bachelorarbeit Jennifer Reif (2022)

Material und Methoden

2.1.3 Gene und Genome

Die für die molekularbiologische Arbeit benötigten Sequenzen von Genomen (Tabelle 2.7) und Genen (Tabelle 2.8) wurden über die Internetseite des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, Maryland, USA) bezogen.

Tabelle 2.7. Information zu den Genomen dieser Arbeit

Organismus	Stamm (DSMZ)	Genom Accession (NCBI)	Größe
<i>C. kluyveri</i>	DSM 555 ^T	CP000673.1	3.964.618 bp
<i>C. acetobutylicum</i>	DSM 792 ^T	NC_003030.1	3.940.880 bp
<i>C. saccharobutylicum</i>	DSM 13864 ^T	NC_022571.1	5.107.814 bp
<i>C. ljungdahlii</i>	DSM 13528 ^T	NC_014328.1	4.630.065 bp

Tabelle 2.8. Wichtige Gene dieser Arbeit

Stamm	Gen (NCBI)	Locus Tag	GenBank
<i>C. kluyveri</i>	DNA Gyrase Untereinheit A	CKL_0007	<i>gyrA1</i>
DSM 555 ^T	DNA Adenin Methylase	CKL_2314	DNA Methylase
	DNA (cytosine-5)-Methyltransferase 1	CKL_2671	DNA Methylase
	Adenin-spezifische DNA-Methyltransferase	CKL_3239	Typ III Mod. Untereinheit
	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase 1	CKL_3696	<i>thIA1</i>
	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase 2	CKL_3697	<i>thIA2</i>
	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase 3	CKL_3698	<i>thIA3</i>
<i>C. acetobutylicum</i>	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	CA_RS14790	-
DSM 792 ^T			
<i>C. saccharobutylicum</i>	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	CLSA_RS02475	<i>thIA</i>
DSM 13864 ^T			

2.2 Reagenzien und technische Gase

2.2.1 Kommerzielle Kits, Enzyme und Puffer

Für molekularbiologische Arbeiten wurden Produkte von Thermo Scientific (Waltham, USA), New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA), TaKaRa Bio (Kusatsu, Shiga, Japan), Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Macherey-Nagel (MN, Dürren, Deutschland), Zymo Research (Freiburg, Deutschland), MP Biomedicals (Irvine, USA) und Bio-Rad (Hercules, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Alle Kits sind in Tabelle 2.9 zusammengestellt. Die Enzyme sind in Tabelle 2.10 und die dazugehörigen Puffer in Tabelle 2.11 zusammengefasst.

Tabelle 2.9. In dieser Arbeit verwendete, kommerzielle Kits

Name des Kits	Firma	Anwendung
NucleoSpin® Plasmid DNA Purifikation	MN	Aufreinigung von Plasmiden
NukleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MN	Aufreinigung von PCR-Produkten
Zymoclean™ Gel DNA Recovery	Zymo Research	Aufreinigung von PCR-Produkten
FastRNA™ Pro Blue Kit	MP Biomedicals	RNA Extraktion
iScript™ Advanced cDNA Synthesis	Bio-Rad	Reverse Transkription
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad	qRT-PCR

Tabelle 2.10. Kommerzielle Enzyme und Polymerasen

Reagenz	Firma	Anwendung
Antarctic Phosphatase	NEB	Klonierung
FastDigest Restriktionsenzyme	Thermo Scientific	Kontrollverdau
High-Fidelity® Restriktionsenzyme	NEB	Klonierung
Phire Hot Start II DNA-Polymerase	Thermo Scientific	Analytische PCR
PrimeSTAR® Max DNA-Polymerase	TaKaRa Bio	Präparative PCR
PrimeSTAR® GXL DNA-Polymerase	TaKaRa Bio	Präparative PCR
Q5 DNA-Polymerase	NEB	Präparative PCR
S7 Fusion DNA-Polymerase	Biozym	Präparative PCR
T4 Ligase	NEB	Klonierung

Material und Methoden

Tabelle 2.11. Kommerzielle Puffer und sonstige Reagenzien

Reagenz	Firma	Anwendung
1x Antarctic Phosphatase Buffer	NEB	Restriktionsbasierte Klonierung
5x HF Buffer (S7 Fusion)	Biozym	Präparative PCR
5x Phire Green Reaction Buffer	Thermo Scientific	Analytische PCR
5x PrimeSTAR® GXL Buffer	TaKaRa Bio	Präparative PCR
2x PrimeSTAR® Max Permixon	TaKaRa Bio	Präparative PCR
5x Q5 Buffer	NEB	Präparative PCR
10x Fast Digest Buffer (with / without loading Dye)	Thermo Scientific	Kontrollverdau
10x rCutSmart™ Buffer	NEB	Restriktionsbasierte Klonierung
10x T4 Ligase Puffer	NEB	Restriktionsbasierte Klonierung
dNTP-Mix (10 mM)	Biozym	PCR
GeneRuler® 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific	Gelelektrophorese
GeneRuler® 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific	Gelelektrophorese
MCP Protein Precipitation Reagent	Biozym	gDNA Extraktion
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	NEB	Gibson Assembly
Proteinase K (50 µg/µL)*	Carl Roth	gDNA Extraktion
RNase A (10 µg/µL)*	AppliChem	gDNA Extraktion
Tissue and Cell Lysis Solution	Biozym	gDNA Extraktion
TriTrack DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Scientific	Gelelektrophorese

*Pulver in MQ H₂O gelöst

2.2.2 Selbst hergestellte Puffer

Einige Puffer dieser Arbeit wurden, wie in Tabelle 2.12 angegeben, selbst hergestellt. Für die Stammlösung der Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) wurde eine 200 mM (= 35,6 g/L) Na_2HPO_4 Lösung hergestellt, der pH mit einer 200 mM (= 31,2 g/L) NaH_2PO_4 Lösung auf 7,2 - 7,4 eingestellt und autoklaviert.

Tabelle 2.12. Zusammensetzung von Puffern dieser Arbeit

Puffer	Substanz	Menge
50x TAE	Tris	242 g/L
	Eisessig	57,1 mL/L
	Na_2EDTA	9,3 g/L
3x PBS	NaCl	22,8 g/L (= 390 mM f.c.)
	PBS-Stammlösung	150 mL/L (= 30 mM f.c.)
1x PBS	NaCl	7,6 g/L (= 130 mM f.c.)
	PBS-Stammlösung	50 mL/L (= 10 mM f.c.)
1x TE	Tris-HCl (1 M, pH = 8,0)	10 mL/L (= 10 mM f.c.)
	EDTA (0,5 M, pH = 8,0)	2 mL/L (= 1 mM f.c.)

2.2.3 Technische Gase

Alle technischen Gase für das anaerobe Arbeiten wurden über die Firma AirLiquide Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland) bezogen (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13. Technische Gase für das anaerobe Arbeiten

Bezeichnung	Gas	Volumen, Druck	Verwendung
ALPHAGAZ 1 Stickstoff	N_2 (100% v/v)	50 L, 200 bar	Medien, Zelt
FORMIERGAS 85/15	$\text{N}_2:\text{H}_2$ (85:15% v/v)	50 L, 200 bar	Zelt
KOHLENDIOXID	CO_2 (100% v/v)	10 kg	Medien
CRYSTAL-Gemisch	$\text{N}_2:\text{CO}_2$ (80:20% v/v)	50 L, 150 bar	Medien

Das N₂:CO₂ Gasgemisch für das DSMZ-52 Medium (Tabelle 2.15) wurde als kundenspezifische Mischung über den Mixture Guide der AirLiquide generiert und bestellt. Die Spezifikationen des CRYSTAL-Gemisches waren: 20 Vol-% Kohlendioxid N55 SFC/SFE in Stickstoff N50, abgefüllt in eine 50 L Prüfgas Leichtstahlflasche mit Prüfgas-Messing-Ventil. Durch den höheren Reinheitsgrad der gewählten Komponenten für das CRYSTAL-Gemisch sollte eine Verunreinigung des Mediums mit O₂ reduziert werden.

2.3 Medien und Medienzusätze

2.3.1 Aerobe Medien für *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*

Standardmäßig wurden *E. coli* und *S. aureus* in LB („lysogeny broth“) Medium kultiviert. Für das LB-Festmedium wurden zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt. Nach der Transformation (2.9.1) wurde *E. coli* in SOB („super optimal broth“) Medium mit 3,6 g/L Glukose (= SOC-Medium) regeneriert.

Tabelle 2.14. Zusammensetzung der Medien für *E. coli*, bezogen auf 1 L

Medium	Bestandteil	Menge
LB	Trypton	10 g
Bertani (1951)	NaCl	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	VE H ₂ O	1.000 mL
SOC	Pepton	20 g
Hanahan (1983)	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,19 g
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,03 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,46 g
	40 % (w/v) Glukose*	9 mL
	MQ H ₂ O	1.000 mL

* steril nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.3.2 Anaerobe Medien für *Clostridium kluyveri*

C. kluyveri wurde in DSMZ-52 Medium, modifiziertem Tanner Medium (Tanner 2007) oder modifiziertem Hurst Medium (Hurst *et al.* 2010) kultiviert. Beim DSMZ-52 Medium wurden als Puffer die 9,4 mM Na₂CO₃ durch 22 mM NaHCO₃ ersetzt. Alle hitzestabilen Bestandteile wurden in MQ H₂O gelöst, der pH bei Tanner und Hurst Medium auf 6,8 eingestellt und die Lösung aerob in Schottflaschen autoklaviert. Danach wurde das Medium bei ca. 60 °C mit den übrigen Bestandteilen, dem Reduktionsmittel und ggf. Na₂HCO₃ (vgl. 2.3.3) steril supplementiert. Festmedien wurden mit 1,0 bzw. 1,8 % (w/v) Agar nach Zugabe von Na₂HCO₃ aerob gegossen und mindestens einen Tag im Anaerobierzelt gelagert. Bei Flüssigmedien wurden die Schottflaschen mit einem sterilen Butylstopfen verschlossen und das noch warme Medium für ca. 15 min mit 100 % N₂ über einen Sterilfilter (0,2 µm) begast. Zum Schluss wurde das Medium mit einem N₂:CO₂ Mischgas (80 %:20 % v/v) (2.2.3) überschichtet.

Tabelle 2.15. DSMZ-52 Medium für *C. kluyveri*, modifiziert

Bestandteil	Menge
K-Acetat	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,31 g
KH ₂ PO ₄	0,23 g
NH ₄ Cl	0,25 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,20 g
Hefeextrakt	1,0 g
Resazurin (0,1 % w/v Stock)	0,5 mL
Selen-Wolfram-Lösung	1,0 mL
Spurenelementlösung „SL-10“	1,0 mL
Vitaminlösung „7 vitamins“ *	1,0 mL
Ethanol absolute *	20,0 mL
Na ₂ S · 9 H ₂ O (5,0 % w/v Stock) *	5,0 mL
L-Cystein-HCl · H ₂ O (5,0 % w/v Stock) *	5,0 mL
Na ₂ HCO ₃ (1 M Stock) *	22,0 mL
MQ H ₂ O	ad 1.000 mL

*steril nach dem Autoklavieren bei ca. 60 °C zugegeben. Na₂S in anaerobem MQ H₂O gelöst. Zugabe des Na₂HCO₃ Puffers erst nach Begasen des Mediums mit N₂:CO₂ ins handwarme Medium.

Material und Methoden

Tabelle 2.16. Tanner Medium, modifiziert (Tanner 2007) für *C. kluyveri* (=TM 4040)

Bestandteil	Menge
MOPS	20,0 g
K-Acetat	6,4 g
di-Na-Succinat	24,7 g
Hefeextrakt	1,0 g
Mineralienlösung „Tanner“	25,0 mL
Resazurin (0,1 % w/v Stock)	0,5 mL
Ethanol absolute *	14,6 mL
Vitaminlösung „Tanner“ *	10,0 mL
Spurenelementlösung „Tanner“ *	10,0 mL
L-Cystein-HCl (5,0 % w/v Stock) *	20,0 mL
Na ₂ HCO ₃ (1 M Stock; nur Festmedium) *	20,0 mL
MQ H ₂ O	ad 1.000 mL

*steril nach dem Autoklavieren bei ca. 60 °C zugegeben. Na₂HCO₃ nur im festen Medium.

Für die Konjugation wurde das feste TM 4040 Medium wie folgt modifiziert: (1) Matingplatten mit 1,8 % (w/v) Agar, 5,0 g/L Hefeextrakt und 2,5 mM Glukose, und (2) Selektionsplatten mit 1,0 % (w/v) Agar, 1,0 g/L CAS, 10 mg/L Colistin und 10 mg/L Thiamphenicol.

Material und Methoden

Tabelle 2.17. Hurst Medium, modifiziert (Hurst & Lewis 2010) für *C. kluveri*

Bestandteil	Menge
MES	15,0 g
K-Acetat	10,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
NH ₄ Cl	3,0 g
NaCl	2,4 g
KCl	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,23 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,16 g
Resazurin (0,1 % w/v Stock)	0,5 mL
Ethanol absolute *	20,0 mL
Vitaminlösung „Tanner“ *	10,0 mL
Spurenelementlösung „Tanner“ *	10,0 mL
L-Cystein-HCl (5,0 % w/v Stock) *	20,0 mL
Na ₂ HCO ₃ (1 M Stock) *	52,0 mL
MQ H ₂ O	ad 1.000 mL

*steril nach dem Autoklavieren bei ca. 60 °C zugegeben.

Das modifizierte Hurst Medium wurde ohne Ethanol und Na₂HCO₃ auch zur Kultivierung von *C. carboxidivorans* mit 0,5 % (w/v) Glukose und *C. autoethanogenum* mit 1,0 % (w/v) Fruktose verwendet (2.4.2).

2.3.3 Medienzusätze

Reduktionsmittel wurden als 5,0 % (w/v) Stocks frisch hergestellt und steril filtriert (0,2 µm). L-Cystein-HCl · H₂O (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde hierbei in aeroben, Na₂S · 9 H₂O (Acros Organics; Thermo Scientific, Waltham, USA) in anaeroben MQ H₂O gelöst.

Die 1 M Na₂HCO₃ Stocklösung (J. T. Baker; Thermo Scientific, Waltham, USA) mit MQ H₂O wurde in Serumfläschchen mit 100 % CO₂ drei Mal ausgeschüttelt und unter 100 % CO₂ Atmosphäre autoklaviert.

Der Sauerstoff- und Redox-Indikator Resazurin (Alfa Aesar; Thermo Scientific, Waltham, USA) wurde in MQ H₂O gelöst (0,5 % (w/v) f.c.), steril filtriert (0,2 µm) und als 1 mL Fraktionen bei -20 °C gelagert.

Zuckerlösungen für Medien wurden in MQ H₂O gelöst, steril filtriert (0,2 µm) und bei 4°C gelagert. Für diese Arbeit wurden Glukose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Fruktose (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Spurenelement-, Vitamin- und Mineralienlösungen für anaerobe Medien wurden aerob hergestellt und wie angegeben entweder im Medium mitautoklaviert oder steril filtriert (0,2 µm) und nach dem Autoklavieren zugegeben.

Für die Spurenelementlösung „SL-10“ (Tabelle 2.18) für das DSMZ-52 Medium wurde zunächst das FeCl₂ in HCl gelöst und mit MQ H₂O verdünnt. Danach wurden die übrigen Salze darin gelöst, die Lösung auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Die Spurenelementlösung „Tanner“ (Tabelle 2.19) konnte sowohl für das modifizierte Tanner Medium (Tabelle 2.16), als auch für das modifizierte Hurst Medium (Tabelle 2.17) eingesetzt werden. Zur Herstellung der „Tanner“ Spurenelementlösung wurde zunächst die Nitrilotriessigsäure in MQ H₂O durch Zugabe von 2 M KOH gelöst (pH 6,0). Danach wurden die übrigen Bestandteile gelöst, der pH mit 2 M KOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Material und Methoden

Tabelle 2.18. Zusammensetzung der Selen-Wolfram-, Spurenelement- und Vitamin-Lösungen pro 1 L für das DSMZ-52 Medium

Lösung	Bestandteil	Menge
Selen-Wolfram-Lösung (autoklaviert)	NaOH	0,5 g
	Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	3,0 mg
	Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	4,0 mg
Spurenelement-Lösung „SL-10“ (autoklaviert)	FeCl ₂ · 4 H ₂ O	1,5 g
	ZnCl ₂	70,0 mg
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100,0 mg
	H ₃ BO ₃	6,0 mg
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190,0 mg
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2,0 mg
	NiSO ₄ · 6 H ₂ O	21,0 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36,0 mg
HCl (25 % v/v)	10,0 mL	
Vitamin-Lösung „seven vitamins“ (sterilfiltriert)	Vitamin B ₁₂	100,0 mg
	p-Aminobenzoessäure	80,0 mg
	D(+)-Biotin	20,0 mg
	Nikotinsäure	200,0 mg
	Kalzium Panthotenat	100,0 mg
	Pyridoxin Hydrochlorid	300,0 mg
Thiamin-HCl · 2 H ₂ O	200,0 mg	

Material und Methoden

Tabelle 2.19. Zusammensetzung der Mineralien-, Spurenelement- und Vitaminlösung pro 1 L für das Tanner bzw. Hurst Medium

Lösung	Bestandteil	Menge
Mineralien-Lösung „Tanner“ (autoklaviert)	NaCl	80,0 g
	NH ₄ Cl	100,0 g
	KCl	10,0 g
	KH ₂ PO ₄	10,0 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20,0 g
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	4,0 g
Spurenelement-Lösung „Tanner“ (sterilfiltriert)	Nitrilotriessigsäure	2,0 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	1,0 g
	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	800,0 mg
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 mg
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	20,0 mg
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200,0 mg
	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20,0 g
	Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	20,0 g
	NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	20,0 g
	Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	20,0 g
Vitamin-Lösung „Tanner“ (sterilfiltriert)	Pyridoxin Hydrochlorid	10,0 mg
	Thiamin Hydrochlorid	5,0 mg
	Riboflavin	5,0 mg
	Kalzium Pantothenat	5,0 mg
	α-Liponsäure	5,0 mg
	p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
	Nikotinsäure	5,0 mg
	Vitamin B ₁₂	2,0 mg
	D-(+)-Biotin	2,0 mg
	Folsäure	2,0 mg
2-Mercaptoethansulfonsäure	2,0 mg	

2.3.4 Selektionsmarker

5-Fluorouracil (5-FU; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 5-Fluorocytosin (TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien) wurden als 10 mg/mL Stocks in MQ H₂O gelöst und steril filtriert (0,2 µm). Antibiotika Stocks wurden entweder mit 70 % (v/v) Ethanol absolute oder MQ H₂O hergestellt und bei -20 °C gelagert. Die in MQ H₂O gelösten Antibiotika wurden zusätzlich steril filtriert (0,2 µm).

Tabelle 2.20. Verwendete Antibiotika Stocklösungen

Name	Stocklösung	Arbeitskonzentration		Firma
		<i>E. coli</i>	Clostridium	
Chloramphenicol	25 mg/mL; 70 % (v/v) EtOH	25 mg/L	-	Sigma
Thiamphenicol	10 mg/mL; 70 % (v/v) EtOH	-	5-10 mg/L	Molecula
Colistin Sulfat	10 mg/mL; H ₂ O	-	10 mg/L	AppliChem
Tetracyclin Hydrochlorid	10 mg/mL; 70 % (v/v) EtOH	10 mg/L	-	Sigma
Erythromycin	50 mg/mL; 70 % (v/v) EtOH	250 mg/L	-	Flucka

2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

2.4.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde in 5 mL LB-Medium (Tabelle 2.14) + Antibiotikum (Tabelle 2.20) bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Für die Extraktion von Plasmiden nach 2.6.2 oder die Erstellung von Glycerin-Stocks nach 2.4.3 wurden *E. coli* Übernacht Kulturen verwendet. Bei der tri-parentalen Konjugation (2.9.2) wurden die *E. colis* aus Übernacht-Kulturen auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft.

2.4.2 Kultivierung von Clostridien für mikrobiologische Arbeiten

Sofern nicht anders angegeben, wurde bei der Anzucht von Clostridien das Medium und die C-Quellen entsprechend des zu kultivierenden Organismus passend gewählt (Tabelle 2.2). Anaerobe Flüssigkulturen wurden in mit sterilen Butylstopfen verschlossenen Hungate-Röhrchen (5-10 mL Kulturvolumen) oder Serumfläschchen (50 mL Kulturvolumen) unter 100 % N₂ Atmosphäre angezogen. Bei *C. kluyveri* wurde eine spezielle N₂:CO₂ Mischgas Atmosphäre (80:20 % v/v) verwendet. 5 mL Medium wurden jeweils mit 0,3 – 0,5 mL frischer Kultur oder 1-3 mL Glycerinstock über sterilen Einwegspritzen (BD Discardit II) und sterilen Kanülen (BD Microlance 3, 0,7 · 30 mm; beides Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C stationär für 24-48 h. Die Bebrütung anaerober Agarplatten erfolgte in Anaerob-Töpfen (AnaeroJar™ 2,5 L) mit Gasbeuteln (AnaeroGen™ 2,5 L) zur Reduktion des Sauerstoffs (beides Thermo Scientific, Waltham,

USA) für 3-12 Tage bei 37 °C. Mikrobiologische Arbeiten wurden in einem Anaerob-Zelt aus Vinyl (Coy Laboratory Products, Michigan, USA) in sauerstofffreier Atmosphäre (1,5-4,0 Vol-% H₂ in N₂) durchgeführt.

2.4.3 Glycerin-Stocks für *E. coli*

Die Stammhaltung von *E. colis* mit Plasmiden erfolgte bei -80 °C in Schraubdeckel-Eppis mit einer finalen Glycerin-Konzentration von 25 % (v/v). Hierfür wurden 0,8 mL *E. coli* LB Übernacht Kultur mit 0,8 mL steriler, 50 % (v/v) Glycerin Lösung gemischt. Vor dem einfrieren wurde die Stocks für eine Stunde bei RT gelagert.

2.4.4 Glycerin-Stocks für Clostridien

Für die anaeroben Glycerin-Stocks wurde eine Lösung aus 50 % (v/v) Glycerin mit 0,25 g/L L-Cystein-HCl · H₂O und 1 mL/L 0,1 % (w/v) Resazurin hergestellt und zu 2 mL in Hungate-Röhrchen aliquotiert. Danach wurde das Glycerin für 30 min in der Schleuse des Anaerob-Zelts unter Vakuum entgast, die Röhrchen im Zelt mit Butylstopfen verschossen und autoklaviert. Pro Stamm wurden 2-3 mL Flüssigkultur in ihrer exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ *C. kluyveri* ca. 0,5 und *C. carboxidivorans* ca. 1,3) in die Glycerin-Röhrchen gespritzt (finale Glycerin Konzentration 20-25 % v/v). Hierfür wurde im Anaerob-Zelt gearbeitet und die Stocks im Anschluss sofort bei -80 °C eingefroren.

2.4.5 *C. kluyveri* Sporensuspension

Zur Induktion der Sporulation wurde *C. kluyveri* in modifiziertem TM 4040-Flüssigmedium ohne Vitamin- und Spurenelementlösung, sowie mit reduzierter L-Cystein-HCl Konzentration von 0,05 % (w/v) für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet (4.500 rpm, 5 min) und drei Mal in 1 mL sterilem MQ H₂O gewaschen (4.000 rpm, 5 min). Danach wurde das Zellpellet in 2 mL sterilem MQ H₂O resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Zur Reaktivierung wurde die Sporensuspension 1:10 mit sterilem MQ H₂O verdünnt und 0,1 mL zu 5 mL DSMZ-52 Medium gegeben. Die Kultur wurde nach dem Pasteurisieren im Wasserbad bei 80 °C für 10 min für 4 Tage bei 37 °C stationär bebrütet.

2.4.6 Heterotrophe Co-Kultivierung in Serumfläschchen auf Glukose

Zur Untersuchung der FISH-Sonden ClosKuly und ClosCarb (2.10) wurden im kleinen Maßstab heterotrophe Mono- und Co-Kulturen von *C. carboxidivorans* DSM 15243^T und *C. kluyveri* DSM 555^T in anaeroben Serumfläschchen angesetzt. Hierzu wurden je 50 mL modifiziertes Hurst Medium

(Tabelle 2.17) und 5,0 g/L Glukose unter N₂:CO₂-Athmosphäre (80:20 % v/v) verwendet. Insgesamt wurden drei verschiedene Ansätze als Triplikate getestet: (i) *C. carboxidivorans* Monokultur, (ii) *C. kluyveri* Monokultur und (iii) Co-Kultur, beginnend mit *C. carboxidivorans*, mit nachfolgender Inokulation von *C. kluyveri* nach 8 h. Alle Ansätze wurden stationär bei 37 °C für 172 h bebrütet.

Die Vorkulturen von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* für die drei Ansätze wurden in 50 mL modifiziertem Hurst Medium mit 15,0 g/L MES und 0,5 g/L L-Cystein-HCl · 2 H₂O angesetzt. Als Kohlenstoffquellen wurden für *C. kluyveri* 10 g/L Kaliumacetat, 20 mL/L Ethanol und 2,5 g/L NaHCO₃ zugesetzt. *C. carboxidivorans* wurde heterotroph mit 5 g/L Glukose kultiviert. Beide Stämme wurden bei 37 °C bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase bebrütet, was einer OD₆₀₀ von 1,5 - 2,0 für *C. carboxidivorans* und 0,5 - 0,8 für *C. kluyveri* entsprach. Für die Ansätze (i) und (iii) wurde *C. carboxidivorans* aus der Vorkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft. Nach 8 h bei 37 °C wurde für die Ansätze (ii) und (iii) *C. kluyveri* aus der Vorkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,05 beimpft und die Inkubation bei 37 °C fortgesetzt. Das Kulturwachstum wurde regelmäßig durch Messung der OD₆₀₀ überwacht (2.5.2). Die Zusammensetzung der Kultur wurde mit FISH und den Gensonden ClosKluy und ClosCarb nach 2.10.4 bestimmt. Hierfür wurden Zellen nach 20 h bei 15.000 rpm für 5 min bei 4 °C geerntet (Mikro 200R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) und mit 50 % (v/v) eiskaltem Ethanol in 1x PBS fixiert. Die endgültigen Konzentrationen an organischen Säuren und Alkoholen im Kulturüberstand wurden zum Endzeitpunkt nach 172 h mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nach 2.14.1 gemessen.

2.4.7 Vorkulturen für den Rührkesselreaktor (LST für Bioverfahrenstechnik, TUM)

Für Mono- und Co-Kulturen im Rührkesselreaktor (2.4.8 und 2.4.9) wurden zunächst Vorkulturen der benötigten Stämme durch Miriam Bäumlner angezogen. Dazu wurden *C. kluyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T aus Glycerin-Stocks in anaerobe 500 mL Serumflaschen reaktiviert. Beide Organismen wurden getrennt in 100 mL modifiziertem Hurst Medium bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (Wisecube WIS-20R, witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) mit 100 rpm kultiviert. Das Medium wurde mit 10 g/L Kaliumacetat, 20 mL/L Ethanol und 2,5 g/L NaHCO₃ für *C. kluyveri* bzw. 5 g/L Glukose für *C. carboxidivorans* versetzt. In der exponentiellen Wachstumsphase (21 h für *C. carboxidivorans* und 110 h für *C. kluyveri*) wurden die Zellen einzeln durch 10-minütige Zentrifugation bei 4.500 rpm (Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) geerntet und in anaerobem 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert. Die Inokulation der STR erfolgte mit Einwegspritzen (BD Discardit II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) durch ein steriles Septum.

2.4.8 Autotrophe Co-Kultivierung im Rührkesselreaktor

Zur Untersuchung der FISH-Sonden ClosKluy und ClosCarb aus Kapitel 2.10 wurde eine autotrophe Batchkultivierung von *C. carboxidivorans* DSM 15243^T und *C. kluyveri* DSM 555^T am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM School of Engineering and Design, Garching, Deutschland) unter der Anleitung von Miriam Bäumlner durchgeführt.

Für den Prozess wurde ein vollständig kontrollierter 2-L Rührkesselreaktor (stirred-tank reaktor = STR) (Labfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit modifiziertem Hurst Medium (Tabelle 2.17) genutzt. Der STR wurde bei 37 °C mit einem Arbeitsvolumen VR von 1 L und einer Rührgeschwindigkeit von 1.200 rpm über zwei Rushton-Turbinen (volumetrische Leistungsaufnahme 11,7 W/L) betrieben. Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH (3 M) und H₂SO₄ (1 M) konstant auf pH 6,0 gehalten. Die Begasung erfolgte mit einem Gasgemisch aus CO:CO₂ (80:20% v/v) unter einer Begasungsraten von 5 NL/h (0,083 vvm). Medium und Bioreaktor wurden vor der Verwendung autoklaviert (121 °C, 20 min). Die anaeroben Bedingungen wurden vorab durch Begasung des Bioreaktors mit dem gewünschten Gasgemisch für mindestens 12 h eingestellt. Vor der Inokulation wurde ein steriler L-Cystein-HCl-Lösung über ein Septum mit Mikrofiltrationsmembran (Porengröße 0,2 µm) aseptisch zu einer Endkonzentration von 0,5 g/L zugegeben. Beide Organismen wurden für den Prozess aus unabhängigen Vorkulturen nach 2.4.7 zu eine anfängliche Zelltrochengewichtskonzentration von $c_{x,0} = 0,05$ g/L pro Stamm in den Reaktor eingesetzt.

Die FISH-Zellproben (2.10.4) wurden aseptisch mit sterilen Einwegspritzen unter Verwendung steriler Kanülen mit einer Länge von 12 cm (Sterican 0,8 - 120 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland) zu verschiedenen Zeitpunkten durch das sterile Septum aus dem Reaktor entnommen und mit 50 % eiskaltem Ethanol in 1x PBS fixiert (2.10.3). Danach erfolgte die Hybridisierung der Zellen mit den Gen-Sonden ClosKluy und ClosCarb, wie in 2.10.4 beschrieben.

2.4.9 Kultivierung von *C. kluyveri* im Rührkesselreaktor

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Auswirkung von CO-Gas auf die Genexpression in *C. kluyveri* DSM 555^T genauer betrachtet werden. Hierzu wurde der Stamm in zwei unabhängigen Batchprozessen in einem vollständig kontrollierten 2-L-STR (Labfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM School of Engineering and Design, Garching, Deutschland) unter der Leitung von Miriam Bäumlner kultiviert.

Beide *C. kluyveri* Prozesse wurden mit modifiziertem Hurst Medium (Tabelle 2.17) und 6,0 g/L Kaliumacetat und 15 g/L Ethanol als Substrat durchgeführt. Die Prozessparameter wurden analog zur Co-Kultur in 2.4.8 folgendermaßen definiert: V = 1 L, T = 37 °C, P/V = 11,7 W/L, pH 6,0 und F_{gas} = 0,08 vvm mit 20% CO₂ aber ohne CO. Das Inokulum wurde wie in 2.4.7 beschrieben mit Hilfe von

Glycerin-Stocks vorbereitet. Danach wurden die Zellen zu einer anfänglichen Zelltrockengewichtskonzentration von $c_{x,0} = 0,05 \text{ g/L}$ in den Reaktor eingesetzt. Während des ersten Batchprozesses wurde *C. kluyveri* während der exponentiellen Wachstumsphase mit einem CO-Partialdruck von $p_{\text{CO},\text{in}} = 100 \text{ mbar}$ im Reaktor über 3 h temporär begast (= CO-Behandlung). Der zweite Batchprozess wurde hingegen identisch, aber ohne CO-Begasung durchgeführt (= Kontrolle).

Eine Online-Messung des Abgasvolumenstroms über einen Massendurchflussmesser (F-111B-1K0-RGD-33- E; Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande), sowie der CO_2 -, CO- und H_2 -Gaskonzentrationen im Abgas über einen μ -Gaschromatograph (μ 490, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) erfolgte während der beiden Fermentation wie in Bäumler *et al.* (2022) publiziert. Daraus wurden im Anschluss die H_2 -Bildungsrate und CO_2 -Aufnahmerate während des Batchprozesses bestimmt.

Von beiden Batchprozessen (CO und Kontrolle) wurden für die Durchführung der Transkriptomanalyse zu identischen Zeitpunkten 4 mL Probe über ein steriles Septum aus dem Reaktor entnommen und sofort auf Eis gekühlt. Die Zeitpunkte waren: (1) direkt vor der CO-Begasung (19,5 h), (2) nach 40 min CO-Begasung (20,2 h), (3) nach 3 h CO-Begasung (22,5 h), sowie (4) 1 h nach Beendigung der CO-Begasung (23,5 h). Aus allen Zellpellets wurde die RNA nach 2.11.1 2.11.2 mit der Kugelmühle und dem TRIzol™ Reagenz extrahiert. Nach der Illumina-Sequenzierung (2.13.2) erfolgte im Anschluss eine bioinformatische Auswertung der Daten nach 2.15.4

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Durchlichtmikroskopie

Zur Kontrolle der Reinheit und Vitalität bakterieller Kulturen wurden diese regelmäßig mikroskopiert. Hierfür wurde das Durchlichtmikroskop Axio Scope.A1 von Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland) mit 10x, 40x und 100x Objektiven verwendet.

2.5.2 Bestimmung der optischen Dichte im Photometer

Um das Wachstum von Bakterien in größeren Kulturvolumina (5-50 mL) zu bestimmen, wurden diese im Spektrophotometer (Jenway 7310; Cole-Parmer, Staffordshire, UK) bei einer Wellenlänge $\lambda = 600 \text{ nm}$ gemessen. Kulturen mit einer $\text{OD}_{600} \geq 0,3$ wurden vor ihrer Messung im jeweiligen Kultivierungsmedium 1:1 – 1:10 verdünnt.

2.5.3 Bestimmung der optischen Dichte mit dem Densitometer

Bei kleineren Kulturvolumina von 2-5 mL wurde das Wachstum von *C. kluuyveri* im Hungate-Röhrchen mit einem Suspensionstrübungsmelder (Densitometer DEN-1B; BioSan, Riga, Lettland) gemessen. Hierbei wird die Lösungstrübung direkt durch das Kulturröhrchen bei einer Wellenlänge $\lambda = 565 \pm 15$ nm gemessen und in Mcfarland-Einheiten (McF) angegeben. Dies ermöglicht eine schnelle und verlustfrei Messung. Mit Hilfe folgender Formel konnte anhand der gemessenen McF Werte im TM 4040 Medium die entsprechende OD_{600} im Kulturröhrchen abgeschätzt werden:

$$OD_{600} = (0,2318 \cdot McF) + 0,0226$$

Die für diese Formel zugrunde gelegte Ausgleichsgerade wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums (Jennifer Reif, 2022) mit Hilfe von *C. kluuyveri* Kulturen in 5 mL TM 4040 Medium mit OD_{600} -Werten zwischen 0,3-0,9 bestimmt.

2.5.4 Minimale Hemmkonzentration (MHK) in Flüssigmedium mit 96-Well-Platten

Zur Festlegung von Antibiotika-Arbeitskonzentrationen wurde zunächst die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Thiamphenicol (Tm), Erythromycin (Em), Tetracyclin (Tet) und Spectinomycin (Sp) mit *C. kluuyveri* in flüssigem TM 4040 Medium nach Tabelle 2.16 bestimmt. Da eine Bestimmung in Hungate-Röhrchen sehr zeit- und materialaufwendig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die MHK mit Antibiotika-Verdünnungsreihen in sterilen, 96-Well-Platten (Microplatten für Suspensionskultur, PS, F-Boden; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt.

Zunächst wurde von allen Antibiotika 4-fach konzentrierte Stocks in TM 4040 Medium hergestellt: (1) 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ f.c.) und 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ f.c.) für Tm, Em und Tet, sowie (2) 4 mg/mL (1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ f.c.) und 6 mg/mL (1.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ f.c.) für Sp. Aus diesen Stocks wurden je 100 μL in die erste Reihe der 96-Well-Platte gegeben, in welche bereits 100 μL TM 4040 Medium vorgelegt worden sind. Ausgehend von der ersten Reihe wurden sechs 1:1 Verdünnungen in technischen Triplikaten von oben nach unten pipettiert. Vor dem Animpfen wurde die Platte für mind. 30 min im Anaerob-Zelt gelagert.

Als Vorkultur wurde eine 10 mL *C. kluuyveri* über Nacht Kultur in TM 4040 Medium mit einer $OD_{600} \sim 0,5$ verwendet. Diese Kultur wurde 1:5 mit TM4040 verdünnt und davon je 100 μL zum Animpfen der Wells verwendet. Die Platten wurden im Anschluss in einer Frischhaltedose aus Glas luftdicht zusammen mit einem Gasbeutel (AnaeroGen™ 2,5 L, Thermo Scientific, Waltham, USA) für zwei Tage bei 37°C bebrütet und zur Auswertung bei $\lambda = 600$ nm im Plattenphotometer SPECTROstar^{Nano} (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen.

2.5.5 Minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Festmedium

Für das genetische Arbeiten wurde die MHK mit Tm, Em, Tet und Sp für *C. kluyveri* zusätzlich in TM 4040 Medium (Tabelle 2.16) mit 1,8% (w/v) Agar bestimmt. Die gewählten Konzentrationen für die jeweiligen Antibiotika orientieren sich an den Werten aus Heap *et al.* (2009). Getestet wurden folgende finale Konzentrationen: (1) 1-50 µg/mL für Tm, Em und Tet, sowie (2) 250-750 µg/mL für Sp. Alle Antibiotika Stocklösungen wurden so verdünnt, dass jeweils 2 mL zu 100 mL Festmedium gegeben werden konnten. Die Tests wurden als biologische Duplikate in technischen Duplikaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach 6-7 Tagen Inkubationszeit bei 37°C visuell durch Betrachtung der Agaroberfläche.

2.5.6 Identifizierung von Bakterien anhand des 16S rRNA-Moleküls

Die Identität von Transformanten wurde auf Basis der Sequenz des bakteriellen 16S ribosomalen RNA (rRNA) Moleküls bestimmt. Dafür wurde mit der nach 2.6.1 extrahierten gDNA zunächst eine PCR nach 2.6.7 auf das 16S rRNA-Molekül durchgeführt und das PCR-Produkt nach 2.6.3 aufgereinigt. Danach wurde das PCR-Produkt nach 2.13.1 mit beiden Primern der 16S-PCR sequenziert. Die somit gewonnenen 16S rRNA-Sequenzen wurden im Anschluss mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA) ausgewertet. Für den Datenbankabgleich wurde die BLAST-Anwendung für Nukleotide (BLASTn) gegen die Nukleotid-Datenbank (nr/nt) mit dem Megablast Algorithmus verwendet. Bei Organismen derselben Art sollte die Ähnlichkeit der 16S rRNA-Sequenzen hierbei $\geq 98\%$ sein (Tindall *et al.* 2010).

2.6 Molekularbiologische Techniken

2.6.1 Extraktion von chromosomaler DNA aus Clostridien

Genomische DNA (gDNA) von *C. kluyveri* wurde mit einem an Gram-positive Zellen angepassten Protokoll des MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, USA) extrahiert. Zusammengefasst, wurden hierfür 2-5 mL einer *C. kluyveri* Flüssigkultur ($OD_{600} > 0,3$) zentrifugiert (15.000 rpm, 5 min, 4 °C), das Zellpellet in 1 mL steriler 1x PBS gewaschen (15.000 rpm, 5 min, 4 °C) und 950 µL Überstand abgenommen. Die Zell-Lyse mit 10 µL Lysozym-Lösung (50 mg/ml in 10 mM Tris, pH=8.0) wurde im verbliebenen Überstand (50 µL) bei 37 °C im Thermoblock für 30 min durchgeführt. Zur weiteren Lyse wurden 300 µL „Tissue and Cell Lysis Solution“ und 1 µL Proteinase K (50 µg/µL in MQ H₂O) zugeben und bei 68 °C für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA mit 10 µL RNase A (10 µg/µL in MQ H₂O) bei 37 °C für 30 min verdaut, sowie die Proben für 5 min auf Eis gekühlt. Proteine wurden mit 175 µL „MCP Protein Precipitation Reagent“ gefällt und abzentrifugiert

(11.000 x g, 10 min, 4 °C). Die DNA im abgenommenen Überstand wurde mit 500 µL Isopropanol durch wiederholtes Invertieren gefällt und durch Zentrifugation geerntet (11.000 x g, 10 min, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 200 µL 70% (v/v) Ethanol gewaschen, für 10 min bei 37 °C getrocknet und in 35 µL sterilem MQ H₂O für mindestens 4 h rehydriert.

2.6.2 Isolierung von Plasmid DNA

Die Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Aufreinigungskits (Tabelle 2.9) nach Herstellerangaben mit 2 oder 5 mL über Nacht Kultur. Das Plasmid wurde am Ende mit 35 µL MQ H₂O eluiert.

2.6.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Tabelle 2.9) mit Protokoll 5.1 nach Herstellerangaben benutzt. Für das Eluieren wurden zum Schluss 25 µL MQ H₂O genutzt.

2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA gezielt aufzureinigen zu können, wurde diese zunächst über ein präparatives Agarosegel nach 2.6.8 aufgetrennt und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Danach wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem X-TRACTA Generation II (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) gezielt ausgestochen. Im Anschluss konnte die DNA aus den Gelblöckchen isoliert werden. Hierzu wurde entweder das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit mit Protokoll 5.2 oder das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle 2.9). Die DNA wurde am Ende mit 15 µL (NucleoSpin®) oder 10 µL (Zymoclean™) MQ H₂O eluiert.

2.6.5 Präparative Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA-Fragmente für Plasmidkonstruktionen nach 2.7.1 oder 2.7.2 wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Es wurde sowohl mit der S7 Fusion, als auch mit der Q5 DNA Polymerase nach Herstellerangaben gearbeitet (Tabelle 2.10). Tabelle 2.21 zeigt die für beide Polymerasen standardmäßig verwendeten Mastermix-Ansätze, sowie das PCR-Programm für den Thermocycler. Pro 50 µL PCR-Ansatz wurden 50 ng gDNA oder 10 ng Plasmid DNA eingesetzt. Die finale Konzentration lag bei 0,5 µM pro Primer. Die Größe der generierten DNA-Fragmente wurde im Anschluss über Agarose-Gelelektrophorese (2.6.8) bestimmt. Fragmente passender Größe wurden wahlweise direkt nach 2.6.3 oder über ein präparatives Agarosegel nach 2.6.4 für die nachfolgende Ligation aufgereinigt.

Material und Methoden

Tabelle 2.21. Master-Mix für einen Reaktionsansatz (links) und Thermocycler-Programm (rechts) für die präparative PCR mit der S7 oder Q5 DNA Polymerase

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit	Zyklen
5x Puffer	10 µL	98°C	30 s	1
dNTPs (je 10 mM)	1,0 µL	98°C	10 s	
Primer fw (10 pmol/µL)	2,5 µL	T _A	10 s	30
Primer rv (10 pmol/µL)	2,5 µL	72°C	Variabel ¹	
Polymerase	0,5 µL	72°C	5 min	1
Template	10 / 50 ng	4°C	∞	1
MQ H ₂ O	32,5 µL			

¹Elongation: 15-30 s/kb für S7 Fusion oder 20-30 s/kb für Q5 Polymerase

2.6.6 Analytische Polymerase-Kettenreaktion

Für alle analytischen PCR-Reaktionen dieser Arbeit wurde aufgrund ihrer kurzen Elongationszeit die Phire Hot Start II DNA Polymerase (Tabelle 2.10) nach Herstellerangaben eingesetzt. Je nach Einsatzgebiet wurde das Thermocycler-Programm in Tabelle 2.22 leicht modifiziert, der PCR Master-Mix blieb hingegen für alle Anwendungen identisch. Alle PCR-Ansätze wurden im Anschluss mittels Agarose Gelelektrophorese nach 2.6.8 aufgetrennt.

Eine *E. coli* Kolonie-PCR wurde im Anschluss an das Gibson Assembly (2.7.1) oder die Restriktionsbasierte Plasmidkonstruktion (2.7.2) durchgeführt. Hierfür wurde etwas Zellmasse in 50 µL sterilem MQ H₂O gelöst und davon 1 µL als Template für die PCR in den Master-Mix eingesetzt. Zusätzlich wurde der erste Denaturierungsschritt auf 3 min bei 98°C verlängert (vgl. Tabelle 2.22).

Die Kontroll-PCR auf das *C. kluveri* spezifische Gen *CKL_2938* mit den Primern CKL2938_S_pJL2_fw/rev wurde im Anschluss an den DNase I Verdau bei der RNA-Extraktion (2.11.4) oder der gDNA-Extraktion nach Plasmidtranskonjugation (2.9.2) angesetzt. Die erwartete Fragmentlänge betrug 1.874 bp. Für die Kontroll-PCR zum Nachweis von pMTL-Plasmiden in *C. kluveri* gDNA nach Transkonjugation (2.9.2) wurden zum einen die Primer catP_fw/rv zum Nachweis der Antibiotika-Resistenzkassette *catP* mit einer erwarteten Fragmentlänge von 638 bp verwendet. Zum anderen erfolgte bei den Thiolase-Expressionsplasmiden aus 2.7.4 der Plasmidnachweis alternativ über die Primer 82151_Check_Thl_fw/rv zur Amplifizierung des LacZ/MCS-Moduls. Erwartet wurden hierbei folgende Fragmente: 1.956 bp für pMTL82151_P_{Cac,Thl}_Thl_{Cac}, 1.994 bp für pMTL82151_P_{Csa,Thl}_Thl_{Csa}, sowie 642 bp für pMTL82151.

Material und Methoden

Tabelle 2.22. Master-Mix für einen Reaktionsansatz (links) und Thermocycler-Programm (rechts) für eine analytische PCR mit der Phire Hot Start II DNA Polymerase

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit	Zyklen
5x Phire Green Puffer	4 μL	98°C	3 min ² / 30 s ³	1
dNTPs (je 10 mM)	0,4 μL	98°C	10 s	
Primer fw (10 pmol/ μL)	1,0 μL	T _A	10 s ² / 15 s ³	30 ² / 25 ³
Primer rv (10 pmol/ μL)	1,0 μL	72°C	15 s/kb	
Polymerase	0,2 μL	72°C	1 min ² / 5 min ³	1
Template	1,0 μL^2 / 50 ng ³	4°C	∞	1
MQ H ₂ O	12,4 μL			

²Kolonie-PCR für *E. coli*

³Kontroll-PCR für RNA bzw. gDNA nach Konjugation

2.6.7 16S rRNA-Polymerase-Kettenreaktion

Um Bakterien über Sequenzierung nach 2.5.6 identifizieren zu können, wurde zunächst der 16S rRNA-Genabschnitt aus der gDNA (2.6.1) über PCR mit der Q5 DNA Polymerase nach Herstellerangaben amplifiziert. Hierfür wurde der in Tabelle 2.21 gezeigte Master-Mix halbiert, wobei die Primer 616Valt und 100K zu je 0,5 μM und die gDNA zu 50 ng eingesetzt wurden. Beim PCR-Programm (Tabelle 2.21) wurden die Parameter folgendermaßen geändert: Denaturierung für 20 s bei 98°C, Annealing für 20 s bei 54°C und Elongation mit 45 s bei 72°C. Die Größe des erwarteten Fragments bei ~1,5 kb wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (2.6.8) überprüft und die PCR-Produkte nach 2.6.3 für die nachfolgende Sanger-Sequenzierung (2.13.1) aufgereinigt. Ferner wurde die Identität des Bakteriums anhand der 16S rRNA-Sequenz über BLASTn nach 2.5.6 bestimmt.

2.6.8 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, über 0,8 % (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) in 1x TAE-Puffer (Tabelle 2.12) bei 120 V in vertikalen Gelkammern. Die Dauer der Elektrophorese betrug bei dünnen, analytischen Gelen 30-35 min und bei dicken, präparativen Gelen 1 h. Als Größenstandard wurden 2,5 μL GeneRuler® und zum Auftragen der Proben der 6x DNA-Ladepuffer TriTrack verwendet (Tabelle 2.11). Im Anschluss wurden die Gele für 15 min in 0.1 % (w/v) Ethidium-Bromid-Lösung gefärbt und in einer UV-Kammer (Alphamanager MINI, Biozym) betrachtet. Bei präparativen Gelen konnte die DNA im nächsten Schritt nach 2.6.4 aus der Agarose extrahiert werden.

2.6.9 Kontrollverdau von Plasmiden

Zur Überprüfung von Plasmidkonstrukten (2.7) wurden diese mit den FD-Restriktionsenzymen von Thermo Scientific verdaut. Hierzu wurden ~250 ng des nach 2.6.2 aus *E. coli* extrahierten Plasmids nach Herstellerangaben in einem 20 µL Reaktionsansatz mit 2 µL 10x FD-Puffer mit Ladepuffer (Tabelle 2.11), sowie 0,5 µL FD-Restriktionsenzym (Tabelle 2.10) gemischt. Im Anschluss erfolgte der Verdau bei 37 °C für 30 min im Thermoblock. Danach wurden die entstandenen Fragment-Längen über ein analytisches Agarose-Gel nach 2.6.8 bestimmt und mit dem *in silico* Verdau des Plasmids über die Clone Manager Software (2.15.1) verglichen.

2.7 Methoden zur Konstruktion von Plasmiden

2.7.1 Gibson Assembly (Gibson *et al.* 2009)

Über diese Klonierungsmethode können mit einer 5'-Exonuklease, DNA-Polymerase und DNA-Ligase mehrere sich überlappende DNA-Moleküle in einer Einzelreaktion zusammengefügt werden. Die für das Gibson Assembly benötigten homologen Überhänge wurden an die DNA-Fragmente mit Hilfe einer präparativen PCR angefügt (2.6.5).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gibson Assembly entweder mit dem NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (Tabelle 2.11) nach Herstellerangaben oder mit einem bakteriellen Zellextrakt nach der „Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE)“ Klonierungstechnik (Zhang *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2014) in unterschiedlichen molaren Verhältnissen durchgeführt (Tabelle 2.23). Die Bestimmung des molaren Verhältnisses erfolgte nach 2.15.1.

Vor der Ligation wurden die nach 2.6.5 generierten Gibson Assembly Fragmente direkt nach 2.6.3 oder nach 2.6.4 aus einem Agarose-Gel aufgereinigt. Sofern die PCR-Produkte über ein Plasmidtemplate generiert worden sind, wurden diese vor ihrer Aufreinigung mit dem FD-Enzym *DpnI* verdaut. Hierfür wurden 42,5 µL des PCR-Produkts mit 5 µL 10x FD-Puffer und 2,5 µL FD-*DpnI* gemischt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 80 °C für 5 min inaktiviert.

Im Anschluss an die Ligation nach Tabelle 2.23 erfolgte eine Hitzeschocktransformation von 5 µL Reaktions-Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* (2.9.1). Konstruierten Plasmide wurden zum Schluss über Kolonie-PCR (2.6.6) und Sequenzierung (2.13.1) kontrolliert.

Material und Methoden

Tabelle 2.23. Vergleich der Gibson Assembly Klonierung mit dem NEBuilder bzw. der SLiCE Methode

	NEBuilder	SLiCE
Menge Backbone	50 ng	100 ng
Molares Verhältnis (Vektor : Insert)	1:3 / 1:5 / 1:10	1:5 / 1:10 / 1:20
Temperatur	50°C	37°C
Inkubationszeit	15 – 60 min	15 min
NEBuilder Master Mix	10µL	-
10x T4 Ligase Puffer	-	2 µL
PPY SLiCE Extrakt	-	2 µL
Gesamtvolumen	20 µL	20 µL

2.7.2 Restriktionsbasierte Plasmidkonstruktion

Für die restriktionsbasierte Klonierung wurden ausschließlich Enzyme der Firma NEB nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle 2.24). Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden gegebenenfalls über PCR an die DNA-Fragmente angefügt (2.6.5). Nach dem Restriktionsverdau wurde das Backbone zusätzlich Dephosphoryliert. Die Ligation von aufgereinigtem Backbone und Insert wurde in einem Molaren Verhältnis von 1:3 über Nacht im Thermocycler bei 16°C durchgeführt. Im Anschluss wurden 5 µL des Ligations-Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli* DH10-β transformiert (2.9.1). Die Plasmidkonstruktion wurde im Anschluss über Kolonie-PCR (2.6.6), sowie Sequenzierung (2.13.1) überprüft.

Material und Methoden

Tabelle 2.24. Reaktionsansätze für Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation

Schritt	Reagenz	Menge
Restriktionsverdau	Plasmid / PCR Produkt	1 µg
1 h 37°C + 20 min 65°C	Restriktionsenzym	Je 1 µL
	rCut Smart Puffer	5 µL
	MQ H ₂ O	Ad 50 µL
Dephosphorylierung	Verdau-Ansatz	50 µL
30 min 37°C + 5 min 80°C	Antarctic Phosphatase Puffer	5 µL
	Antarctic Phosphatase	2,5 µL
Ligation	Backbone + Insert	Molares Verhältnis 1:3
Über Nacht bei 16°C	T4 Ligase Puffer	2 µL
	T4 Ligase	1 µL
	MQ H ₂ O	Ad 20µL

2.7.3 Konstruktion von potenziellen Plasmiden für die *in vivo* Methylierung

Alle potenziellen Plasmide für die *in vivo* Methylierung wurden mit Ausnahme von pCKL_2671-Lac in studentischen Arbeiten unter meiner Anleitung konstruiert (Tabelle 2.3). Die beiden Plasmide pCKL_2671 und pCKL_3239 gehen auf die Masterarbeit von Lisa Pütthoff (2021) zurück. Die drei Plasmide pCKL_2314, pCKL_2332, sowie pCKL_2938 entstanden während des Forschungspraktikums von Marc Follmer (2021). Alle potenziellen Methylierungsplasmide für *C. kluyveri* wurden über das Gibson Assembly nach 2.7.1 unter Verwendung des SLiCE Extrakts konstruiert. Die hierfür benötigten DNA-Fragmente wurden über PCR nach 2.6.5 mit der S7 Fusion Polymerase generiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6.1 gelistet.

Zunächst wurden potenzielle Gene für Methyltransferasen im Genom von *C. kluyveri* DSM555^T mit Hilfe von REBASE (2.1.3) identifiziert. Die als Methyltransferasen identifizierten Gene *CKL_2314*, *CKL_2332*, *CKL_2671*, *CKL_2938* und *CKL_3239* (siehe Tabelle 6.6) wurden mittels PCR amplifiziert und dabei mit homologen überhängen versehen. Das Backbone pJL2 wurde ohne die *C. saccharobutylicum* Restriktions-/Modifikationssystem Gene *hsdM2* und *hdsS2* ebenfalls mit homologen Überhängen über PCR gewonnen. Eine erfolgreiche Plasmidkonstruktion wurde über eine Kolonie-PCR nach 2.6.6 mit pJL2_Check_Fw/Rev, sowie einen Kontrollverdau nach 2.6.9

nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Plasmidsequenz über Sanger-Sequenzierung nach 2.13.1 ebenfalls mit pJL2_Check_Fw/Rev geprüft.

Ferner wurde zudem der T7 Promotor aus pCKL_2671 gegen den induzierbaren Laktose Promotor P_{lac} aus pUC19 ausgetauscht (= pCKL2671_Lac). Dazu wurde pCKL_2671 als Backbone ohne P_{T7} und mit homologen Überhängen über PCR mit den Primern pCKL_2671_S_Lac_fw/rev generiert. Der neue Promotor P_{lac} wurde ebenfalls mit homologen Überhängen für das pCKL_2671 Backbone mit den Primern Lac_S_pCKL2671_fw/rev und pUC19 als Template amplifiziert. Ein erfolgreicher Promotor-Tausch wurde im Anschluss mit einem Kontrollverdau des Plasmids nach (2.6.9) mit *HindIII* und *PstI* nachgewiesen. Ferner wurde die Promotor-Region über die Primer pCKL2671_Check_fw/rev sequenziert (2.13.1).

Zum Schluss wurden alle potenziellen Methylierungsplasmide in *E. coli* TOP10 zusammen mit unterschiedlichen Shuttle-Plasmiden Co-Transformiert (2.9.1). Die so gewonnenen Donorstämme konnten sowohl für das ZFE-Assay nach 2.8.2, als auch für die tri-parentale Konjugation von *C. kluyveri* nach 2.9.2 verwendet werden.

2.7.4 Konstruktion von Thiolase-Expressionsplasmiden

Die Thiolase-Expressionsplasmide pMTL82151_ $P_{Cac,Thl_Thl_{Cac}}$ und pMTL82151_ $P_{Csa,Thl_Thl_{Csa}}$ (Tabelle 2.5) sind während des Forschungspraktikums von Karina Krammer (2022) unter meiner Anleitung entstanden. Für die Konstruktion der beiden Plasmide wurde die restriktionsbasierte Klonierung nach 2.7.2 verwendet. Zunächst wurden die Thiolase-Gene jeweils zusammen mit ihrer Promotorregion (ca. 200 bp) von *C. acetobutylicum* DSM 792^T, sowie *C. saccharobutylicum* DSM 13864^T (vgl. Tabelle 2.8) über PCR mit der Q5 Polymerase nach 2.6.5 amplifiziert. Die dafür benötigten Primer sind in Tabelle 6.2 gelistet. Anschließend wurden beide Thiolasen jeweils über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* *in frame* in die Multiple Cloning Site von pMTL82151 ligiert (2.7.2), sodass sie von den in diesem pMTL-Modul befindlichen transkriptionellen Terminatoren TT1 und TT2 stromauf- und -abwärts flankiert werden (Abbildung 3.19).

Die korrekte Insertion der *C. acetobutylicum* bzw. *C. saccharobutylicum* Thiolase in pMTL82151 wurde über eine *E. coli* Kolonie-PCR (2.6.6) und Sanger Sequenzierung (2.13.1) überprüft. Hierfür wurden die Primer 82151_Check_Thl_fw/rv genutzt. Die Expressions-Plasmide wurden im Anschluss über tri-parentale Konjugation (2.9.2) in *C. kluyveri* eingebracht. Die erfolgreiche Plasmidtranskonjugation wurde durch eine Kontroll-PCR mit den Primern 82151_Check_Thl_fw/rv nachgewiesen (2.6.6).

2.7.5 Konstruktion von Basisvektoren für das *codBA*-basierte Plasmidsystem

Für die *codBA* Basisvektoren wurde das Gibson Assembly unter Verwendung des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix nach 2.7.1 angewendet. Die benötigten DNA-Fragmente wurden über PCR mit der Q5 DNA Polymerase nach 2.6.5 generiert und aufgereinigt (2.6.3). Alle *codBA*-Plasmide dieser Arbeit gehen auf das Shuttleplasmid pHE1-C2 zurück und sind in Tabelle 2.6 gelistet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Zunächst wurde für das Plasmid pMS1_fdx der Gram-positive Replikationsursprung IM13 gegen CB102 getauscht. Hierfür wurde das pHE1-C2 Backbone mit den Primern pHE1_S_pCB102_fw/rev ohne den Ori IM13 amplifiziert. Zusätzlich wurde der Ori CB102 über die Primer pCB102_S_pHE1_fw/rev aus pMTL83151 ebenfalls über PCR als Insert für pHE1_C2 gewonnen. Der erfolgreiche Ori Tausch wurde in pMS1_fdx über Sanger Sequenzierung mit pMS1_Check_pCB102_fw/rev nachgewiesen.

Im Anschluss wurde für das Plasmid pMS1_upp der in pMS1_fdx vor dem *codBA*-Gen vorhandene Ferredoxin-Promotor P_{fdx} aus *C. sporogenes* gegen den Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPP) Promotor P_{upp} aus *C. ljungdahlii* ausgetauscht. Das Backbone pMS1_fdx ohne P_{fdx} wurde dafür über pMS1_S_upp_fw/rev generiert. Als neuer Promotor für *codBA* wurde eine ca. 200 bp großer Abschnitt vor dem *upp*-Gen aus *C. ljungdahlii* DSM 13528^T (*CLJU_c02320*) mit den Primern upp_S_pMS1_fw/rev und gDNA als Template amplifiziert. Eine Kontrolle des neuen Promotorregion in pMS1_upp erfolgte durch einen Kontrollverdau mit *NdeI* nach (2.6.9), sowie einer Sanger-Sequenzierung nach 2.13.1 mit dem Primer codBA_Seq.

Ferner wurde in pMS1_upp während der Bachelorarbeit von Jennifer Reif (2022) unter meiner Anleitung der Ori CB102 gegen BP1 aus pMTL82151 über Restriktionsbasierte Klonierung getauscht (2.7.2). Das pMS1_upp Backbone wurde hierzu mit den Primern pMS1_Ori_FseI_fw und pMS1_Ori_AscI_rv über PCR amplifiziert (2.6.5). Der Ori BP1 wurde über einen Restriktionsverdau mit *AscI* und *FseI* aus pMTL82151 geschnitten und über ein Agarosegel nach 2.6.4 aufgereinigt. Nach der Ligation wurde der erfolgreiche Ori-Tausch in pMS2_upp über eine Kontroll-PCR (2.6.6) und Sanger-Sequenzierung (2.13.1) mit den Primern pMS2_Check_pCD6_fw/rv nachgewiesen.

2.7.6 Konstruktion von *codBA*-Deletionsplasmiden für das *C. kluyveri* Typ-II RM-Systems

Alle erfolgreich konstruierten *codBA*-Deletionsplasmide sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Die für die Konstruktion erwähnten Primer sind Tabelle 6.4 zu entnehmen.

Das Plasmid pMS1_upp_Δ2671 zur vollständigen Deletion des *C. kluyveri* Typ-II RM-Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Dazu wurden homologen Flanken (ca. 1,0 kb) zwischen Ori BR322 und der *oriT/traJ*-Region von pMS1_upp über ein Gibson Assembly mit dem SLICE Extrakt (2.7.1)

eingefügt. Hierzu wurde das Backbone über PCR nach 2.6.5 mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase und pMS1_S_2671_fw2/rev2 amplifiziert. Die homologen Flanken wurden ebenfalls über PCR mit der Q5 DNA Polymerase von gDNA mit 2671_UF_fw2/rev bzw. 2671_LF_fw/rev2 generiert. Vor dem Assembly wurden die Fragmente nach 2.6.3 aufgereinigt. Zum Nachweis einer erfolgreichen Plasmidkonstruktion wurde ein Kontrollverdau nach 2.6.9, sowie eine Sanger-Sequenzierung mit den Primern S8_ColE1_fw und S9_oriT_rv nach 2.13.1 durchgeführt.

Zudem entstanden vier weitere Plasmide zur Deletion des Typ-II RM-Systems von *C. kluyveri* während der Bachelorarbeit von Jennifer Reif (2022) unter meiner Anleitung. Hierbei wurden die homologen Flanken zwischen dem *codBA*-Gen und der *catP*-Kassette über das Gibson Assembly mit dem NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix nach 2.7.1 eingefügt. Die benötigten DNA-Fragmente wurden über PCR mit der PrimeSTAR® Max oder GXL DNA Polymerase nach 2.6.5 generiert und aufgereinigt (2.6.3). Das Backbone pMS1_upp oder pMS2_upp wurde über pMS1_upp_Flanken_fw/rv gewonnen. Die homologen Flanken zur Deletion des vollständigen *C. kluyveri* Typ-II RM-Systems (*CKL_2669-2672*) wurden mit einer Länge von je ~ 1,0 kb über gDNA mit 2671_UF_fw_JR, 2671_UF_rev, 2671_LF_fw und 2671_LF_rev_JR generiert. Zur Deletion des potenziellen Typ-II REase Gens *CKL_2670* in *C. kluyveri* wurden mit CKL2670_UF_fw/rv bzw. CKL2670_LF_fw/rv homologe Flanken mit einer Länge von je ~ 0,9 kb ebenfalls über gDNA amplifiziert. Nach erfolgreicher Ligation der beiden Deletionsflankenpaare in pMS1_upp bzw. pMS2_upp wurden diese über eine Kontroll-PCR (2.6.6) und Sanger-Sequenzierung (2.13.1) mit pMS1_Check_pCB102_fw/rv kontrolliert.

2.8 Untersuchung von Restriktionsendonukleasen in *C. kluyveri*

2.8.1 Herstellung eines Zellextraktes, modifiziert nach Yang *et al.* (2016)

Mit Hilfe eines zellfreien Extraktes (ZFE) kann schnell und einfach die Aktivität von bakteriellen Restriktionsendonukleasen bestimmt werden (Whitehead *et al.* 1985). Für den hierzu benötigten ZFE wurde eine 50 mL über Nacht Kultur von *C. kluyveri* in TM 4040 Medium angesetzt und die Zellen im Anschluss in ihrer exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-0,6$) geerntet (3.000 x g, 10 min, 4 °C). Alle nachfolgenden Schritte wurden mit Ausnahme der Zentrifugation und des FastPrep mit anaeroben Lösungen und im Anaerob-Zelt durchgeführt. Nach Abnahme des Kulturüberstandes wurde das Zellpellet einmal in 15 mL Lyse-Puffer (Tabelle 2.25) gewaschen (3.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Zellaufschluss erfolgte mit den in je 500 µL Lyse-Puffer aufgenommenen Pellets über FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Irvine, USA) drei Mal für je 30 s mit 40 m/s in Schaubdeckel-Eppis mit Zirkonia/Glas-Kügelchen (Ø 0,1 mm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Danach wurden die Kügelchen abzentrifugiert (16.550 x g, 30 min, 4°C) und der Überstand in einem Eppendorf Tube mit

Material und Methoden

25 µL 1 M NaCl vermischt (NaCl = 50 mM f.c.). Nach 10 min auf Eis wurden die Proben erneut für 10 min bei 16.550 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit anaeroben Glycerin zu einer finalen Konzentration von 50 % (v/v) versetzt. Der ZFE wurde als 50 µL Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die Proteinkonzentration des ZFE wurde über das Bradford Assay nach 2.14.2 bestimmt. Vor dem Aktivitäts-Assay (2.8.2) wurden zu 50 µL ZFE 5 µL BSA (10 mg/mL; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zugegeben.

Tabelle 2.25. Zusammensetzung des anaeroben Lyse-Puffers für den zellfreien Extrakt

Bestandteil	Stocklösung	Finale Konz.	Für 100 mL
Tris-HCl (pH 8,0)	1 M	10 mM	1 mL
EDTA	100 mM	1 mM	1 mL
Beta-Mercaptoethanol	-	10 mM	697,5 µL
dd H ₂ O	-	-	ad 100 mL

2.8.2 Restriktionsendonuklease Aktivitäts-Assay

Die Aktivität des ZFE wurde Anhand von Shuttle Plasmiden der pMTL8000 Serie (Heap *et al.* 2009) Tabelle 2.4) ermittelt. Hierzu wurden die als Template verwendeten Shuttle-Plasmide entweder alleine, oder gemeinsam mit den nach 2.7.3 konstruiertem, potenziellen *C. kluuyveri* Methylierungs-Plasmiden pCKL_2314, pCKL_3239, pCKL_2671 bzw. pCKL_2671-Lac (Tabelle 2.3) aus *E. coli* TOP10 über Nacht Kulturen extrahiert. Bei pCKL_2671-Lac wurde ggf. die *E. coli* über Nacht Kultur mit 0,1 mM IPTG oder 0,1 mM Laktose induziert. Die Reaktionsansätze (Tabelle 2.26) wurden in einem Thermocycler für 0,5-4 h bei 37 °C inkubiert und danach über ein 0,8 % (w/v) Agarosegel analysiert. Bei den Negativkontrollen wurde der ZFE durch MQ H₂O ersetzt.

Tabelle 2.26. Reaktionsansatz für das Restriktionsendonuklease Aktivitäts-Assay

Reagenz	Menge
Shuttle Plasmid (= Template)	1 µg
ZFE (mit BSA versetzt; 1:4 verdünnt) oder MQ H ₂ O	4 µL
Fast Digest Puffer ohne Loading Dye (Thermo Fisher)	2 µL
MQ H ₂ O	ad 20 µL

2.9 Methoden zur Transformation von DNA

2.9.1 Hitzeschock Transformation von *E. coli*

Zur Gewinnung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. Hierzu wurde eine 100 mL *E. coli* Hauptkultur in LB-Medium auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 aus einer über Nacht Kultur angeimpft und die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 im Schwingrotor bei 4.500 rpm, 0 °C für 5 min geerntet. Anschließend wurde das Pellet in 50 mL gekühlter, 100 mM CaCl₂-Lösung gewaschen und erneut abzentrifugiert (Schwingrotor, 4.500 rpm, 0 °C, 5 min). Das Pellet wurde in 10 mL gekühlter, 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, mit 2 mL 87 % (v/v) Glycerin versetzt und als 100 µL Fraktionen bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die auf Eis aufgetaute, chemisch kompetente *E. coli* Zellen zunächst zusammen mit 5 µL Klonierungsansatz bzw. 200 ng Plasmid für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Thermoblock, gefolgt von weiteren 5 min Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen zusammen mit 900 µL SOC-Medium (2.3.1) für 1 h bei 37 °C schüttelnd bei 800 rpm regeneriert. Zur Selektion wurden 100 µL, sowie die über Zentrifugation (1.520 x g, 3 min) aufkonzentrierte restliche Zellsuspension auf LB-Agar (Tabelle 2.14) + Antibiotikum (Tabelle 2.20) ausplattiert und für 1-2 Tage bei 37 °C bebrütet. Gewachsene Einzelkolonien wurden entweder über Kolonie-PCR (2.6.6) oder mit einem im Anschluss an die Plasmidextraktion (2.6.2) durchgeführten Restriktionsverdau (2.6.9) überprüft.

2.9.2 Tri-parentale Konjugation von *C. kluyveri*

Für die Durchführung der Konjugation wurden 0,1 mL einer 1:10 verdünnten *C. kluyveri* Sporensuspension in 5 mL DSMZ-52 Medium durch Pasteurisieren reaktiviert (2.4.5). Nach 4 Tagen bei 37 °C wurden 0,5 mL der reaktivierten Kultur in 10 mL TM 4040 Medium überimpft. Diese Hauptkultur wurde für 16 h bei 37 °C bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen (OD₆₀₀ ca. 0,4-0,6).

Parallel dazu wurden der *E. coli* CA434 Helferstamm, sowie der *E. coli* TOP 10 Donorstamm aus Glycerinstocks über Nacht in 5 mL LB-Medium (Tabelle 2.14) + Antibiotikum (Tabelle 2.20) als Vorkulturen angezogen. Hierbei trug der Donorstamm neben dem zu Übertragenden Plasmid zusätzlich auch das *C. kluyveri* Methylierungsplasmid pCKL2671 oder pCKL2671_Lac. Aus den *E. coli* Vorkulturen wurden 5 mL LB + Antibiotikum Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen. Bei dem pCKL2671_Lac Methylierungsplasmid wurde zusätzlich in der Hauptkultur 0,1 mM IPTG zur Induktion des Lac-Promotors zugesetzt.

Die *E. coli* Hauptkulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 geerntet und zweimal in 1 mL steriler 1x PBS gewaschen (10.000 rpm, 3 min). Beim zweiten Waschschriff wurden hierbei *E. coli* Helfer- und Donor-Stamm zusammengegeben und der Überstand im Anschluss sorgfältig mit einer Pipette abgenommen. Zudem wurde pro Konjugationsansatz 1 mL *C. kluyveri* Hauptkultur in 1,5 mL Eppis abzentrifugiert (15.000 rpm, 5 min, 4 °C). Kulturüberstände wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellpellet in 40 µL steriler, anaerober 1x PBS gelöst. *E. coli* Donor- und Helferstamm wurden in der *C. kluyveri* Zellsuspension aufgenommen und diese auf eine TM 4040 Matingplatte (2.3.2) als Spot aufgetropft. Nach 2 Tage bei 37 °C wurde die Zellmasse der Spots in 0,4 mL TM 4040 Medium resuspendiert und zu je 0,1 mL auf TM 4040 Selektivplatten mit 10 mg/L Tm und 10 mg/L Col (2.3.2) ausplattiert. Erste Kolonien waren auf den Selektivplatten nach 5-12 Tagen sichtbar.

Zur Überprüfung wurden die Transformanten sowohl auf eine neue TM 4040 Selektivplatte ausgestrichen, als auch in 5 mL TM 4040-Medium mit 10 mg/L Col und 10 mg/L Tm angeimpft. Nach 1-3 Tagen bei 37°C wurde aus den angewachsenen Flüssigkulturen (OD₆₀₀ ≥ 0,3) gDNA nach 2.6.1 extrahiert. Diese konnte im Anschluss zu 50 ng als Template für Kontroll-PCR Ansätze nach 2.6.6 eingesetzt werden. Ferner wurde die Identität der gewonnenen Transkonjuganten über 16s rRNA-Sequenzierung nach 2.5.6 überprüft.

2.10 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

2.10.1 Oligonukleotidgensonden

Die FISH rRNA-Oligonukleotidgensonden wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und an ihrem 5' Ende mit verschiedenen Fluorophoren markiert (Tabelle 2.27).

Tabelle 2.27. FISH-Gensonden dieser Arbeit

Sonde	Organismus	rRNA	Sequenz (5' → 3')	GC	<i>E. coli</i> Position	Fluoro- phor	Quelle
ClosKluy	<i>C. kluyveri</i>	23S	GCGGACTCCCCT TCAAAG	61%	1516	AF488	Schneider <i>et al.</i> (2021)
ClosCarb	<i>C. carboxi- divorans</i>	23S	AGCCACTCCCCA TCACAC	61%	1516	Cy 3.5	Schneider <i>et al.</i> (2021)
KCLZ	<i>C. kluyveri</i>	16S	CCTGCACACCCT TTACGCCCAGTA ATTCCGGACAA	54%	551	AF488	Hu <i>et al.</i> (2018)
EUB338 I	Viele Bakterien	16S	GCTGCCTCCCGT AGGAGT	67%	338	Cy 3	Amann <i>et al.</i> (1990b)

2.10.2 Design und Analyse von FISH Oligonukleotidsonden

Die Methode zum Design der spezifischen 23S rRNA Oligonukleotidsonden-Sequenzen für *C. kluveri* (ClosKluy) und *C. carboxidivorans* (ClosCarb) mit dem ARB-Softwarepaket (Version 6.0.6) (Ludwig *et al.* 2004) wurde bereits in Schneider *et al.* (2021) publiziert. Kurz zusammengefasst, wurden hierfür 23S rRNA-Gensequenzen der *Firmicutes* (neue Bezeichnung *Bacillota*) und *Clostridiales* aus der SILVA Datenbank (Quast *et al.* 2013) für die große ribosomale Untereinheit (Version 138.1) und der REF-Sammlung herangezogen. Mit den 50 längsten, hochqualitativen 23S rRNA-Gensequenzen (>2.900 Nukleotide) wurde ein einfacher Konsensusbaum über drei verschiedene bioinformatische Methoden zur Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen (neighbor joining, parsimony, RaxML) berechnet. Kürzere 23S rRNA-Sequenzen wurden über die Methode „add sequences to the existing tree“ nachträglich hinzugefügt. Die beiden Monophyla von *C. kluveri* und *C. carboxidivorans* wurden als Grundlage für das Sonden-Design herangezogen. Probe Match Analysen mit potenziellen Sonden-Sequenzen wurden sowohl für *Clostridiales* und *Firmicutes* (*Bacillota*) gegen die interne ARB-Datenbank, als auch für alle drei Domänen mit SILVA TestProbe 3.0 (<https://www.arb-silva.de/search/testprobe/>) durchgeführt. Die optimalen Hybridisierungsbedingungen für ClosKluy und ClosCarb wurden in einer aufsteigenden Formamid-Reihe (Tabelle 2.28) experimentell bestimmt. Die Spezifität beider Sonden wurde ferner in Hybridisierungsexperimenten mit verschiedenen Referenzstämmen aus der Gattung *Clostridium* nachgewiesen.

2.10.3 Zellfixierung für FISH, modifiziert nach Amann (1995)

Alle Kulturen wurden für die FISH auf eine OD₆₀₀ von 0,5 über Zentrifugation (15.000 rpm, 5 min, 4 °C) geerntet, einmal in 1,0 mL 1x PBS gewaschen und im Anschluss mit Ethanol oder Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Zur Zellfixierung mit Ethanol wurden die Pellets lediglich in 800 µL eisgekühltem, 50% (w/v) Ethanol absolute in 1x PBS resuspendiert. Für die PFA-Fixiermethode wurde eine 4 % (w/v) PFA-Lösung hergestellt. Hierzu wurden 2,0 g PFA in 30 mL H₂O (ca. 60 °C) durch Zugabe von 1-2 Tropfen 1 M NaOH unter Rühren gelöst. Nach Beimischung von 16,6 mL 3x PBS wurde der pH-Wert mit HCl auf 7,2-7,4 eingestellt und die Lösung auf 50 mL aufgefüllt. Nach dem Sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße) wurde die Lösung bei -20 °C gelagert. Zur PFA-Fixierung wurden die Zellpellets in 600 µL 4% (w/v) PFA-Lösung für 4 h auf Eis inkubiert, zweimal in 1,0 mL 1x PBS gewaschen (15.000 rpm, 5 min, 4 °C) und in 800 µL 50% (w/v) Ethanol absolute in 1x PBS gelöst. Nach dem Fixieren mit Ethanol oder PFA wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.10.4 *In situ* Hybridisierung

Die Hybridisierung von Zellen mit rRNA Oligonukleotidsonden (Tabelle 2.27) wurde, wie bereits beschrieben, auf Teflon beschichteten Objektträgern (10 Well, 6.7 mm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit leichten Modifizierungen durchgeführt (Amann 1995).

Kurz zusammengefasst, wurden die die mit Ethanol oder PFA fixierten Zellen aus 2.10.3 1:4 mit 1x PBS verdünnt, 10 µL auf die Wells der Objektträger gespottet und bei 46 °C ca. 30 min getrocknet. Die Zellen auf dem Objektträger wurden in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe mit 50 %, 80 % und 96 % (w/w) für je 3 min dehydriert und im Anschluss bei RT getrocknet. Zum Aufschluss Gram-positiver Zellwände wurden auf die Spots je 24 µL einer 10 mg/mL Lysozym Lösung („from chickenegg white“, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgetragen, welche zuvor 1:3 mit 1x PBS verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte in Abhängigkeit der verwendeten Zellfixierungsmethode mit 10 min auf Eis für Ethanol, beziehungsweise bei 37 °C für 30 min in einer Feuchtigkeitskammer für PFA fixierte Proben. Danach wurde das Lysozym mit kaltem MQ H₂O von den Objektträgern gewaschen. Die trockenen Objektträger wurden wie zuvor erneut in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert und Luftgetrocknet. Für die Hybridisierung wurden 50 ng Oligonukleotidsonde (Tabelle 2.27) zu 10 µL Hybridisierungspuffer (Tabelle 2.28) gegeben, auf die Proben getropft und für 2 h bei 46 °C in einer dunklen, isotonischen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Hierbei wurde für EUB 338 I die bereits als optimal bestimmte Formamid-Konzentration von 20 % (v/v) verwendet (Amann *et al.* 1990b). Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger mit kaltem MQ H₂O ab gespült und zweimal für 30 min bei 48 °C in Waschpuffer gewaschen, wobei dieser an die im Hybridisierungspuffer zuvor verwendete Formamid-Konzentration angepasst wurde (Tabelle 2.29). Gewaschene Objektträger wurden erneut mit MQ H₂O ab gespült und zügig mit Druckluft getrocknet. Zur Konservierung wurden die Objektträger mit Mowiol 4-88, welches 25 mg/mL DABCO enthielt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), überschichtet und über Nacht bei RT getrocknet.

Zum Ausschluss unspezifischer Fluoreszenzsignale wurden bei allen Hybridisierungs-Experimenten folgende Kontrollen durchgeführt: FISH mit EUB 338 I als Positivkontrolle; FISH ohne Sonden zur Bestimmung der Autofluoreszenz; FISH mit nicht-Zielorganismen der jeweiligen Sonden zum Ausschluss einer unspezifischen Nukleinsäure-Bindung.

Material und Methoden

Tabelle 2.28. Zusammensetzung des FISH-Hybridisierungspuffers (2 mL) mit 0-50% (v/v) Formamid

Formamid	0%	10%	20%	30%	40%	50%
5 M NaCl	360 µL					
1 M Tris/HCl	40 µL					
MQ H ₂ O	1,6 mL	1,4 mL	1,2 mL	1,0 mL	0,8 mL	0,6 mL
Formamid	-	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	0,8 mL	1,0 mL
10% (w/v) SDS	2 µL					

Finale Konzentrationen: 0,9 M NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,01% (w/v) SDS; 0–50% (v/v) Formamid.

Tabelle 2.29. Zusammensetzung des FISH-Waschpuffers (50 mL) in Abhängigkeit von der im Hybridisierungspuffer verwendeten Formamid Konzentration

Formamid	0%	10%	20%	30%	40%	50%
5 M NaCl	9,0 mL	4,5 mL	2,15 mL	1,02 mL	0,46 mL	0,18 mL
1 M Tris/HCl	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
0,5 M EDTA	-	-	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
MQ H ₂ O	40 mL	44,5 mL	46,35 mL	47,48 mL	48,04 mL	48,32 mL
10% (w/v) SDS	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Finale Konzentrationen: 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,01% (w/v) SDS; 9–450 mM NaCl; ggf. 5 mM EDTA.

2.10.5 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung hybridisierter Zellen erfolgte mit dem Axio Imager. M1 Epifluoreszenzmikroskop und der Kamera Axio Cam MR 3. In Abhängigkeit des Fluorophors der jeweiligen FISH-Sonde wurde für die Aufnahmen Filter Set 17 für AF488, Set 43 für Cy3, beziehungsweise Set 45 für Cy3.5 verwendet. Als Immersionsöl wurde Immersol™ 518F aufgetragen. Bilder wurden mit der ZEN 3.0 (blue edition) Software bearbeitet (alle Produkte von Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland).

2.11 Arbeit mit RNA

2.11.1 Zellaufschluss mit der Kugelmühle

Bei der Durchführung von Transkriptomanalysen über „Next Generations Sequencing“ (NGS) nach 2.13.2 spielt die Qualität der verwendeten RNA eine entscheidende Rolle. Um einem vorzeitigen Abbau der RNA entgegenzuwirken, wurde daher der Zellaufschluss von *C. kluveri* Transkriptomproben (2.4.9) mit der Kugelmühle (Mikro-Dismembrator U, Sartorius, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Zellmaterial in einem mit flüssigem

Stickstoff gekühlten PTFE-Behälter zusammen mit einer Stahlkugel mechanisch zu einem feinen Pulver zermahlen. Die kontinuierliche Kühlung während der Probenvorbereitung und des Zellaufschlusses soll hierbei insbesondere zur Stabilisierung der für die Sequenzierung benötigten mRNA beitragen.

Zunächst wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fermentation (2.4.9) 4 mL *C. kluyveri* Kultur steril mit Spritze und Kanüle aus dem Rührkesselreaktor entnommen und direkt in auf Eis gekühlte 15 mL Falcons überführt. Die Zellen wurden unmittelbar danach in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4 °C und 4.500 rpm für 10 min geerntet und der Kulturüberstand sorgfältig abgenommen. Die Pellets wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bzw. auf Trockeneis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für den Zellaufschluss in der Kugelmühle wurden die *C. kluyveri* Zellpellets auf Eis aufgetaut und in 100 µL TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. In der Zwischenzeit wurde der PTFE-Behälter zusammen mit der Stahlkugel in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die in TE-Puffer gelösten Zellen wurden danach in den PTFE-Behälter mit Stahlkugel und etwas Stickstoff getropft. Der sorgfältig verschlossene Behälter wurde in den Dismembrator eingespannt und die Zellen darin bei 1.600 rpm für 3 min zu einem feinen, weißen Pulver gemahlen. Dieses Pulver wurde sorgfältig in 1 mL TRIzol™ Reagenz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) aufgenommen. Da das im TRIzol™ Reagenz enthaltene Guanidin Isothiocyanat RNase Aktivität inhibiert, konnten die Proben bis zur RNA-Extraktion nach 2.11.2 für einige Stunden bei 4 °C gelagert werden.

2.11.2 RNA-Isolierung mit dem TRIzol™ Reagenz

Nachdem die *C. kluyveri* Zellen für die Transkriptomanalysen mit der Kugelmühle nach 2.11.1 aufgeschlossen worden sind, wurde die RNA mit Hilfe des TRIzol™ Reagenzes (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben extrahiert. Bei dieser Methode kann nach einer Phasentrennung mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) die in der oberen, wässrigen Phase enthaltene RNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt werden. Die RNA wurde danach in 50 µL RNase freiem H₂O für 10 min bei 58 °C gelöst. Im Anschluss wurden ein DNase Verdau 2.11.4, sowie eine erneute Fällung der RNA nach 2.11.5 durchgeführt.

2.11.3 RNA-Isolierung mit dem FastRNA™ Pro Blue Kit

Für qRT-PCR Analysen wurde die RNA mit dem FastRNA™ Pro Blue Kit (Tabelle 2.9) aus 2 mL *C. kluyveri* Übernacht Kultur nach modifizierten Herstellerangaben extrahiert. Zum besseren Aufschluss Gram-positiven Zellen wurde zu Beginn des Protokolls zusätzlich ein Lysozym-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden die Zellpellets in 50 µL 1x PBS und 10 µL Lysozym (50 mg/mL in 10 mM

Tris/HCL, pH 8,0) gelöst. Nach 10 min bei 37 °C wurden die Zellen geerntet (12.000 x g, 3 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde 1 mL RNApro™ Lösung zu den Pellets gegeben (vgl. Manual Schritt 4) und dem Herstellerprotokoll Folge geleistet. Um die Reinheit der RNA zu erhöhen, wurde ein zusätzlicher Extraktionsschritt durchgeführt. Dazu wurde zu der in Schritt 13 gewonnenen wässrigen Phase 200 µL Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugegeben und die wässrige Phase über Zentrifugation (12.000 x g, 5 min, 4 °C) erneut geerntet. Danach wurde mit Schritt 14 des Manuals fortgefahren. Nach der Ethanol-Fällung wurde die RNA in 50 µL RNase freiem H₂O für 10 min bei 58 °C gelöst. Danach erfolgte wie in 2.11.4 beschrieben der DNase Verdau, sowie eine Fällung der RNA (2.11.5).

2.11.4 DNase I Verdau

Um Mögliche DNA Verunreinigungen in den RNA-Proben zu entfernen, wurde ein Verdau mit DNase I (Tabelle 2.10) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nach Herstellerangaben zu 50 µL RNA 2 µL DNase I und 5 µL DNase I Puffer zugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die DNase I nach Zugabe von 5 µL 50 mM EDTA bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Eine erfolgreicher Verdau wurde im Anschluss durch eine Konrtoll-PCR (2.6.6) überprüft. Hierzu wurden wahlweise die Primer CKL2938_S_pJL2_fw/rev für gDNA oder 82151_Check_Thl_fw/rv für das pMTL82151 Plasmid verwendet.

2.11.5 Fällung der RNA

Dieser Schritt dient sowohl der Entfernung von Verunreinigungen, als auch einer Aufkonzentrierung der RNA. Dazu wurden 50 µL RNA vorsichtig mit 690 µL Ethanol absolute, 27,6 µL 3 M NaOAc in RNase freiem H₂O und 0,5 µL Glycogen (20 µg/µL; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemischt. Die Fällung der RNA wurde bevorzugt über Nacht bei -20 °C oder alternativ für 2 h bei -80 °C durchgeführt. Danach konnte die RNA über Zentrifugation für 20 min bei 12.000 x g und 4 °C geerntet werden. Nach zwei Waschschritten mit je 1 mL 70 % (v/v) Ethanol (5 min, 12.000 x g, 4 °C) wurde die RNA offen bei RT getrocknet und in 25 µL RNase freiem H₂O gelöst.

Die Qualität der RNA wurde zum einen über ein 1,2 % (w/v) Agarosegel geprüft, wobei jeweils 1 µL RNA mit 2x RNA Loading Dye (Tabelle 2.11) aufgetragen wurden. Zum anderen wurde die RNA 1:10 Verdünnt am NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (PEQLAB; VWR, Pennsylvania, USA) gemessen. Als Richtwerte wurden hierbei für reine RNA ein A₂₆₀/280 Wert von >2,0, sowie ein A₂₆₀/230 Wert von ~2,0 angenommen. Für qRT-PCR Messungen erfolgte im Anschluss eine cDNA-Synthese nach 2.11.6.

2.11.6 Reverse Transkription

Um die in 2.11.3 gewonnene RNA als Template für qRT-PCR Messungen (2.12.1) verwenden zu können, wurde diese in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit (Tabelle 2.9) nach Herstellerangaben verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Bestimmung der Dynamic Range (vgl. 2.12.1) mit 100 ng RNA, sodass nachfolgend von den 1:10 verdünnten Stocks 50 ng cDNA in den qRT-PCR Mastermix eingesetzt werden konnten. Zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen in der RNA wurden zusätzlich Kontrollreaktionen ohne Reverse Transkriptase (NRT) für alle Proben mit angesetzt.

2.12 qRT-PCR Analysen

2.12.1 Etablierung des qRT-PCR Assays

Die Echtzeit Reverse Transkriptions PCR (= real-time RT-PCR oder qRT-PCR) ist eine Quantifizierungsstrategie für spezifische mRNA in biologischen Proben (Bustin 2000). Für die Etablierung des qRT-PCR Assays zum Nachweis von Thiolase-mRNA in *C. kluyveri* Transkonjuganten wurden die Hinweise von Bustin *et al.* (2009) und Taylor *et al.* (2010) mit einbezogen.

Das Design für die Primer zum Nachweis des Referenzgens *gyrA1* aus *C. kluyveri*, sowie den Zielgen *thl* aus *C. acetobutylicum* erfolgte mit Softwareanwendung PrimerQuest™ (IDT, Coralville, USA). Die Parameter für die Primer wurden folgendermaßen definiert: Schmelztemperatur 62°C, Länge 22 nt und Fragment-Länge ~100 bp. Für alle Primer-Paare wurde die optimale Annealing-Temperatur (T_A) über eine Gradientent-PCR bestimmt. In den folgenden Messungen wurde daraufhin bei den *gyrA1* Primern CK_GyrA1_fw/rv eine $T_A = 61^\circ\text{C}$ und bei den *thl* Primern Cac_Thl_fw/rv eine $T_A = 57^\circ\text{C}$ verwendet.

Zur Validierung des qRT-PCR Assays wurde zum einen der „Dynamic Range“ der cDNA-Synthesereaktion nach 2.11.6 mit einer RNA-Verdünnungsreihe von 1 µg-1pg bestimmt. Zum anderen wurde die PCR-Effizienz der Primer-Paare bei ihrer optimalen T_A mit Hilfe einer gDNA bzw. Plasmid Verdünnungsreihe (5 ng-5 pg) berechnet. Die C_T -Werte wurden hierzu gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration aufgetragen. Aus der Steigung berechnet sich die Effizienz wie folgt:

$$\text{Effizienz} = (10^{-1/\text{Steigung}}) - 1$$

Optimal soll die Effizienz zwischen 0,9-1,1 liegen, was einer Verdopplung des Templates pro Zyklus entspricht.

2.12.2 Durchführung der qRT-PCR Messungen

Alle qRT-PCR Messungen wurden mit dem SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Tabelle 2.9) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Reaktionsmix wird die Amplifizierung der Zielsequenz über die unspezifische Einlagerung des Farbstoffes SYBR® Green in doppelsträngige DNA überwacht. Die Primer wurden zu einer finalen Konzentration von 250 nM und das cDNA-Template zu 50 ng in 20 µL Reaktionsmix eingesetzt. Für die Messungen wurde das BioRad® CFX96™ Real-Time PCR Detection System unter Verwendung des in Tabelle 2.30 gezeigten Temperaturprofils verwendet. Die Messung der nach 2.11.3 gewonnenen und in cDNA umgeschriebenen RNA erfolgte in biologischen Duplikaten als technische Triplikate jeweils mit den Primern für das Referenzgen *gyrA1* oder des Zielgens *thl* (vgl. 2.12.1).

Tabelle 2.30. Temperaturprofil der qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 s	1
Denaturierung	95°C	10 s	
Annealing	57°C oder 61°C ¹	10 s	40
Extension ²	60°C	15 s	
Denaturierung	95°C	5 s	1
Schmelzkurve ²	65°C		1
	95°C Δ0,5°C		

¹T_A = 57°C für CK_GyrA1_fw/rv und T_A = 61°C für Cac_Thl_fw/rv. ²Fluoreszenzmessung im Anschluss des jeweiligen Schrittes.

2.12.3 Relative Quantifizierung

Zur Auswertung der qRT-PCR Messungen wurde die Methode der relativen Quantifizierung nach Pfaffl (2001) herangezogen. Dieses mathematische Modell wird verwendet, wenn der Unterschied der berechneten PCR-Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen $\geq 0,05$ ist. In dieser Arbeit wurde das Zielgen, die Thiolase aus *C. acetobutylicum*, in *C. kluyveri* Transkonjuganten bezüglich des Referenzgens *gyrA1* quantifiziert. Da das zu quantifizierende Thiolase-Gen plasmidcodiert ist, wurde als Referenzprobe ein *C. kluyveri* Transkonjugant mit dem Leer-Plasmid pMTL82151 herangezogen. Der Unterschied in der Genexpression wurde über folgender Formel berechnet:

$$\text{Unterschied Genexpression} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen (Referenzprobe-Testprobe)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen (Referenzprobe-Testprobe)}}$$

E = berechnete PCR-Effizienz für Zielgen (*thl*) und Referenzgen (*gyrA1*)

ΔC_T = Differenz der C_T-Werte zwischen Referenz- und Testprobe

2.13 Sequenzierungen

2.13.1 Sanger Sequenzierung

Zur Überprüfung von neuen Plasmiden aus Gibson Assembly (2.7.1) oder Restriktionsbasierten Klonierungs-Ansätzen (2.7.2), sowie für die Identifizierung von Bakterien über die 16S rRNA (2.5.6), wurde die Sequenzierungsmethode nach Sanger *et al.* (1977) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte extern über die Firma Azenta Life Science GENEWIZ (Leipzig, Deutschland). Nach Herstellerangaben wurden hierzu 150-500 ng Plasmid-DNA bzw. 50-250 ng PCR-Produkt mit 25 µM eines Sequenzierprimers gemischt und dem Dienstleister zugesendet.

2.13.2 Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNAseq)

Die Bioinformatischen Daten zur Analyse des Transkriptoms von *C. kluyveri* wurden über „Next Generation Sequencing“ (NGS) in Zusammenarbeit mit der „ZIEL Core Facility Microbiome“ unter der Leitung von Prof. Klaus Neuhaus generiert (TUM School of Life Science, Freising, Deutschland). Die für die Untersuchungen zugrunde gelegten Batchfermentationen wurden hierzu nach 2.4.9 in einem STR durchgeführt. Die RNA-Extraktion aus den Fermentationsproben erfolgte durch einen Zellaufschluss mit der Kugelmühle (2.11.1), sowie mit dem TRIzol™ Reagenz (2.11.2).

Die weitere Prozessierung der RNA, sowie die Durchführung der „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“ (RNAseq) wurde im Anschluss durch die Core Facility wie bereits beschrieben vorgenommen (Landstorfer *et al.* 2014). Kurz zusammengefasst, wurde hierzu zunächst über das MICROBExpress™ Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) die rRNA aus den gesamt-RNA-Proben entfernt. Danach erfolgte die Herstellung der Sequenzier-Libraries über das TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit nach Herstellerangaben (Illumina, San Diego, CA, USA). Die ‚single-read‘-Sequenzierung der Libraries (SR150, 20 mio reads, ‚strand specific‘) wurde nachfolgend an einem NovaSeq™ System (Illumina, San Diego, CA, USA) ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurden die bioinformatischen Daten nach Kapitel 2.15.4 von Dr. Armin Ehrenreich prozessiert.

2.14 Analytische und quantitative Methoden

2.14.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für organischen Säuren und Alkoholen

Eine Quantifizierung von organischen Säuren und Alkoholen in Kulturüberständen erfolgte am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM School of Engineering and Design, Garching, Deutschland) durch Miriam Bäumler. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde an einem Finnigan Surveyor Plus System (Thermo Fisher, Waltham, USA) mit einem Brechungsindex Detektor durchgeführt. Kulturüberstände wurden hierfür vor der Injektion mit einem Zellulosefilter (0,2µM Porengröße, Chromafil RC20/15 MS, MN, Düren, Deutschland) sterilisiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Pro Probe wurden 10 µL über eine „Micro-Guard Cation H“ Kartuschensäule in Kombination mit einer Aminex-HPX-87H Ionenaustauschersäule als stationäre Phase (beide Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetrennt. Die Messungen erfolgten bei einer Säulentemperatur von 60 °C mit 5 mM H₂SO₄ bei einem konstanten Flussrate von 0,6 mL/min.

2.14.2 Bestimmung des Gesamtzellproteingehalts mit dem Bradford Assay

Um die Konzentration der im *C. kluyveri* ZFE (vgl. 2.8.1) enthaltenen Proteine bestimmen zu können, wurde dieser mit dem Bradford Assay gemessen. Hierfür wurde das PierceTM Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fischer, Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde das Standard-Protokoll für Mikrotiterplatten mit 100-1.500 µg/mL Albumin (BSA) als Standard zugrunde gelegt. Um zu verhindern, dass das im ZFE enthaltene Glycerin mit dem Coomassie im Bradford-Reagenz interferiert, wurde wie empfohlen der ZFE vor der Messung 1:5 mit MQ H₂O auf 10% (v/v) Glycerin verdünnt. Die Auswertung des Assays erfolgte bei 595 nm im Plattenphotometer (SPECTROstar^{Nano}, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

2.15 Software, Datenbanken und Onlineprogramme

2.15.1 Plasmidkonstruktion

Für die *in silico*-Konstruktion von Plasmiden nach 2.7 wurde routinemäßig mit der Bioinformatik-Software-Arbeitssuite „Clone Manager 9“ (Sci Ed Software, Westminster, Colorado, USA) gearbeitet. Mit Hilfe dieser Software wurden Primer zum Klonieren oder Sequenzieren designt, PCR-Produkte generiert, sowie Plasmidkarten erstellt. Ferner wurden mit dem Clone Manager passende Enzym-Kombinationen für Plasmidkontrollverdau-Assays nach 2.6.9 ausgewählt.

Zur Bestimmung der Annealing-Temperaturen für PCR-Primer wurde, soweit nicht anders vom Hersteller der Polymerase vorgegeben, die Online T_M-Kalkulatoren von Thermo Scientific (Waltham,

USA) oder New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA) auf den jeweiligen Hersteller-Webseiten herangezogen.

Ferner wurde das molekulare Verhältnis von Vektor zu Insert für das Gibson Assembly nach 2.7.1 mit dem „Ligation Calculator“ der Uni Düsseldorf (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) berechnet.

2.15.2 Analyse von Genen und Genomen

Informationen zu Enzymen und Stoffwechselwegen von Genomen (2.1.3) wurden über die Datenbank „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>) gewonnen. Eine Vorhersage bakterieller Promotor-Regionen stromaufwärts des ORF Start-Codons wurde online mit Hilfe des sigma70 Promotor Erkennungsprogramms „BPROM“ von Softberry (Mount Kisco, NY, USA) getroffen. Des Weiteren wurde zur Vorhersage potenzieller Restriktions-/Modifikationssysteme im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T die Datenbank „The Restriktion Enzyme Database“ (= REBASE) durchsucht (Roberts *et al.* 2010). Potenzielle Funktionen und Strukturen von Proteinen konnten ferner in der Online-Datenbank „UniProt“ (<https://www.uniprot.org/>) eingesehen werden.

Für die computerbasierte Vorhersage von Riboswitches in Genomsequenzen wurde zum einen auf die Online-Datenbank RiboD zurückgegriffen (Mukherjee *et al.* 2019). Zum anderen wurden einzelne Bereiche zusätzlich mit den Onlineprogrammen „Riboswitch finder“ (Bengert *et al.* 2004) und „Riboswitch scanner“ (Mukherjee *et al.* 2016) untersucht.

Eine Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen erfolgte auf Basis der RNA-Sequenzen über den RNAfold web server (Vienna RNA Web Services, Wien, Österreich) und dem Algorithmus ‚minimum free energy (MFE) and partition function‘ und der Option ‚avoid isolated base pairs‘.

2.15.3 Diagramme und Abbildungen

Die in dieser Arbeit gezeigten Diagramme wurden mit der Statistik-Software „GraphPad Prism“ (Version 7.0; GraphPad Software, Boston, MA, USA) erstellt. Die Standardabweichung von Mittelwerten wurden ferner auch in Excel (Microsoft Office 2021) mit der Funktion „STABW.S“ nach der „n-1“-Methode berechnet.

Für die Erstellung von Abbildungen wurde das Open-Source Vektorgrafik-Programm „Inkscape“ (Version 1.2.2; Free Software Foundation, Boston, MA, USA) verwendet. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus 2.10.5 wurden hierzu vorab mit der Software ZEN 3.0 (blue edition) bearbeitet (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland).

2.15.4 Analyse von Transkriptomdaten

Die Prozessierung der bioinformatischen Daten, welche über NGS nach 2.13.2 generiert worden sind, wurde von Dr. Armin Ehrenreich am Lehrstuhl für Mikrobiologie (TUM School of Life Science, Freising, Deutschland) vorgenommen.

Dazu erfolgte zunächst eine qualitätsbasierte Filterung, sowie eine Entfernung der verbleibenden Adaptorsequenzen mit der Software „Trimmomatic“, Version 0.39 (Bolger *et al.* 2014) über die Basenqualitätskodierungseinstellung ‚phred-33‘. Die weitere Prozessierung der Sequenzen wurde im Anschluss über die Software „Salmon“, Version 1.10.2 (Patro *et al.* 2017) durchgeführt.

Für den Abgleich (engl. ‚mapping‘) wurden die Referenzgenomsequenzen von *C. kluyveri* DSM 555^T (Ref. Genom NZ_CP000673.1 und Ref. Plasmid pCKL555A NZ_CP000674.1) herangezogen. Als Backbone wurde eine Köder-Datei (engl. ‚decoy‘) mit einer k-mer-Größe von 11 erzeugt. Dieser Köder enthielt alle annotierten Transkripte der Referenzsequenzen mit Ausnahme der rRNA-Gene und wurde zur Generierung eines Köder-bewussten (engl. ‚decoy-aware‘) Transkriptoms verwendet.

Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls über die „Salmon“-Software unter Berücksichtigung des Köder-bewussten Transkriptoms (engl. ‚decoy-aware mapping‘) und über die Funktion „selektives Alignment“ (engl. ‚selective-alignment mode‘). Die *quant.sf*-Dateien wurden in diesem Zusammenhang mit den Kommandozeilenparameter-Optionen (engl. ‚flags‘) „-mimicBT2“, „-disableChainingHeuristic“ und „-recoverOrphans“ generiert, mit einer Sequenz- und Positions-Bias-Korrektur, sowie Bootstrap 10.000. Für die Optionen „-fldMean“ und „-fldSD“ wurden Werte von 300 bzw. 35 verwendet. Zur weiteren Auswertung wurden die *quant.sf*-Dateien in Excel importiert.

Die Berechnung des Expressionsunterschieds zwischen der CO- und Kontrollfermentation von *C. kluyveri* nach 2.4.9 erfolgte in Excel über die Bildung des Quotienten aus CO- (= Zähler) und Kontroll- (= Nenner) Read-Count-Wert pro Gen und Zeitpunkt. Für den Fall „Zähler < Nenner“ wurde zusätzlich der Kehrwert des Quotienten gebildet. Als Schwellwert für einen nennenswerten Expressionsunterschied zwischen CO- und Kontrollfermentation wurde der Faktor 2,0 festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung von neuen FISH-Sonden für *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans*

Bei der Etablierung neuer Co-Kulturen ist es von großer Bedeutung, das stabile Wachstum beider Co-Kulturpartner während des Prozesses überwachen zu können. Hierzu muss eine eindeutige Unterscheidung zwischen den beiden Organismen ermöglicht werden, insbesondere wenn es sich bei den Co-Kulturpartnern um zwei Bakterien derselben Gattung handelt, welche zudem eine sehr ähnliche Zellmorphologie besitzen. Im Bereich der Fluoreszenzmarkierung von Bakterien könnte hierfür, wie bereits in Kapitel 1.2.3 näher beleuchtet, die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) besonders gut geeignet sein. Daher sollten für das Co-Kultur Monitoring zwei artspezifische Oligonukleotidsonden für die eindeutige Identifizierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* entwickelt werden. Die in Kapitel 3.1 – 3.3 gezeigten Daten wurden so auch in Schneider *et al.* (2021) veröffentlicht.

3.1.1 Vorversuche mit der für *C. kluyveri* publizierten 16S rRNA FISH-Sonde KCLZ

In der Literatur wurde kürzlich von Hu *et al.* (2018) eine mögliche Sequenz für eine *C. kluyveri* 16S rRNA-Oligonukleotidsonde (= KCLZ) vorgeschlagen. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Oligonukleotidsequenz von KCLZ auch für die Unterscheidung zwischen den zukünftigen Co-Kulturpartnern *C. kluyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T geeignet ist. Die 16S rRNA Oligonukleotidsonde KCLZ liegt auf der *E. coli* Position 551. Auf einer Gesamtlänge von 35 nt besitzt KCLZ keine Fehlpaarung mit *C. kluyveri* DSM 555^T, sowie 4 Fehlpaarungen mit *C. carboxidivorans* DSM 15243^T (nicht gezeigt).

Dennoch konnte für die Oligonukleotidsonde KCLZ in einem nachfolgenden Hybridisierungsexperiment (2.10.4) unter der von Hu *et al.* (2018) vorgeschlagenen Formamid-Konzentration von 30 % (v/v) sowohl für Zellen von *C. kluyveri*, als auch von *C. carboxidivorans* ähnlich starke Fluoreszenzsignale detektiert werden. Durch eine schrittweise Erhöhung der Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer auf 50 % (v/v) konnte zwar die Bindung von KCLZ an *C. carboxidivorans* vollständig verhindert werden. Gleichzeitig war bei dieser Konzentration das Signal von *C. kluyveri* Zellen jedoch so stark abgeschwächt, dass es unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop kaum noch vom unspezifischen Hintergrundsignal zu unterscheiden war (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

3.1.2 Design von 23S rRNA Oligonukleotidsonden für *C. kluuyveri* und *C. carboxidivorans*

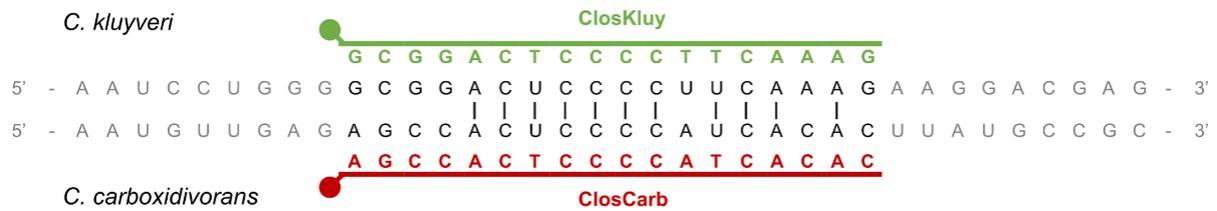


Abbildung 3.1. Veranschaulichung von den Sequenzunterschieden der 23S rRNA Oligonukleotidsonden ClosKluy für *C. kluuyveri* (grün) und ClosCarb für *C. carboxidivorans* (rot).

Dargestellt ist die identische Bindestelle beider Sonden (*E. coli* Position 1516). Für das Design der beiden diskriminierenden Sonden wurden die 7 Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Organismen in diesem 18 nt langen Sequenzabschnitt genutzt. Übereinstimmende Basenpaarungen sind im Schema durch senkrechte Striche gekennzeichnet.

Da in den Vorversuchen unter 3.1.1 gezeigt wurde, dass die 16S rRNA Oligonukleotidsonde KCLZ in unserem Versuchskontext nicht geeignet ist, um zwischen *C. kluuyveri* und *C. carboxidivorans* zu unterscheiden, sollten zwei neue spezifische Sonden auf Basis der 23S rRNA-Gensequenz entwickelt werden. Die bioinformatische Arbeit mit dem ARB-Softwarepaket (3.1.2) und die *in silico* Probe-Match Analysen (3.1.3) zu den Oligonukleotidsonden wurden von Natuschka M. Lee (Umeå Universität, Department of Ecology and Environmental Science, Umeå, Schweden) durchgeführt. Im Anschluss wurde die Bindungsspezifität der Oligonukleotidsonden im Rahmen dieser Arbeit untersucht (Kapitel 3.2 und 3.3).

Für die FISH-Gensondensequenzen wurde mit dem ARB-Softwarepaket auf Basis von insgesamt 95.286 Gensequenzen für die große ribosomale Untereinheit (large subunit = LSU; 23S rRNA) von *Firmicutes (Bacillota)* und *Clostridiales* aus der REFNR SILVA Datenbank potenzielle Bindestellen für neue FISH-Sonden identifiziert. Der in diesem Zusammenhang nach 2.10.2 in ARB erstellte phylogenetische Baum ist im nachfolgenden Kapitel in Abbildung 3.2 dargestellt.

Eine Analyse mit der ARB-Software "Probe Match" ergab auf Basis der LSU-Sequenzen 7 spezifische Gensondensequenzen für *C. kluuyveri* DSM 555^T, sowie 13 für *C. carboxidivorans* DSM 15243^T. Die Sequenzähnlichkeit der LSU betrug hierbei 99 % für jede Art bzw. 90-99 % für beide Arten (nicht gezeigt). Schlussendlich wurde die *E. coli*-Position 1516 als Zielstelle für die beiden spezifischen Sonden ausgewählt. An dieser Position sind zwischen *C. kluuyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T auf einer Länge von 18 nt insgesamt 7 Basen-Fehlpaarungen vorhanden (Abbildung 3.1). Diese Basen-Fehlpaarungen konnten zur Entwicklung von zwei diskriminierenden 23S rRNA FISH-Sonden herangezogen werden. Es wurden folgende potenzielle Gensondensequenzen abgeleitet: (1) 5'-GCGGACTCCCCTTCAAAG für die *C. kluuyveri* Sonde ClosKluy und (2) 5'-AGCCACTCCCCATCACAC für die *C. carboxidivorans* Sonde ClosCarb.

Ergebnisse

3.1.3 *In silico* Probe-Match Analysen für ClosKluy und ClosCarb

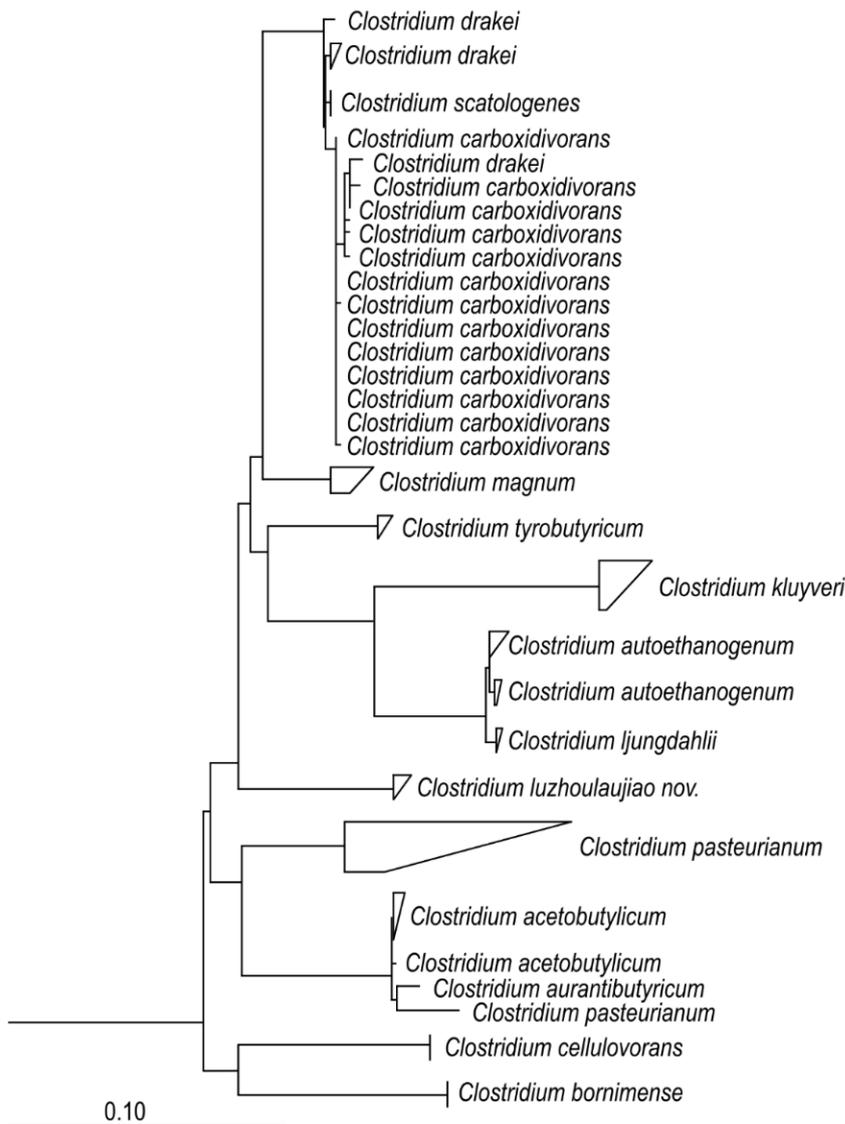


Abbildung 3.2. Ausschnitt des phylogenetischen Orientierungs-Baums zum Design von neuen FISH-Gensonden für *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans*.

Die Berechnung erfolgte in ARB über die Methoden „neighbor joining“, „parsimony“ und „RaxML“ auf Grundlage der 23S rRNA REFNR SILVA-Datenbank Version 138.1 mit 95.286 Gensequenzen für alle Clostridien und eine Auswahl an Mitgliedern von Firmicutes (neue Bezeichnung *Bacillota*) und Outgroup-Organismen (Stand: 07/2020). Die beiden neu entwickelten Sonden (ClosKluy und ClosCarb) zielen auf drei Gattungen innerhalb der Klade Clostridium III ab. Die Gen-Sonde ClosKluy ist hochspezifisch und bindet nur an *C. kluyveri* (100% Übereinstimmung mit *C. kluyveri* und 0% Übereinstimmung mit allen anderen Organismen). Die Gen-Sonde ClosCarb ist relativ spezifisch und zielt *C. carboxidivorans* möglicherweise auch auf *C. drakei* und *C. scatologenes* ab. Abbildung erstellt in ARB von Natuschka M. Lee, veröffentlicht in Schneider *et al.* 2021.

Ergebnisse

Tabelle 3.1. Ergebnis der online Probe-Match Analyse für die *C. carboxidivorans* Gensonde ClosCarb auf SILVA TestProbe 3.0 gegen die SILVA LSU r138.1 REFNR-Sammlung.

Übereinstimmende Positionen sind durch „=“ gekennzeichnet. Bei Fehlpaarungen ist der Buchstabe der nicht übereinstimmenden Base angegeben. Daten von Natuschka M. Lee, veröffentlicht in Schneider *et al.* 2021.

Organismus	Sequenz-Übereinstimmung mit ClosCarb	Fehlpaarungen
	5'-AGCCACTCCCCATCACAC	
<i>C. carboxidivorans</i>	GAG- ===== -UUA	0
<i>C. drakei</i> (Version 1)	GAG- ===== -UUA	0
<i>C. drakei</i> (Version 2)	GAG- A===== -UUA	1
<i>C. scatologenes</i>	GAG- ====U===== -UUA	1
<i>C. kluyveri</i>	GGG- GCGG=====U===A=G -AAG	7

Zunächst sollten die potenziellen neuen Gensondensequenzen für *C. kluyveri* DSM 555^T (ClosKluy) und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T (ClosCarb) auf ihre Spezifität hin untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden *in silico* Probe-Match Analysen mit den Gensondensequenzen von Natuschka M. Lee durchgeführt. Hierbei zeigte der in Abbildung 3.2 dargestellte Ausschnitt des in ARB zum Sondendesign erstellten phylogenetischen Baums, dass die beiden neu abgeleiteten FISH-Gensonden ClosKluy und ClosCarb (Tabelle 2.27) lediglich auf drei Gattungen innerhalb der Clade Clostridium III abzielen. Alle anderen Organismen innerhalb der Clostridien-Gruppe oder in anderen Domänen können hingegen von diesen beiden Gensonden nicht erfasst werden.

Daneben wurden die beiden potenziellen Gensondensequenzen zusätzlich mit dem Onlinesoftware „SILVA TestProbe 3.0“ abgeglichen. Hierbei konnte zum einen gezeigt werden, dass die ClosKluy-Gensonde für alle Clostridien mindestens zwei Fehlpaarungen mit allen derzeit verfügbaren 23S rRNA-Gensequenzen aufweist. Dasselbe wurde für ClosKluy-Gensequenz mit allen bisher sequenzierten Organismen der drei Domänen beobachtet. Zum anderen wies die *C. carboxidivorans* Gensonde ClosCarb, wie bereits in 3.1.2 erwähnt, 7 Basen-Fehlpaarungen zusammen mit der 23S rRNA-Sequenz von *C. kluyveri* auf. Allerdings zeigt die ClosCarb-Gensonde, wie in Tabelle 3.1 zu sehen, eine sehr hohe oder sogar vollständige Übereinstimmung mit den 23S rRNA-Sequenzen von *Clostridium scatologenes* bzw. *Clostridium drakei*. Dies ist in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse der 23S rRNA-Sequenzen, bei welcher die drei Arten *C. carboxidivorans*, *C. drakei* und *C. scatologenes* ebenfalls ein gemeinsames Cluster bilden (Abbildung 3.2).

3.2 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für die FISH Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb

Da die vorausgegangenen *in silico* Analysen der neuen 23S rRNA-Gensondensequenzen von Natuschka M. Lee bereits vielversprechend waren, sollten die diskriminierenden Eigenschaften von ClosKluy und ClosCarb im Rahmen dieser Arbeit auch über Hybridisierungsexperimente im Labor bestätigt werden. Dafür mussten zunächst optimale Hybridisierungsbedingungen für ClosKluy und ClosCarb definiert werden. Dazu wurden para-Formaldehyd-fixierten Reinkulturproben von *C. kluyveri* DSM 555^T bzw. *C. carboxidivorans* DSM 15243^T verwendet.

3.2.1 Bestimmung der Optimalen Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer

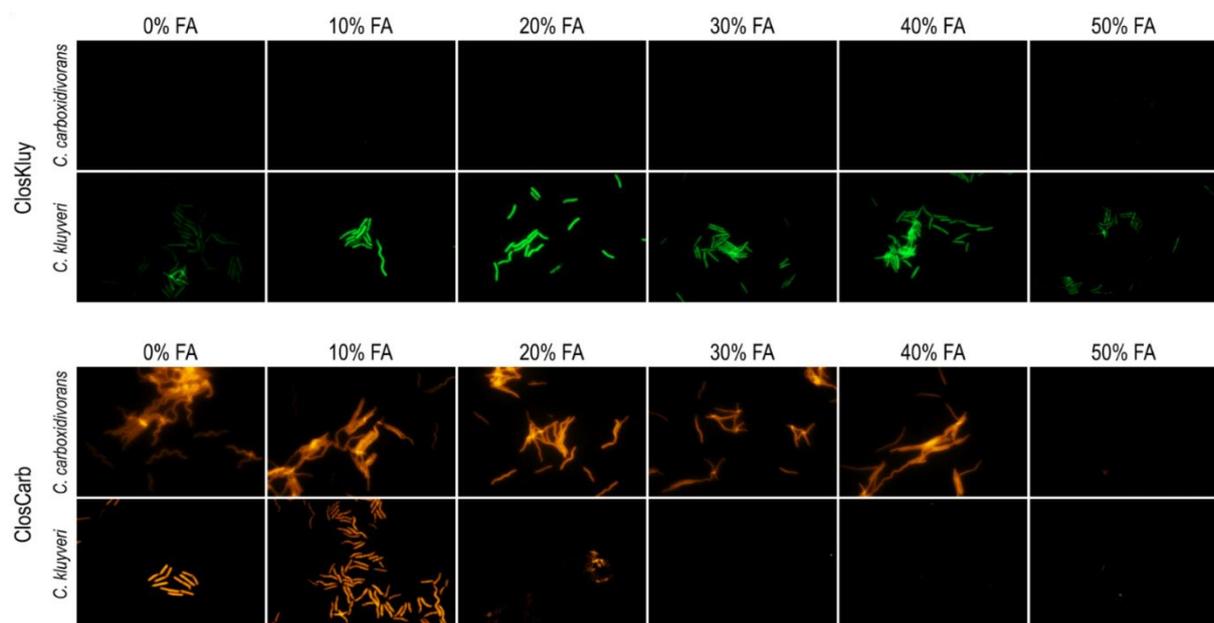


Abbildung 3.3. Schrittweise Formamid (FA)-Reihe für die mit AF488 markierten Sonden ClosKluy (grün) und die mit Cy3 markierten Sonden ClosCarb (orange).

Beide Sonden wurden jeweils mit para-Formaldehyd-fixierten Zellen von *C. kluyveri* DSM 555^T oder *C. carboxidivorans* DSM 15243^T unter Verwendung von 0-50% (v/v) FA hybridisiert. Spezifische Bindungssignale wurden für beide Sonden im Ansatz mit 30 % (v/v) FA detektiert. Belichtungszeit jeweils 500 ms. (Quelle: Schneider *et al.* 2021)

Eine spezifische Bindung von Oligonukleotidsonden an die 23S rRNA-Moleküle der Zielorganismen wird durch Formamid im Hybridisierungspuffer gewährleistet. Zur Bestimmung des Formamid-Optimums der Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb wurden daher die Konzentrationen 0-50 % (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer (Tabelle 2.28) getestet.

Ergebnisse

Insgesamt konnte eine gleichmäßig starke und spezifische Zellfärbung bei einer Konzentration von 30 % (v/v) Formamid im Hybridisierungspuffer erreicht werden. Dies galt sowohl für die ClosKluy-Gensonde mit den *C. kluyveri* Zielzellen als auch für ClosCarb gemeinsam mit Zellen von *C. carboxidivorans* (Abbildung 3.3). Eine niedrigere Konzentration Formamid von < 30 % (v/v) hatte eine Verstärkung unspezifischer Fluoreszenzsignale zur Folge, insbesondere beim Hybridisierungsansatz von *C. kluyveri* Zellen mit der für *C. carboxidivorans* designten Sonde ClosCarb (Abbildung 3.3). Mit höheren Formamid-Konzentrationen konnte hingegen ein drastischer Abfall der detektierbaren Signalintensitäten für beide Sonden bei der Hybridisierung mit ihrem jeweiligen Zielorganismus beobachtet werden. Gleichzeitig wurde der Fluoreszenzhintergrund bei Proben mit hohen Formamid-Konzentrationen verstärkt. Diese Effekte waren insbesondere bei 50 % (v/v) Formamid sichtbar (Abbildung 3.3).

3.2.2 Lysozym-Behandlung für Gram-positive Clostridien

Neben einer passend für die Sonden zu wählenden Formamid-Konzentration hängt der Erfolg von FISH-Experimenten zusätzlich auch von einer geeigneten Kombination aus Fixierungs- und Permeabilisierungs-Techniken für die jeweiligen Zielzellen ab (Amann *et al.* 2008). Um FISH-Fluoreszenzsignale bei Gram-positive Zellen zu erhöhen, können diese beispielsweise vorab mit Lysozym behandelt werden. Diese Permeabilisierungstechnik wurde daher auch für Zellen von *C. kluyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T getestet werden.

Hierbei variierten die erzielten Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente nicht nur zwischen PFA-fixierten und Ethanol-fixierten Proben, sondern auch zwischen den Organismen *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans*. In einer Versuchsreihe mit unterschiedlichen Lysozym-Konzentrationen wurden die hellsten Fluoreszenzsignale bei einer Behandlung mit 3,3 mg/mL Lysozym erzielt. Hierbei erfolgte jeweils der Verdau von PFA-fixierten Zellen für 30 min bei 37 °C. Ethanol-fixierte Zellproben wurden hingegen mit derselben Lysozym-Menge lediglich für 10 min auf Eis inkubiert. Insgesamt waren Zellen von *C. carboxidivorans* empfindlicher gegenüber der Lysozym-Vorbehandlung als die von *C. kluyveri*. Folglich führten alle stärkeren Lysozym-Behandlungen von *C. carboxidivorans* Zellen im Anschluss zu ungleichmäßigen und schwachen Fluoreszenzsignalen nach einer Hybridisierung mit der ClosCarb-Sonde (nicht gezeigt).

Ergebnisse

3.2.3 Bestätigung der Bindungsspezifität von ClosKluy und ClosCarb im Labor

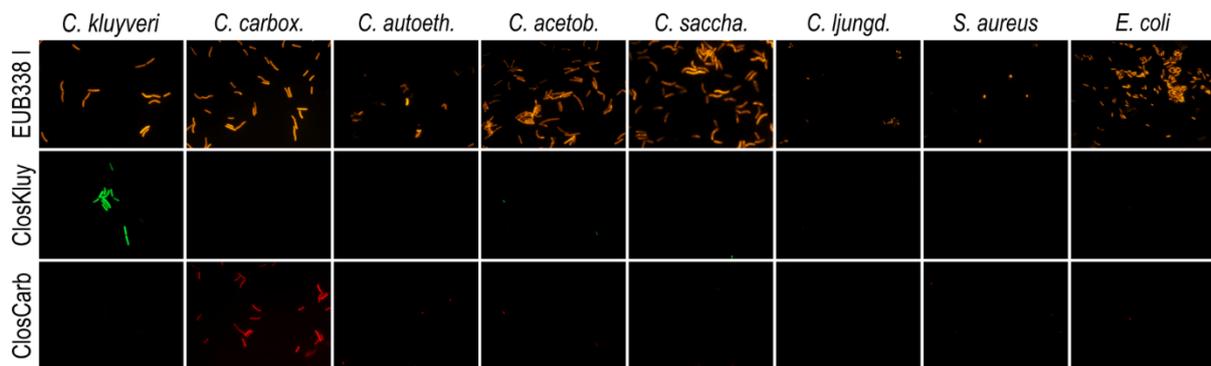


Abbildung 3.4. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung verschiedener, PFA-fixierter Referenz-Bakterienstämmen nach ihrer Hybridisierung mit den Oligonukleotidsonden EUB338 I, ClosKluy oder ClosCarb.

Dargestellt sind, von oben nach unten: (1) Positivkontrolle EUB338 I mit Cy3 (orange), (2) ClosKluy für *C. kluyveri*, markiert mit AF488 (grün) und (3) die Cy3,5-markierte, *C. carboxidivorans* Oligonukleotidsonde ClosCarb (rot). Belichtungszeit: jeweils 500 ms. (Modifiziert nach Schneider *et al.* 2021)

Um die spezifische Bindung der ClosKluy- und ClosCarb-Sonden an ihre Zielorganismen *C. kluyveri* bzw. *C. carboxidivorans* zu bestätigen, wurden beide Sonden mit verschiedenen Referenzstämmen (Tabelle 2.2) getestet. Hierfür wurde ein Hybridisierungsexperiment nach 2.10.4 unter der in 3.2.1 bestimmten, optimalen Formamid-Konzentration von 30 % (v/v) mit beiden Sonden durchgeführt. Die allgemeine Bakterien-Sonde EUB338 I nach Amann *et al.* (1990b) (Tabelle 2.27) diente hierbei als Positivkontrolle.

Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, hybridisierte die ClosKluy-Sonde nur mit Zellen von *C. kluyveri* DSM 555^T und die ClosCarb-Sonde nur mit Zellen von *C. carboxidivorans* DSM 15243^T. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen von *C. autoethanogenum* DSM 10061, *C. acetobutylicum* DSM 792^T, *C. saccharobutylicum* DSM 13864^T, *C. ljungdahlii* DSM 13528^T, *S. aureus* DSM 20232 und *E. coli* K12 keine spezifischen Signale, weder mit der ClosKluy noch mit der ClosCarb-Sonde. Alle acht getesteten Stämme zeigten hingegen ein spezifisches Fluoreszenzsignal, wenn diese mit der positiven Kontrollsonde EUB338 I hybridisiert wurden (Abbildung 3.4). Zudem konnte bei allen getesteten Stämmen, welche mit einer nicht-fluoreszierenden Sonde hybridisiert wurden, mit Ausnahme einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz keine weiteren Signale detektiert werden (nicht gezeigt).

Ergebnisse

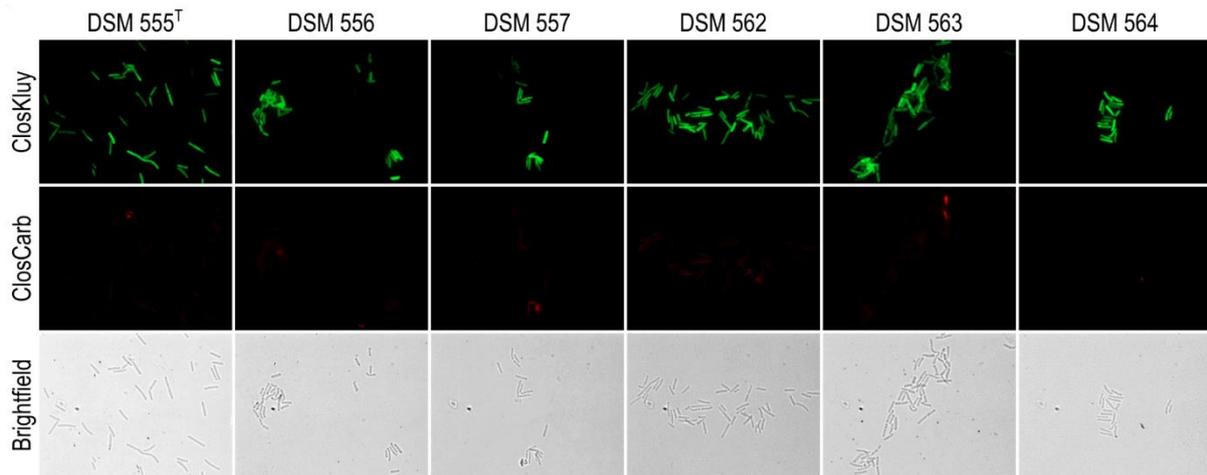


Abbildung 3.5. Gleichzeitige Hybridisierung von sechs verschiedenen, PFA-fixierten *C. kluyveri* Isolaten mit den Sonden ClosKluy und ClosCarb.

Die Zellen wurden nacheinander mit für den jeweils verwendeten Fluorophor geeigneten Filtersätzen im Fluoreszenzmikroskop abgelichtet. Gezeigt werden, von oben nach unten: (1) Der AF488-Kanal für die *C. kluyveri* Sonde ClosKluy (grün), (2) der Cy3.5-Kanal für die *C. carboxidivorans* Sonde ClosCarb (rot), sowie (3) das Hellfeld. Belichtungszeiten: 500 ms für AF488, 300 ms für Cy3.5 und 30 ms im Hellfeld. (Quelle: Schneider *et al.* 2021)

Zudem wurden neben dem *C. kluyveri* Typstamm DSM 555^T zusätzlich noch 5 weitere Isolate dieser Art ebenfalls mit der ClosKluy- oder der ClosCarb-Sonde hybridisiert. Ähnlich wie beim Typstamm DSM 555^T zeigten die *C. kluyveri*-Isolate DSM 556, DSM 557, DSM 562, DSM 563 und DSM 564 starke, gleichmäßig verteilte und spezifische Fluoreszenzsignale, wenn sie mit der ClosKluy-Sonde hybridisiert wurden (Abbildung 3.5). Andererseits wurden für die Zellen verschiedener *C. kluyveri*-Isolate nach Hybridisierung mit der *C. carboxidivorans*-Sonde ClosCarb nur sehr schwache und unspezifische Hintergrundsignale festgestellt (Abbildung 3.5).

Zum Schluss wurde außerdem eine Co-Kulturprobe nachgeahmt, indem die Reinkulturen von *C. kluyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T im Verhältnis 1:1 auf Objektträgern miteinander gemischt wurden. Für dieses Zellgemisch erfolgte die Hybridisierung gleichzeitig mit den beiden Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb. Im Anschluss zeigten hierbei, wie in Abbildung 3.6 beispielhaft gezeigt, alle Zellen des künstlichen Gemischs ein deutlich erkennbares Fluoreszenzsignal. Beide Signale ließen sich entweder auf eine Bindung der AF488-markierten *C. kluyveri*-Sonde ClosKluy oder der mit Cy3.5-markierte *C. carboxidivorans*-Sonde ClosCarb zurückführen. Somit konnten alle Zellen unter dem Mikroskop eindeutig identifiziert werden.

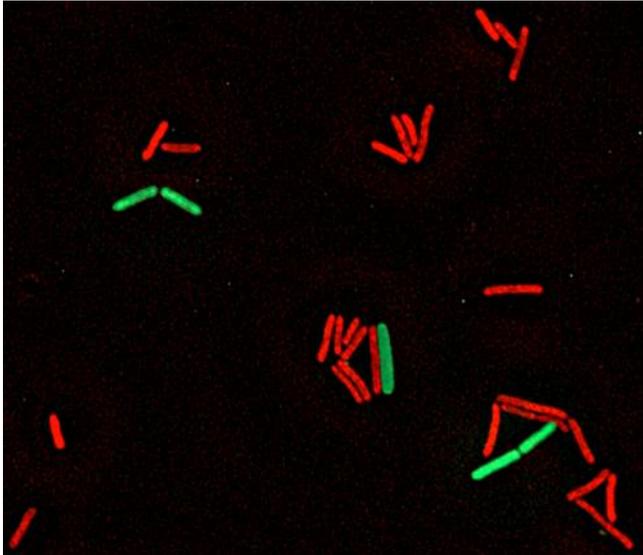


Abbildung 3.6. Künstliches Gemisch aus Zellen von *C. carboxidivorans* DSM 15243^T und *C. kluyveri* DSM 555^T nach gleichzeitiger Hybridisierung mit ClosKluy und ClosCarb.

Die Zellen wurden jeweils im Verhältnis 1:1 auf Grundlage von OD₆₀₀-Messungen miteinander vermengt. ClosKluy markiert mit AF488 (grün) und ClosCarb markiert mit Cy3.5 (rot). Belichtungszeiten: jeweils 500 ms für AF488 und Cy3.5. (Quelle: Schneider *et al.* 2021)

3.3 Anwendung der FISH-Sonden für *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* im Co-Kultur Kontext

Wie bereits zu Beginn erläutert, ist das primäre Ziel der im Rahmen dieser Arbeit designten 23S rRNA Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb eine individuelle Fluoreszenzmarkierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* im Zusammenhang mit verschiedenen Co-Kulturen. Nach den vielversprechenden Spezifitätsanalysen aus Kapitel 3.2 sollte nun im letzten Schritt eine Hybridisierung von realen Co-Kultur Proben mit den oben genannten FISH-Oligonukleotidsonden erfolgen. Hierzu wurden sowohl eine heterotrophe 50 mL, als auch eine autotrophe 1 L Co-Kultur aus *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* über FISH mit ClosKluy und ClosCarb untersucht.

3.3.1 Hybridisierungsexperimente mit einer heterotrophen Co-Kultur

Eine erste Co-Kultivierung von *C. kluyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T wurde in 50 mL modifiziertem Hurst Medium und mit 5,0 g/L Glukose als einziger Kohlenstoffquelle bei 37 °C als Triplikate nach 2.4.6 durchgeführt. In dieser heterotrophen Co-Kultur sollte *C. carboxidivorans* aus Glukose Ethanol und Acetat als Kohlenstoffquellen für *C. kluyveri* produzieren. Diese Co-Kultur wurde mit Monokulturen von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* im gleichen Medium verglichen.

Ergebnisse

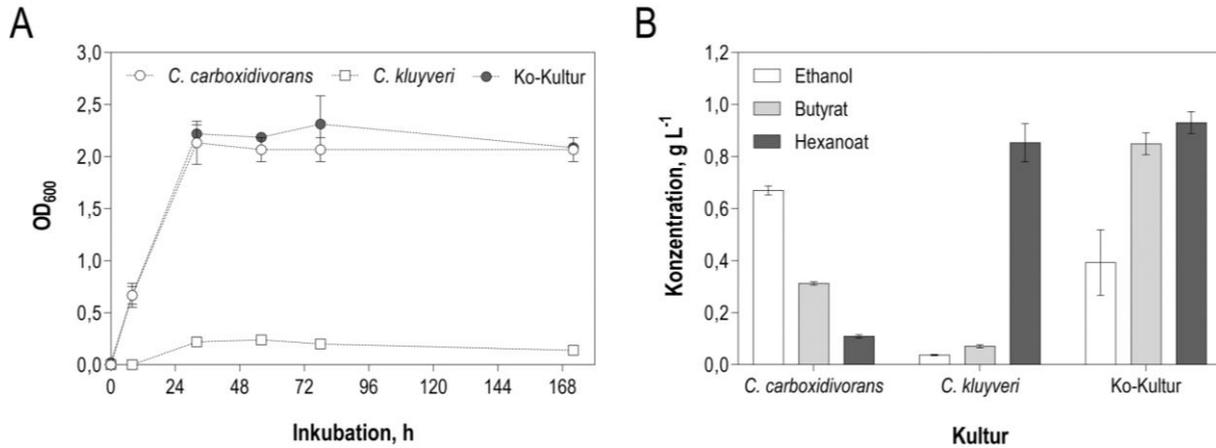


Abbildung 3.7. Batch-Glukose Mono- und Co-Kulturen von *C. kluuyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T.

Alle Kulturen wurden in 50 mL modifiziertem Hurst Medium + 0,5 % (w/v) Glukose für 172 h bei 37°C bebrütet. Die Fehlerbalken geben jeweils die Abweichung vom Mittelwert über drei unabhängige Versuche an. (A) Wachstumskurven von *C. carboxidivorans* (leere Kreise), *C. kluuyveri* (leere Quadrate), sowie der heterotrophen Glukose Co-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluuyveri* (graue Kreise). (B) Über HPLC gemessene Butyrat-, Hexanoat- und Ethanol Endkonzentrationen in g/L nach 172 h in den beiden Mono-Kulturen und der heterotrophen Glukose Co-Kultur von *C. kluuyveri* und *C. carboxidivorans*. (Modifiziert nach Schneider *et al.* 2021)

Hierbei war das Wachstum der heterotrophen Co-Kultur nahezu vergleichbar mit dem der *C. carboxidivorans*-Monokultur. Interessanterweise wurde auch bei der *C. kluuyveri*-Monokultur ein leichtes Wachstum mit einer maximalen OD₆₀₀ von 0,24 nach 56 h bei 37 °C beobachtet (Abbildung 3.7 A). Im Mittel betrug die gemessene Butyrat-Konzentration in der Co-Kultur zum Endzeitpunkt nach 172 h $0,85 \pm 0,04$ g/L. Diese Menge war höher als die ermittelten Butyrat-Konzentrationen der Monokulturen mit Mittelwerten von $0,07 \pm 0,01$ g/L für *C. kluuyveri* und $0,31 \pm 0,01$ g/L für *C. carboxidivorans* (Abbildung 3.7 B). Darüber hinaus wurde in den Co-Kulturproben ein Mittelwert von $0,39 \pm 0,13$ g/L Ethanol quantifiziert. Dieser Wert war niedriger als bei der *C. carboxidivorans*-Monokultur mit $0,67 \pm 0,02$ g/L Ethanol (Abbildung 3.7 B). Für Hexanoat waren die final gemessenen Konzentrationen in der Co-Kultur mit $0,93 \pm 0,04$ g/L fast genauso hoch wie in der *C. kluuyveri*-Monokultur mit $0,85 \pm 0,07$ g/L (Abbildung 3.7 B).

Schließlich wurde nach 20 h eine Probe aus der Glukose-Co-Kultur entnommen. Diese wurde zum Nachweis von *C. kluuyveri* und *C. carboxidivorans* mit den 23S rRNA-Gensonden ClosKluy und ClosCarb gleichzeitig nach 2.10.4 hybridisiert. Bei der nachfolgenden mikroskopischen Auswertung konnten für alle Zellen helle und eindeutige Fluoreszenzsignale detektiert werden, die entweder von der AF488-markierten ClosKluy-Sonde für *C. kluuyveri* oder von der Cy3,5-markierten ClosCarb-Sonde für *C. carboxidivorans* stammten (Abbildung 3.8).

Ergebnisse

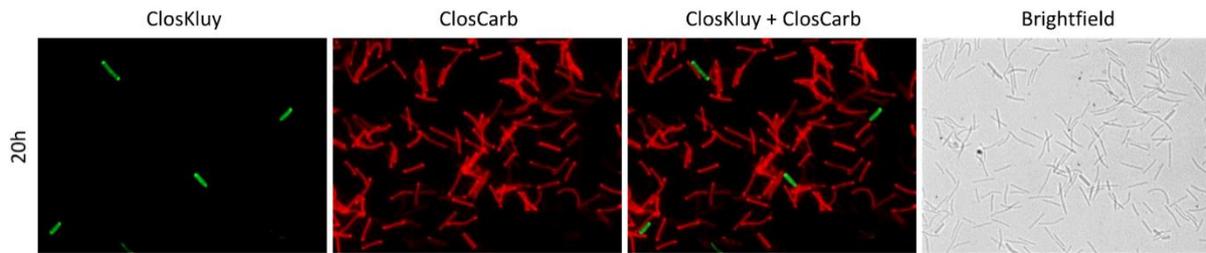


Abbildung 3.8. Proben aus einer heterotrophen Glukose-Batch Co-Kultur mit *C. carboxidivorans* DSM 15243^T und *C. kluyveri* DSM 555^T nach einer Inkubationszeit von 20 h bei 37 °C.

Die Zellen wurden gleichzeitig sowohl mit der ClosKluy- als auch der ClosCarb-Sonde hybridisiert. Zu sehen sind, von links nach rechts: Der AF488 Kanal für ClosKluy (grün), der Cy3.5 Kanal für ClosCarb (rot), eine Überlagerung des AF488 und Cy3.5-Kanals, sowie das Hellfeld. Belichtungszeiten: 500 ms für AF488 und Cy3.5, sowie 30 ms für das Hellfeld. (Quelle: Schneider *et al.* 2021)

3.3.2 Hybridisierungsexperimente mit Proben einer autotrophen Co-Kultur

Final sollten die beiden 23S rRNA-basierten Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb auch auf ihre Anwendbarkeit für eine Markierung von Zellen in Rührkessel-Bioreaktor Proben getestet werden. Dazu wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM School of Engineering and Design, Garching, Deutschland) unter der Leitung von Miriam Bäumler ein autotropher Co-Kultivierungsversuch in 1 L modifiziertem Hurst Medium unter kontinuierlicher Begasung (80 % CO und 20 % CO₂) mit *C. kluyveri* DSM 555^T und *C. carboxidivorans* DSM 15243^T wie in 2.4.8 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 3.9 zeigt zwei zu unterschiedlichen Zeiten aus dem Rührkessel-Bioreaktor entnommene und danach gleichzeitig mit den Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb hybridisierte Proben. Alle Zellen zeigten hierbei ein eindeutiges, helles Fluoreszenzsignal, wahlweise durch die Bindung der AF488-markierten ClosKluy-Sonde für *C. kluyveri* oder der Cy3,5-markierten ClosCarb-Sonde für *C. carboxidivorans*. Dies stimmt mit den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Hybridisierung der Glukose-Co-Kulturproben überein (Abbildung 3.8).

Ergebnisse

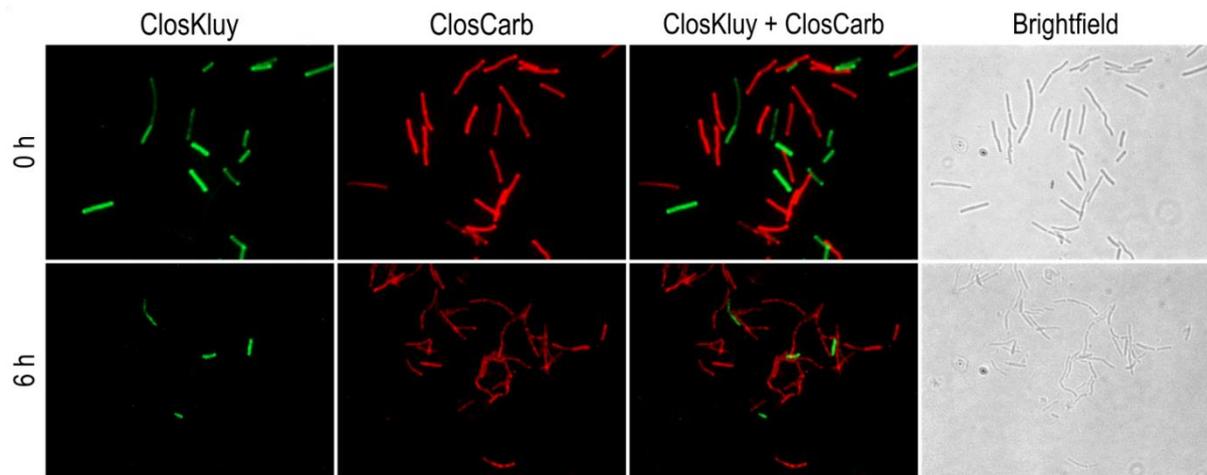


Abbildung 3.9. FISH-markierte Proben aus einem Gasfermentationsprozess mit *C. carboxidivorans* DSM 15243^T und *C. kluyveri* DSM 555^T in einem vollständig kontrollierten Rührkessel-Bioreaktor mit kontinuierlicher Gaszufuhr.

Die Proben wurden direkt nach der Inokulation (0 h, obere Reihe), sowie nach 6 h (untere Reihe) aus dem Batchprozesses entnommen und im Anschluss gleichzeitig mit der ClosKluy- und ClosCarb-Gen-Sonde hybridisiert. Von links nach rechts sind dargestellt: Der AF488 Kanal für ClosKluy (grün), der Cy3.5 Kanal für ClosCarb (rot), eine Überlagerung des AF488 und Cy3.5-Kanals, sowie das Hellfeld. Belichtungszeiten: 500 ms für AF488, 300 ms für Cy3.5 und 30 ms für das Hellfeld. (Quelle: Schneider *et al.* 2021)

3.4 Etablierung eines festen Mediums für die genetische Arbeit mit *C. kluyveri*

Ein wichtiger Bestandteil genetischer Arbeit ist es, transformierte Zellen gewinnen und vereinzeln zu können. Im Idealfall erfolgen diese Arbeitsschritte auf der Oberfläche von festen Medien. Wie in Kapitel 1.3.1 näher erläutert, konnten zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur neben dem von der DSMZ für *C. kluyveri* empfohlenem Medium DSM-52 lediglich weitere Rezepte für flüssige Medien gefunden werden. Daher sind im Folgenden die Versuchsergebnisse dargestellt, auf deren Basis später das feste Medium für *C. kluyveri* abgeleitet wurde.

3.4.1 Identifizierung eines geeigneten Puffersystems für das *C. kluyveri* Festmedium

Zunächst wurde für das *C. kluyveri* Festmedium nach einem geeigneten Puffersystem gesucht. Im flüssigen DSMZ-52 Medium (Tabelle 2.15) wird ein Bicarbonat-Puffersystem zur Stabilisierung des pH-Wertes eingesetzt. Bicarbonat ist jedoch hitzelabil, wodurch eine Verwendung dieses Puffers in einem festen Medium deutlich erschwert wird. Daher sollte im festen *C. kluyveri* Medium der pH-Wert zusätzlich durch einen Zwitterionenpuffer nach Good *et al.* (1966) stabilisiert werden.

Ergebnisse

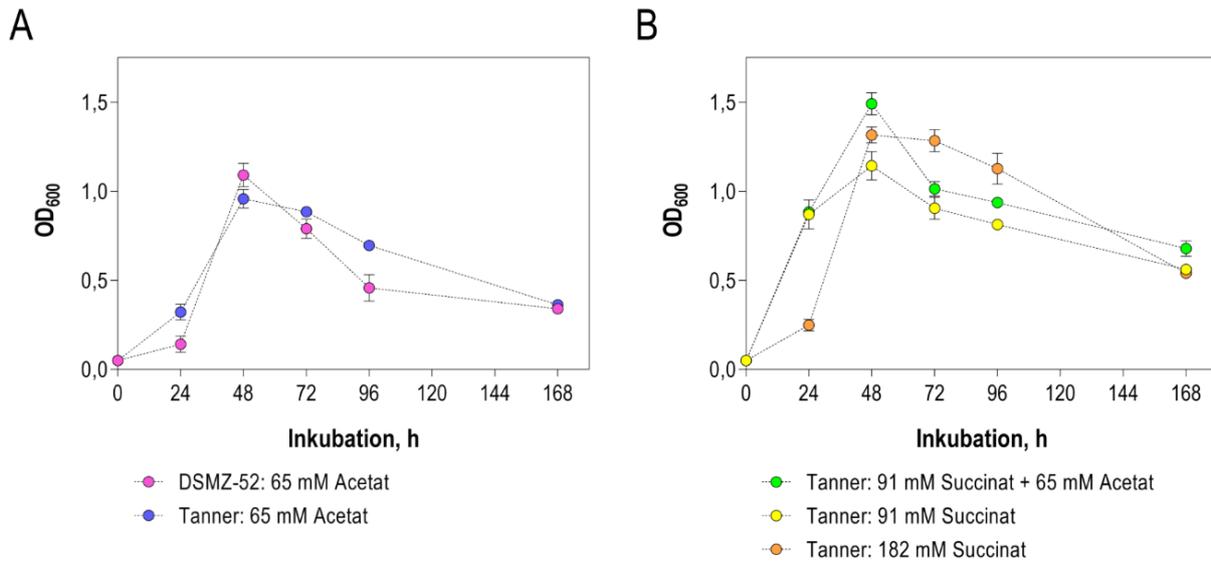


Abbildung 3.10. Wachstum von *C. kluyveri* in 50 mL Serumfläschchen mit verschiedenen Puffersystemen oder Substraten. Das Wachstum wurde jeweils über 168 h bei 37 °C über OD_{600} -Messungen überwacht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und berechneten Standardabweichungen von drei unabhängigen Kulturen. (A) Vergleich des Bicarbonat-gepufferten DSMZ-52 Mediums (22 mM; pink) mit dem MOPS-gepuffertem Tanner Medium (96 mM; blau) mit jeweils 250 mM Ethanol und 65 mM Acetat als Substrat. (B) Test von verschiedenen organischen Säuren im Tanner Medium mit 96 mM MOPS und 250 mM Ethanol. Gezeigt ist der Vergleich von 182 mM Succinat (orange), 91 mM Succinat (gelb), sowie 91 mM Succinat und 65 mM Acetat.

Aufgrund ihrer pH-Pufferbereiche wurden 2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure (= MES; pH 5,2 - 7,1) und 3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure (= MOPS; pH 6,5 – 7,9) in die engere Auswahl genommen. Zum Vergleich der unterschiedlichen Puffersysteme wurden Wachstumskurven mit *C. kluyveri* in 5 mL oder 50 mL Medium in biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Zwitterionepuffer wurden hierzu in das modifizierte Tanner Medium (Tabelle 2.16) eingesetzt und mit dem Bicarbonat-gepufferten DSMZ-52 Medium (Tabelle 2.15) verglichen. Im 50 mL Maßstab zeigte sich beim Wachstum von *C. kluyveri* mit 250 mM Ethanol und 65 mM Acetat im Laufe der ersten 72 h kaum Unterschiede zwischen dem Tanner Medium mit 96 mM MOPS und dem DSMZ-52 Medium mit 22 mM Bicarbonat (Abbildung 3.10 A). Sowohl beim Bicarbonat- als auch beim MOPS-Puffer erreichte *C. kluyveri* die maximale OD_{600} nach 48 h mit $1,09 \pm 0,05$ bzw. $0,96 \pm 0,04$. Allerdings zeigte sich im DSMZ-52 Medium mit Bicarbonatpuffer eine frühere Lyse der Zellen unter dem Mikroskop als beim Tanner Medium mit MOPS (nicht gezeigt).

In einem Wachstumsversuch mit *C. kluyveri* in 5 mL Tanner Medium mit 250 mM Ethanol, 65 mM Acetat und 91 mM Succinat als Substrat, sowie 15 oder 20 mg/L MOPS bzw. MES zeigten sich keine großen Unterschiede in den erreichten maximalen OD_{600} -Werten mit $1,35 \pm 0,05$ (nicht gezeigt). Daher wurde für die folgenden Experimente in 3.4.2 das Tanner Medium mit 20 g/L MOPS (= 96 mM) verwendet.

3.4.2 Wachstum von *C. kluyveri* mit Acetat, Succinat und NaHCO₃

Nachdem in dem mit 96 mM MOPS gepuffertem Tanner Medium bei identischen Substratkonzentrationen bereits ein vergleichbares Wachstum im DSMZ-52 Medium mit 22 mM NaHCO₃ erreicht werden konnte (vgl. 3.4.1), sollte die maximale OD₆₀₀ von *C. kluyveri* im Tanner Medium noch weiter erhöht werden. Durch eine optimale Substratzusammensetzung soll später im festen Medium eine hohe Biomasseproduktion von *C. kluyveri* für das Ausbilden von Einzelkolonien sichergestellt werden. In diesem Zusammenhang wurden neben Ethanol die organischen Säuren Acetat und Succinat, sowie NaHCO₃ als C-Quelle für *C. kluyveri* untersucht, da diese bereits charakterisiert wurden (vgl. Kapitel 1.3.1). Auch hierzu wurden Wachstumsversuche mit *C. kluyveri* in 5 mL oder 50 mL Flüssigmedium als biologischen Triplikaten durchgeführt.

Um die Auswirkung der organischen Säuren auf das Wachstum von *C. kluyveri* zu testen, wurden zu 50 mL Tanner Medium mit 96 mM MOPS und 250 mM Ethanol unterschiedliche Mengen Acetat oder Succinat zugesetzt (Abbildung 3.10 B). Beim Wachstum mit 91 mM Succinat war die maximale OD₆₀₀ von *C. kluyveri* nach 48 h mit $1,14 \pm 0,06$ nur leicht höher als mit 65 mM Acetat ($0,96 \pm 0,04$). Auch durch eine Verdopplung des Succinats auf 182 mM konnte das Wachstum nur geringfügig verbessert werden. Die maximale OD₆₀₀ von *C. kluyveri* war hierbei nach einer anfänglichen Lag-Phase nach 48 h bei $1,32 \pm 0,04$. Bei einer Substratkombination aus 65 mM Acetat und 91 mM Succinat wurde im Rahmen dieses Versuchsansatzes die höchste OD₆₀₀ von *C. kluyveri* mit $1,49 \pm 0,05$ erreicht. Hierbei konnte zudem keine Lag-Phase zu Beginn des Wachstums wie beim Ansatz mit 182 mM Succinat beobachtet werden (Abbildung 3.10 B). Ferner wurde in einem weiteren Versuchsansatz mit 5 mL Tanner Medium und ebenfalls 96 mM MOPS, sowie 65 mM Acetat und 91 mM Succinat der Einfluss von NaHCO₃ auf das Wachstum von *C. kluyveri* untersucht. Hierbei war die maximale OD₆₀₀ in Anwesenheit von 20 mM NaHCO₃ mit $1,74 \pm 0,02$ deutlich höher als im selben Medium ohne NaHCO₃ mit einer maximalen OD₆₀₀ von $1,35 \pm 0,05$ (nicht gezeigt).

3.4.3 Definition eines festen *C. kluyveri* Mediums: „TM 4040“

Das Grundrezept für das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *C. kluyveri* Festmedium wurde auf Basis der Experimente in Flüssigmedien aus 3.4.1 und 3.4.2 abgeleitet. Mit dem modifizierten Tanner Medium (Tabelle 2.16) und 96 mM MOPS konnten zuvor bereits gute Resultate mit *C. kluyveri* erzielt werden (3.4.2). Nachfolgend sind die Modifikationen des Tanner Mediums beschrieben, welche beim Rezept für das feste *C. kluyveri* Medium (= TM 4040) vorgenommen wurden. Die genaue Zubereitung ist in 2.4.2 beschrieben. Kurz zusammengefasst, wurde zum einen das Medium mit 1,8 % (w/v) Agar versetzt.

Ergebnisse

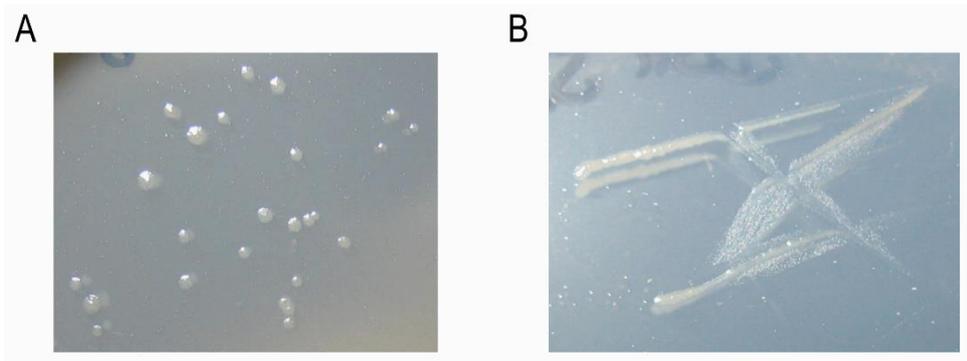


Abbildung 3.11. Wachstum von *C. kluyveri* DSM 555^T auf der Oberfläche des TM 4040 Agars.

Es wurde das modifizierte Tanner Medium mit 96 mM MOPS, 250 mM Ethanol, 91 mM Succinat, 65 mM Acetat, 20 mM NaHCO₃ und 1,8 % (w/v) Agar verwendet. Die Platten wurden für mehrere Tage bei 37 °C in Anaerob-Töpfen bebrütet. (A) *C. kluyveri* Einzelkolonien einer ausplattierten Flüssigkultur nach 7 Tagen Inkubationszeit. (B) Verdünnungsausstrich einer *C. kluyveri* Einzelkolonie nach 3 Tagen Inkubationszeit.

Als Puffersystem wurden 96 mM MOPS eingesetzt, da dieser Zwitterionenpuffer bereits in Kapitel 3.4.1 als geeignet für *C. kluyveri* identifiziert werden konnte. Um die Biomassebildung von *C. kluyveri* zu fördern, wurden zum anderen 250 mM Ethanol, 65 mM Acetat, sowie 91 mM Succinat als primäre Energie- und C-Quelle im Medium verwendet (vgl. Kapitel 3.4.2). Ferner wurde wegen des unter 3.4.2 erwähnten, wachstumsfördernden Effekts zusätzlich 20 mM NaHCO₃ als zusätzliche C-Quelle dem Agar nach dem Autoklavieren zugegeben. Nach dem Ausplattieren von unterschiedlich stark verdünnten *C. kluyveri* Flüssigkulturen auf den oben beschriebenen TM 4040 Agarplatten konnten nach 5-7 Tagen bei 37°C Einzelkolonien auf den Agaroberflächen wachsen. Wie Abbildung 3.11 A zeigt, waren diese Kolonien rund mit glattem Rand, flach bis leicht erhaben, durchsichtig bis weiß und zeigten einen Durchmesser von ca. 1 mm. Bei längerer Bebrütungszeit wurden die Kolonien cremefarbig und bildeten mitunter einen welligen Kolonierand aus (nicht gezeigt). Die Kolonien konnten im Anschluss gut mit einer Impföse gepickt und mehrfach sukzessive auf neue TM 4040 Agarplatten ausgestrichen werden (vgl. Abbildung 3.11 B). Die Bebrütungszeit war bei Verdünnungsausstrichen mit im Durchschnitt 3 Tagen etwas kürzer als bei den ausplattierten Flüssigkulturen. Dennoch trug auch hier eine längere Inkubationszeit zu einer größeren Biomassebildung von *C. kluyveri* und damit zu größeren Koloniedurchmessern bei (nicht gezeigt). Ferner konnten die durch Verdünnungsausstriche gewonnenen Einzelkolonien von *C. kluyveri* erneut in TM 4040 Flüssigmedium inokuliert werden. Bei diesen Kulturen konnte das Wachstum von *C. kluyveri* nach 1-3 Tagen bei 37°C beobachtet werden.

Ferner konnte in einem weiteren Experiment mit Konzentrationen zwischen 0,8-1,8 % (w/v) Agar im Medium gezeigt werden, dass sich eine geringere Konzentration im Medium förderlich auf das Ausbilden von *C. kluyveri* Einzelkolonien auf der Agaroberfläche auswirkt. Als Optimum wurde hier eine Konzentration von 1,0 % (w/v) bestimmt (nicht gezeigt). Die Verwendung von MOPS oder MES

als Puffersystem im modifizierten Tanner Medium zeigte hingegen in einem weiteren Versuchsansatz keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Zahl und Größe von *C. kluyveri* Einzelkolonien auf den jeweiligen Agaroberflächen (nicht gezeigt).

3.5 Minimale Hemmkonzentrationen für die genetische Arbeit mit *C. kluyveri*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein markerfreies System zur genetischen Modifizierung von *C. kluyveri* mit so genannten *codBA*-Plasmiden entwickelt werden. Bei dieser von Kostner *et al.* (2013) entwickelten Technik kann die erste homologe Rekombination über eine Antibiotika-Resistenzkassette selektiert werden. Die zweite homologe Rekombination wird hingegen, wie in Kapitel 4.5.1 erläutert, über den Verlust der *codBA*-Kassette und 5-Fluorocytosin gegenselektiert. Daher wurde nach der erfolgreichen Etablierung des Festmediums die Wirksamkeit dieser beiden Selektionsmarker für *C. kluyveri* untersucht.

3.5.1 Test verschiedener Antibiotika für die Selektion

Bei Clostridien können Transkonjuganten über die Antibiotika-Resistenzkassetten *catP*, *ermB*, *aad9* und *tetA* identifiziert werden. Die Kassetten ermöglichen eine Selektion über die Antibiotika Thiamphenicol (Tm), Erythromycin (Em), Spectinomycin (Sp) oder Tetracyclin (Tet) (Heap *et al.* 2009). Diese vier Antibiotika wurden daher auch für *C. kluyveri* getestet. Dazu wurden die Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) mit *C. kluyveri* sowohl in flüssigem als auch in festem Medium ermittelt. Die MHK-Bestimmung erfolgte mit Agarplatten nach 2.5.5 oder in 96-Well-Platten nach 2.5.4 jeweils mit TM 4040 Medium + 0,1 % (w/v) Hefeextrakt. Die gemessenen OD₆₀₀ Werte der 96-Well Flüssigkulturen sind in Abbildung 3.12 gegen die jeweiligen Antibiotika-Konzentrationen aufgetragen.

Wie Tabelle 3.2 und Abbildung 3.12 zu entnehmen ist, zeigten die Antibiotika Tet und Tm die stärksten wachstumshemmenden Effekte auf *C. kluyveri*. Die bestimmten MHK lagen hierbei im festen Medium bei 1 bzw. 10 µg/mL und im flüssigen Medium sogar bei 0,5 µg/mL. Bei Em fiel der hemmende Effekt mit einer MHK von 6 µg/mL (flüssig) bzw. 50 µg/mL (fest) etwas schwächer aus als bei Tet und Tm. In Anwesenheit von Sp konnte *C. kluyveri* hingegen bis zu einer Konzentration von 750 µg/mL auf Agarplatten und 1,5 mg/mL im Flüssigmedium wachsen, weshalb für dieses Antibiotikum keine MHK-Werte bestimmt werden konnten.

Ergebnisse

Tabelle 3.2. Bestimmte Werte für die Minimale Hemmkonzentration von vier Antibiotika bezüglich *C. kluyveri* in TM 4040 Medium mit 0,05% (w/v) Hefeextrakt.

Flüssig = 200 µL in 96-Well-Platte. Fest = 1,8% (w/v) Agarplatten.

Resistenz	Antibiotikum	MHK flüssig	MHK fest
<i>catP</i>	Thiamphenicol	0,5 µg/mL	10 µg/mL
<i>ermB</i>	Erythromycin	6 µg/mL	50 µg/mL
<i>aad9</i>	Spectinomycin	-	-
<i>tetA</i>	Tetracyclin	0,5 µg/mL	1 µg/mL

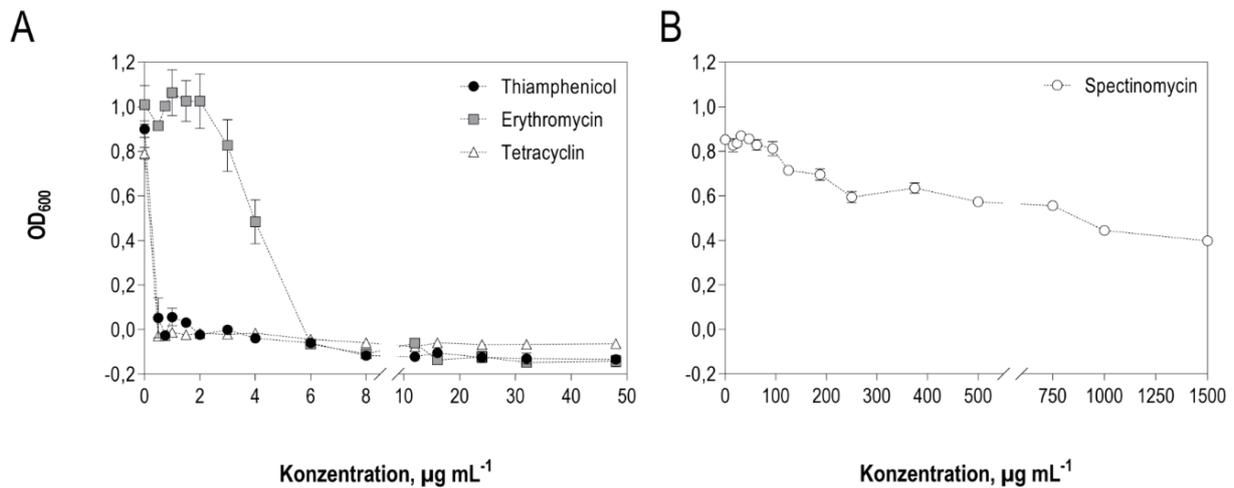


Abbildung 3.12. Minimale Hemmkonzentration (MHK) von vier Antibiotika mit *C. kluyveri* DSM 555^T.

Die Bestimmung erfolgte mit 200 µL TM 4040 Medium in 96-Well-Platten als technische Triplikate. Gezeigt sind die gemessenen OD₆₀₀-Werte nach 2 Tagen bei 37 °C aufgetragen gegen die eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen: (A) 0-50 µg/mL Thiamphenicol, Erythromycin und Tetracyclin, sowie (B) 0-1500 µg/mL Spectinomycin. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen OD₆₀₀-Werte pro Konzentration.

Insgesamt musste bei Tm und Em eine höhere Antibiotikamenge in das Festmedium eingesetzt werden, um den gleichen hemmenden Effekt zu erzielen wie im Flüssigmedium. Dieser Effekt konnte für Tet nicht beobachtet werden. Nach den Überlegungen in Kapitel 4.3.1 wurde für die weiteren genetischen Arbeiten *catP* als Selektionsmarker für *C. kluyveri* ausgewählt, wobei mit 10 µg/mL Tm gearbeitet wurde.

3.5.2 Test von 5-FU und 5-FC für die Gegenselektion

Um die Funktionalität des *codBA* Gens sicherzustellen, wurde zudem der Einfluss von 5-Fluorocytosin (5-FC) und 5-Fluorouracil (5-FU) auf *C. kluyveri* in festem und flüssigem TM 4040 Medium mit 0,1 % Hefeextrakt getestet. Für die Flüssigkulturen wurden 10 mL Medium in Hungate-Röhrchen als Triplikate angeimpft.

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass *C. kluyveri* in Anwesenheit von bis zu 500 µg/mL 5-FC uneingeschränkt wachsen kann. Mit 5-FU wurde hingegen bereits bei einer Konzentration von 30 µg/mL das Wachstum von *C. kluyveri* vollständig gehemmt. Das Ergebnis war für beide Substanzen in flüssigem und festem Medium identisch.

3.6 Überwindung der Restriktions-/Modifikations-Systeme in *C. kluyveri*

Wie bereits in Kapitel 1.4 erörtert, kann die Transformationseffizienz bei Wildtyp-Stämmen maßgeblich durch deren zelleigene Restriktions-/Modifikations- (RM-) Systeme gehemmt werden, insbesondere auch bei Vertretern der Gattung *Clostridium*. Eine Möglichkeit zur Überwindung dieser RM-Systembarriere ist hierbei die sogenannte *in vivo* Methylierung. Bei dieser Methode werden Donorplasmide in *E. coli* vor deren Transkonjugation über Methyltransferasen des jeweiligen Zielorganismus methyliert. Da dieses Muster organismusspezifisch ist, kann somit verhindert werden, dass das Donorplasmid im Zielorganismus von den zelleigenen Restriktionsendonukleasen als Fremd-DNA erkannt und abgebaut wird. In folgendem Abschnitt werden zunächst mögliche RM-Systembarrieren im Genom von *C. kluyveri* identifiziert, auf deren Basis im Anschluss ein Plasmid für die *in vivo* Methylierung konstruiert werden sollte.

3.6.1 Identifizierung potenzieller RM-System Gencluster im Genom von *C. kluyveri* DSM555^T

Insgesamt konnten über REBASE im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T 21 potenzielle Einzelgene bzw. 15 Gencluster identifiziert werden, welche mindestens ein RM-spezifisches Gen enthalten (Abbildung 3.13). Davon befinden sich zwei auf dem Plasmid von *C. kluyveri*. Die Mehrheit dieser Cluster enthält Gene, welche aufgrund bioinformatischer Vorhersagen vermutlich für Methyltransferasen (MTase) vom Typ-II codieren. Ausgenommen sind hierbei die Gene *CKL_2332* und *CKL_2694*, welche gleichzeitig auch eine Endonuklease-Aktivität besitzen könnten.

Ergebnisse

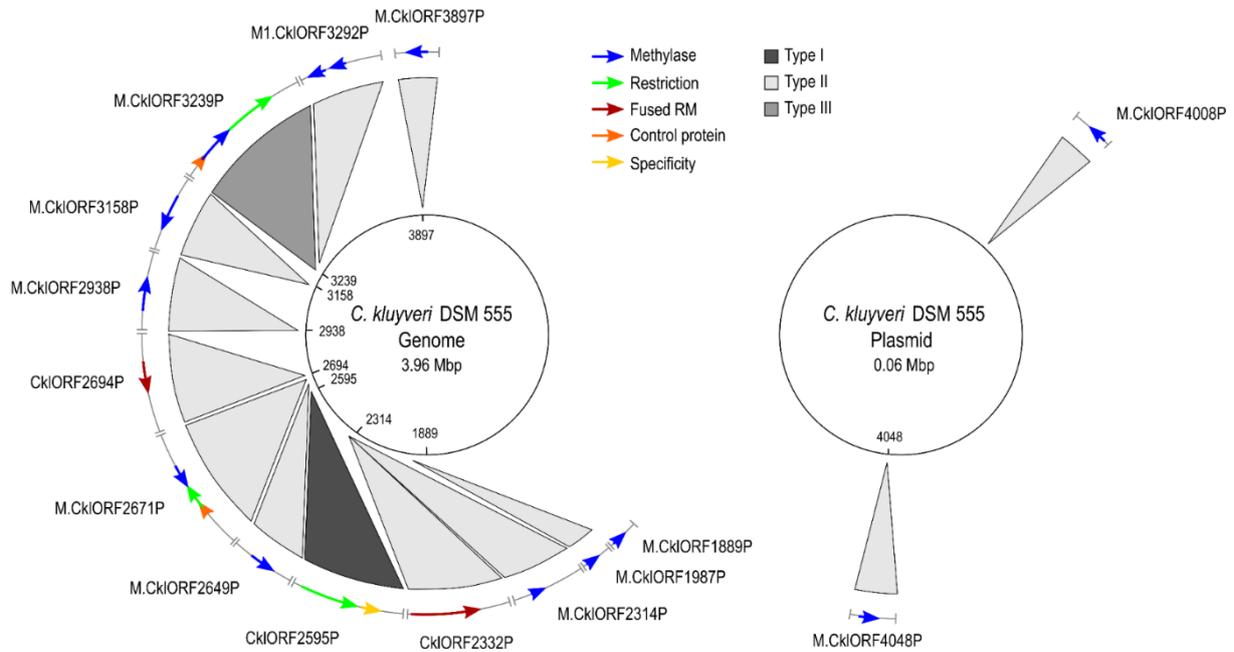


Abbildung 3.13. Lage und Anordnung potenzieller Restriktions-/Modifikationssystem-assoziiierter Gene im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T.

Die gezeigten 21 putativen RM-System Gene auf dem Genom und dem Plasmid von *C. kluyveri* wurden über REBASE identifiziert. Die Abbildung wurde in Inkscape auf Grundlage eines von REBASE generierten Schemas erstellt (Stand: 02/2021).

Drei der im Genom von *C. kluyveri* annotierten, potenziellen RM-Gencluster wiesen einen komplexeren Aufbau auf. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, sind in diesen drei vermutlichen Clustern neben Genen für Restriktionsendonukleasen (REase) (*CKL_2596*, *CKL_2670* und *CKL_3240*) auch weitere RM-assoziierte Gene vorhergesagt. Zu diesen zählen neben den MTasen *CKL_2671* und *CKL_3239* auch eine Spezifitäts-Untereinheit (*CKL_2595*), sowie Kontrollproteine (*CKL_2669*, *CKL_3238*). Es handelt sich hierbei also vermutlich um vollständige RM-Systeme. Interessanterweise wurde von REBASE für das potenzielle Typ-I RM-Systemcluster kein zum REase-Gen *CKL_2596* korrespondierendes MTase-Gen angegeben (Abbildung 3.14). Eine Tabelle aller Gene, welche über REBASE als RM-assoziiert identifiziert wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 6.6).

Ergebnisse

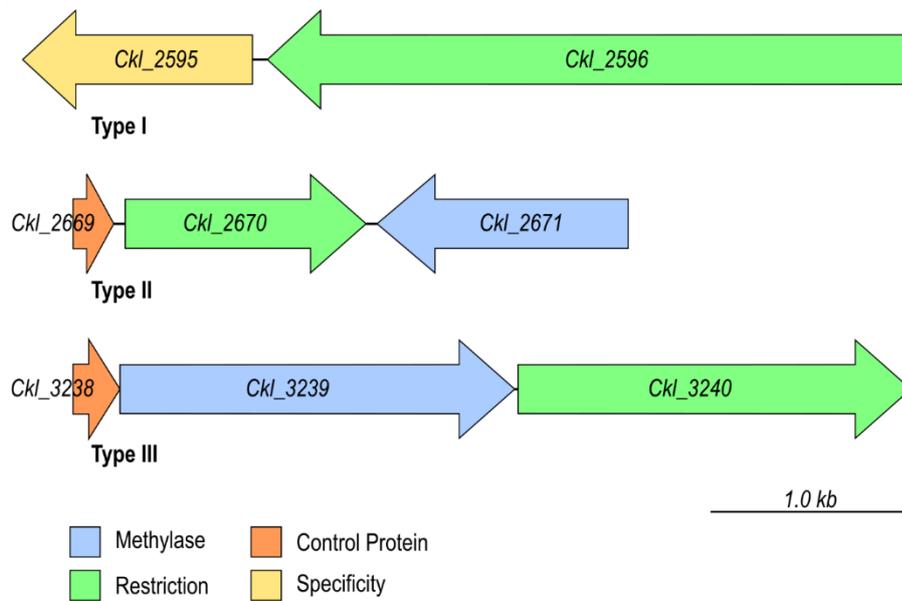


Abbildung 3.14. Schema der Genloci der drei potenziell vollständigen Restriktions-/Modifikationssysteme im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T.

Die dargestellten Gencluster enthalten Gene, welche aufgrund bioinformatischer Vorhersagen über REBASE wahrscheinlich für Endonukleasen (grün), Methyltransferasen (blau), Kontrollproteine (orange) oder Spezifitäts-Untereinheiten (gelb) codieren. Das Schaubild wurde in Inkscape mit Hilfe der Daten zum *C. kluyveri* Genom aus REBASE und NCBI maßstabsgetreu erstellt (Stand: 02/2021).

3.6.2 Konstruktion von putativen Methylierungsplasmiden für *C. kluyveri*

Für die *in vivo* Methylierung in *E. coli* sollten Plasmide mit verschiedenen *C. kluyveri* MTasen erstellt werden. Zum einen wurden hierfür die Gene *CKL_2671* und *CKL_3239* ausgewählt, da es sich hierbei vermutlich um die korrespondierenden MTasen zu den REasen *CKL_2670* bzw. *CKL_3240* aus den drei vollständigen RM-Systemen von *C. kluyveri* handelt (Abbildung 3.14). Zusätzlich wurden zufällig drei weitere Gene (*CKL_2314*, *CKL_2332*, *CKL_2938*) für die *in vivo* Methylierung in Erwägung gezogen. Auch diese drei Gene codieren möglicherweise für MTasen vom Typ-II (Abbildung 3.13).

Im Rahmen von zwei studentischen Arbeiten wurden insgesamt fünf putative Methylierungsplasmide für *C. kluyveri* nach 2.7.3 erstellt. Sie basieren auf dem Plasmid pJL2 aus der Arbeit von Lesiak *et al.* (2014). Für die neuen Methylierungsplasmide wurden die Gene des *C. sacharobutylicum* RM-Systems in pJL2, wie in Abbildung 3.15 veranschaulicht, gegen die oben erwähnten potenziellen MTase Gene aus *C. kluyveri* ausgetauscht (2.7.3). Die somit entstandenen putativen Methylierungsplasmide pCKL_2314, pCKL_2332, pCKL_2671, pCKL_2938 und pCKL_3239 (Tabelle 2.3) wurden im nächsten Schritt auf ihre Funktionalität hin untersucht (3.6.3).

Ergebnisse

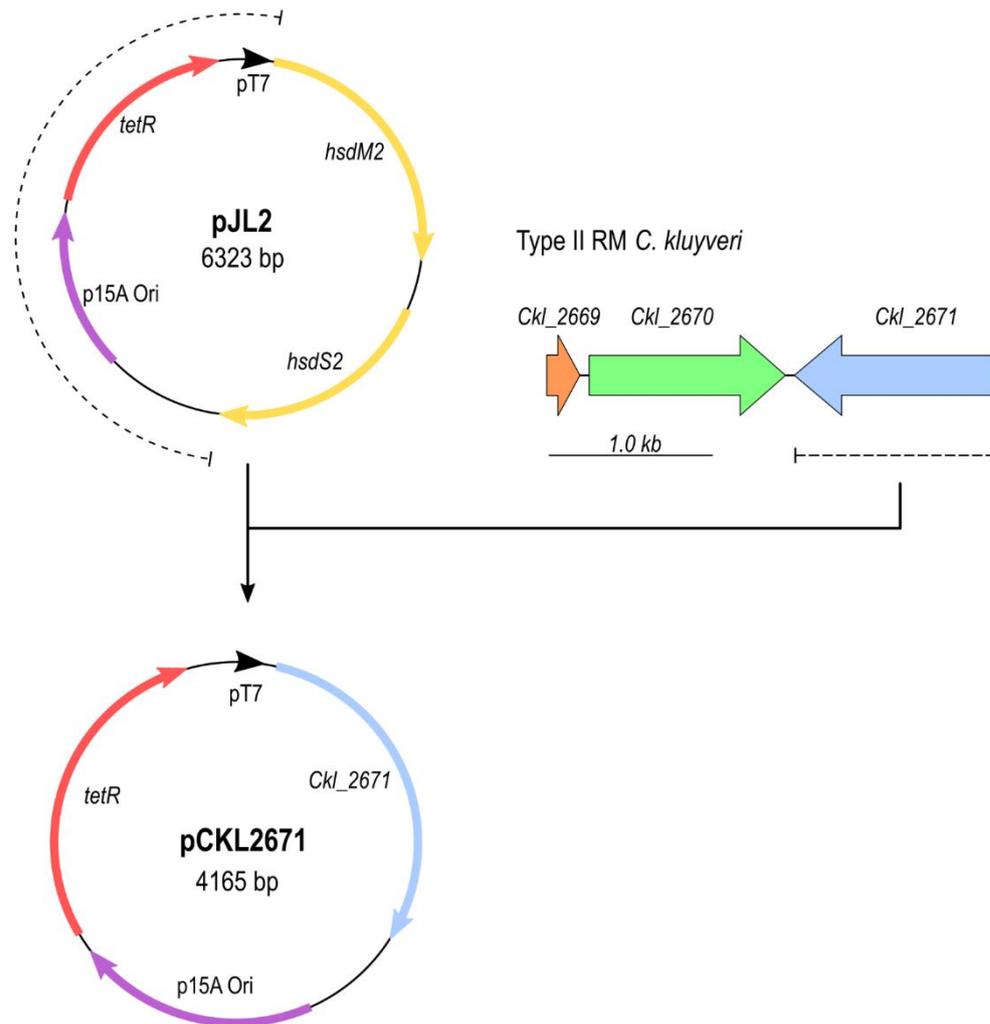


Abbildung 3.15. Schematische Darstellung der Konstruktion von potenziellen Methylierungsplasmiden für *C. kluyveri* auf Basis von pJL2 (Lesiak *et al.* 2014).

Die Grafik zeigt beispielhaft die Konstruktion von pCKL_2671, bei welchem die RM-System-Gene von *C. saccharobutylicum* (*hsdM2* und *hsdS2*) durch das putative Typ-II Methyltransferase-Gen *CKL_2671* aus *C. kluyveri* ersetzt worden ist. Analog dazu wurden vier weitere Plasmide mit den *C. kluyveri* Genen *CKL_2314*, *CKL_2332*, *CKL_2938*, sowie *CKL_3239* erstellt. Schaubild erstellt mit Inkscape (Stand: 03/2023).

Um eine kontrollierte Expression der *C. kluyveri* MTase-Gene in *E. coli* TOP10 sicherzustellen, wurde im Anschluss an die Überlegungen aus Kapitel 4.4.4 im Plasmid pCKL_2671 der Promotor ausgetauscht. Hierfür wurde der Promotor P_{T7} in pCKL_2671 durch den Lactose-Promotor P_{lac} aus pUC19 ersetzt (2.7.3). Auch das Methylierungsplasmid pCKL_2671-Lac mit dem induzierbaren P_{lac} wurde mit dem Zellextrakt in 3.6.3 charakterisiert.

3.6.3 Analyse der putativen Methylierungsplasmide mit einem zellfreien Extrakt (ZFE)

Um zu testen, ob und welche der in 3.6.2 konstruierten potenziellen Methylierungsplasmide möglicherweise für eine Transkonjugation von DNA in *C. kluyveri* geeignet sind, wurden verschiedene *E. coli* TOP10 Donorstämme einem zellfreien Extrakt (ZFE) Assay nach 2.8 unterzogen. Dieser Assay basiert auf den stammspezifischen Restriktionsendonukleasen, welche in einem bakteriellen ZFE enthalten sein können (Whitehead *et al.* 1985). Dies ermöglicht *in vitro* eine Abschätzung darüber, welchen Effekt die zusätzliche Anwesenheit eines *C. kluyveri* Methyltransferase-Gens in *E. coli* später auf den Abbau eines Donorplasmids durch Restriktionsendonukleasen hat. In den folgenden Assays wurde der *C. kluyveri* ZFE zu einer finalen Proteinkonzentration von 125 µg/mL in den Reaktionsansatz eingesetzt.

Zunächst wurden über das *C. kluyveri* ZFE Assay die drei potenziellen Methylierungsplasmide pCKL_2314, pCKL_2671 und pCKL_3239 aus 3.6.2 miteinander verglichen. Hierzu wurde das *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmids pMTL82151 entweder allein, oder zusammen mit einem der drei potenziellen Methylierungsplasmide in *E. coli* coexprimiert und danach für das ZFE Assay extrahiert. Die nach dem Verdau angefertigten Agarosegele mit pMTL82151 sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

Hierbei zeigten insgesamt drei der vier getesteten Ansätze ein vergleichbares Ergebnis. Sowohl bei dem Ansatz ohne Methylierungsplasmid, als auch unter zusätzlicher Anwesenheit der Plasmide pCKL_3239 und pCKL_2314 in *E. coli* konnte ein Abbau von pMTL82151 in unterschiedlich große Fragmente (~0,1 - 3,0 kb) zusammen mit dem *C. kluyveri* ZFE beobachtet werden (Abbildung 3.16 A; orange Pfeile). Der Abbau war bereits nach 30 min Inkubationszeit zu erkennen (nicht gezeigt). Bei pCKL_3239 waren nach 2 h bei 37°C zusätzlich noch größere Fragmente bis maximal 5,0 kb zu sehen (Abbildung 3.16 A). Nach 4 h Inkubationszeit reduzierte sich die Anzahl der beobachteten Banden je nach Ansatz auf 7-8 Stück mit einer maximalen Größe von ~2,0 kb. Interessanterweise trat hierbei nur bei pCKL_3239 eine zusätzliche Bande bei ~1,75 kb auf. Ohne Methylierungsplasmid oder mit pCKL_2314 waren stattdessen zwei schwächere Banden im Bereich um 1,0 kb sichtbar (Abbildung 3.16 B). Anders als bei den vorherigen drei Ansätzen konnte hingegen in Anwesenheit von pCKL_2671 ein Abbau von pMTL82151 durch den *C. kluyveri* ZFE auch nach 4 h bei 37°C nicht beobachtet werden (Abbildung 3.16 B). Im direkten Vergleich sah hierbei die ZFE-Probe (rechts; oranger Pfeil) identisch zu der Negativkontrolle mit Wasser statt ZFE aus (links). Ferner blieb das pMTL82151 Plasmid auch mit pCKL_3239 und pCKL_2314 intakt, wenn im Reaktionsansatz der ZFE durch Wasser ersetzt wurde (Proben ohne Pfeil; Abbildung 3.16 A + B).

Ergebnisse

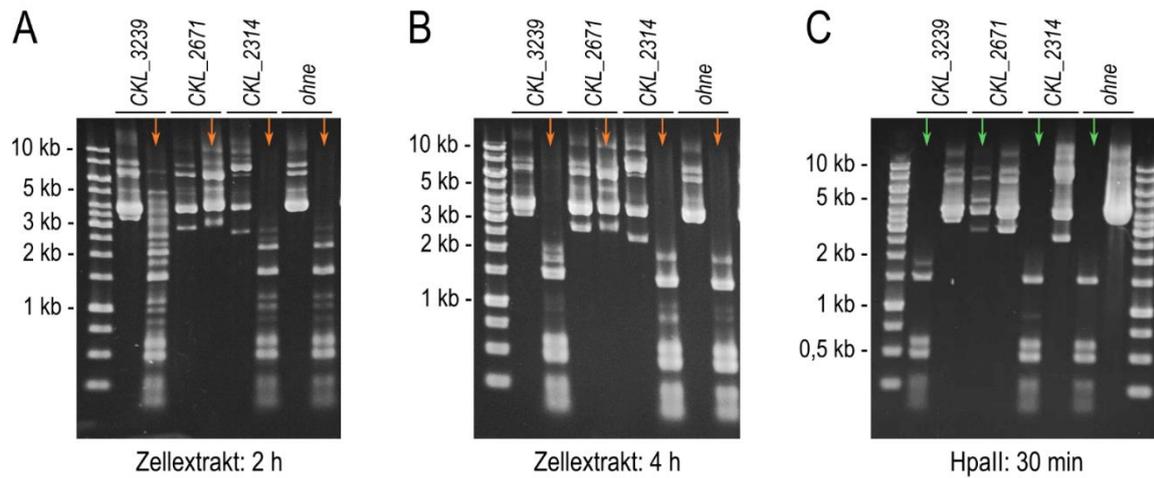


Abbildung 3.16. Aktivitäts-Assay mit drei potenziellen Methylierungsplasmiden für *C. kluyveri*.

Nachweis einer Enzymaktivität der putativen MTase-Gene *CKL_3239*, *CKL_2671* oder *CKL_2314* in *E. coli* TOP10 durch enzymatischen Verdau von pMTL82151. Hierzu wurde pMTL82151 wahlweise ohne oder zusammen mit den Plasmiden pCKL_3239, pCKL_2671 oder pCKL_2314 in *E. coli* über Nacht kultiviert und im Anschluss verdaut. Der Verdau erfolgte wahlweise mit einem *C. kluyveri* zellfreien Extrakt (= ZFE; orange Pfeile) oder mit dem Restriktionsenzym *HpaII* von Thermo Fischer (grüne Pfeile). Bei den Negativkontrollen (Bahnen ohne Pfeil) wurde der ZFE bzw. das Restriktionsenzym durch Wasser ersetzt. Gezeigt ist die elektrophoretische Auftrennung (0,8 % (w/v) Agarose für 35 min bei 120 V) von pMTL82151 folgender Ansätze: (A) *C. kluyveri* ZFE-Assay mit 2 h bei 37 °C, (B) *C. kluyveri* ZFE-Assay mit 4 h bei 37 °C, sowie (C) Restriktionsverdau mit *HpaII* für 30 min bei 37°C. Größenstandard: 1 kb GeneRuler® (Thermo Fischer).

Wie in Abschnitt 4.4.1 näher erläutert, wurde als mögliche Erkennungssequenz für die vermutliche *C. kluyveri* MTase *CKL_2671* auf Basis von Proteinhomologie 5'-CCGG vorhergesagt. Um dies zu überprüfen, wurden dieselben Proben von pMTL82151 mit und ohne Methylierungsplasmid wie zuvor beschrieben verdaut (2.8.2). Allerdings wurde statt dem *C. kluyveri* ZFE das kommerziell erhältliche REase Enzym *HpaII* verwendet, welches ebenfalls 5'-CCGG als Erkennungssequenz aufweist. Wie zuvor beim ZFE schützte auch hier die zusätzliche Anwesenheit von pCKL_2671 in *E. coli* das pMTL82151 Plasmid vor einem nachfolgenden Verdau mit *HpaII*. So sah die Negativkontrolle mit Wasser (rechts) wieder identisch zur *HpaII*-Probe (links; grüner Pfeil) aus (Abbildung 3.16 C). Ohne Methylierungsplasmid oder mit pCKL_2314 bzw. pCKL_3239 wurde pMTL82151 wie zuvor beim ZFE von *HpaII* geschnitten. Hierbei entstanden, mit Ausnahme der schwächeren zusätzlichen Banden, dieselben Fragmentgrößen wie beim ZFE-Verdau nach 4 h (Abbildung 3.16 B + C).

Derselbe schützende Effekt von pCKL_2671 vor einem Abbau durch den *C. kluyveri* ZFE oder durch das Enzym *HpaII* konnte zudem auch mit den *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmiden pMTL83151, pMTL84151 und pMTL85151 demonstriert werden (nicht gezeigt). Das ZFE-Assay wurde zudem mit dem Plasmid pCKL_2671-Lac wiederholt, welches statt des P_{T7} einen induzierbaren P_{lac} Promotor vor der MTase trägt. Als zu schützendes Plasmid wurde dieses Mal pMTL83151 gewählt. Auch hier

konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Promotors keinen Einfluss auf die schützende Wirkung von *CKL_2671* hat. Sowohl ohne als auch mit der Induktion von P_{lac} durch IPTG bzw. Lactose war pMTL83151 in Anwesenheit von pCKL_2671-Lac erneut im Anschluss vor den Endonukleasen des *C. kluyveri* ZFE geschützt (nicht gezeigt).

3.7 Transkonjugation von Shuttleplasmiden in *C. kluyveri*

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der genetischen Arbeit mit *C. kluyveri* war neben der in Kapitel 3.6 beschriebenen Überwindung der RM-Systembarrieren parallel dazu die Entwicklung einer geeigneten Transkonjugationsmethode für Plasmide. Ein solches Methode wurde bisher in der Literatur noch nicht für *C. kluyveri* beschrieben. Für die Einbringung von Plasmiden in Clostridien ist neben der Elektroporation auch die tri-parentale Konjugation möglich. Da sich hierbei die Konjugation durch eine besonders gute Reproduzierbarkeit auszeichnet, sollte sie im Rahmen dieser Arbeit auch für *C. kluyveri* angewendet werden.

3.7.1 Etablierung eines Konjugationsprotokolls für *C. kluyveri*

Für die Entwicklung eines *C. kluyveri* Konjugationsprotokolls wurden insbesondere die Erkenntnisse aus Lesiak *et al.* (2014) zum *in vivo* Methylierungssystem für *C. saccharobutylicum* herangezogen. Hierzu wurden parallel einige putative Methylierungsplasmide konstruiert, darunter auch das als besonders vielversprechend charakterisierte Plasmid pCKL_2671 (Kapitel 3.6). Die Übertragung von Fremd-DNA sollte auch bei *C. kluyveri* mittels tri-parentaler Konjugation erfolgen. Hierfür musste jedoch das für den solventogenen Organismus *C. saccarobutylicum* entwickelte Protokoll nach Lesiak *et al.* (2014) an den sekundären Gärer *C. kluyveri* angepasst werden. Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Modifikationen sind nachfolgend beschrieben. Die aus den Erkenntnissen abgeleitete finale Version des *C. kluyveri* Konjugationsprotokoll ist in Kapitel 2.9.2 dieser Arbeit zu finden.

Als Agar wurde das im Rahmen dieser Arbeit für *C. kluyveri* entwickelte TM 4040 Festmedium aus Kapitel 3.4 verwendet. Aus dem Grundrezept für den TM 4040 Agar (Tabelle 2.16) wurde auf Basis der Überlegungen in Abschnitt 4.3.3 Schrittweise die finale Zusammensetzung der TM 4040 Mating- und Selektionsplatten (siehe 2.3.2) abgeleitet. Dabei wurden die Matingplatten für *E. coli* mit einem erhöhten Hefeextraktgehalt von 5,0 % (w/v), sowie zusätzlich mit 2,5 mM Glukose angereichert. Für die Selektionsplatten wurde hingegen der Hefeextrakt vollständig durch 1,0 % (w/v) CAS ersetzt und der Agargehalt auf 1,0 % (w/v) reduziert. Letzteres sollte die Bildung von *C. kluyveri* Einzelkolonien auf der Agaroberfläche positiv beeinflussen (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Ergebnisse

Wie auch bei *C. saccharobutylicum* wurde für die tri-parentale Konjugation *E. coli* CA434 nach Purdy *et al.* (2002) als Helferstamm, sowie *E. coli* TOP10 als Donorstamm verwendet. Allerdings wurde zur Überwindung der RM-Systeme von *C. kluyveri* das potenzielle Methylierungsplasmid pCKL_2671 oder pCKL_2671-Lac im TOP10 Donorstamm eingesetzt. Auch mit *C. kluyveri* wurden die *E. coli* Donor- und Helferstämmen zu Beginn ihrer exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ ~0,5 geerntet. Für den Helferstamm zeigte sich jedoch im Laufe der Zeit eine positive Korrelation zwischen einer höheren OD₆₀₀ des *E. coli* CA434 (0,6 – 0,7) und einer gesteigerten Gesamtzahl von Transkonjuganten (Daten nicht gezeigt).

Die Reaktivierung des *C. kluyveri* Akzeptorstamms erfolgte wie bei *C. saccharobutylicum* aus einer Sporensuspension über Pasteurisieren, da die so gewonnenen Kulturen ein besser reproduzierbares Wachstum aufwiesen als solche, die aus Glycerin-Stocks angeimpft wurden. Hierbei war das Überschichten des DSMZ-52 Mediums mit einem CO₂-N₂ Mischgas (20:80 % (v/v); Tabelle 2.13) besonders wichtig, da ohne diese zusätzliche C-Quelle das Wachstum von *C. kluyveri* erst stark verzögert oder gar nicht auftrat. Um für die Konjugation eine finale OD₆₀₀ von ~0,5 in der *C. kluyveri* Hauptkultur erreichen zu können, wurden diese am besten im TM 4040 Medium über Nacht für 17-19 h bei 37°C kultiviert.

Für die Konjugationssots wurden Donor, Helfer und Akzeptor in einem Verhältnis von 1:1:1 miteinander gemischt. Im Gegensatz zur Konjugation mit *C. saccharobutylicum* wurde hierzu die *C. kluyveri* Akzeptorkultur nicht zum Resuspendieren der *E. coli* Zellen verwendet. Um zu verhindern, dass die Konjugationssots aufgrund des im TM 4040 Medium enthaltenen Ethanol zu stark auf den Matingplatten verlaufen, wurde stattdessen die *C. kluyveri* Akzeptorkultur nach dem Abzentrifugieren gemeinsam mit den *E. coli* Pellets in 40 µL PBS aufgenommen. Somit konnten möglichst konzentrierte Sots für die Konjugation hergestellt werden.

Zudem wurden die Inkubationszeiten im Konjugationsprotokoll aufgrund des für *C. kluyveri* charakteristischen, langsamen Wachstums insgesamt deutlich verlängert (4.3.3). So wurde die Bebrütung der Konjugationssots mit 48 h im Vergleich zu *C. saccharobutylicum* mehr als verdoppelt. Und auch die Selektion nach Transkonjuganten nahm deutlich mehr Zeit in Anspruch. Im Durchschnitt waren erste Thiamphenicol-resistente *C. kluyveri* Kolonien frühestens nach 5, aber in den meisten Fällen erst nach 11 Tagen bei 37 °C auf den Selektionsplatten sichtbar.

3.7.2 Nachweis einer ersten erfolgreichen Plasmidtranskonjugation in *C. kluyveri*

Erst nach der Umsetzung aller in Kapitel 3.7.1 aufgeführten Modifikationen am tri-parentalen Konjugationsprotokoll für *C. kluyveri* war es möglich, Thiamphenicol-resistente Kolonien auf TM 4040 Selektivplatten nach 11 Tagen bei 37 °C zu beobachten. Bei diesem Versuch nach Protokoll 2.9.2

Ergebnisse

wurde das *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmid pMTL83151, sowie das Methylierungsplasmid pCKL_2671 verwendet.

Die Morphologie der Kolonien auf den TM 4040 Selektivplatten war hierbei vergleichbar mit der des *C. kluyveri* Wildtypstamms auf dem TM 4040 Grundmedium (vgl. Abbildung 3.11). Gepickte Einzelkolonien konnten in flüssigem TM 4040 Medium + 10 mg/L Colistin + 10 mg/L innerhalb von 2-3 Tagen bei 37 °C anwachsen. Gleichzeitig konnte bei denselben Einzelkolonien wie zuvor in flüssigem LB-Medium unter aeroben Bedingungen kein Wachstum beobachtet werden. Die angewachsenen und erneut überimpften TM 4040 Flüssigkulturen wiesen eine gesteigerte Resistenz gegenüber Thiamphenicol bis zu einer Konzentration von 25 mg/L auf (nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden ferner zwei Kontroll-PCR-Reaktionen mit aus diesen Flüssigkulturen extrahierter gDNA durchgeführt (2.9.2). Hierbei war sowohl das *C. kluyveri* spezifische Gen *CKL_2938*, als auch die Antibiotika-Resistenzkassette *catP* von pMTL83151 eindeutig nachweisbar (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten insgesamt auf eine erfolgreiche Transkonjugation des Shuttleplasmids pMTL83151 in den *C. kluyveri* DSM 555^T Wildtypstamm hin.

3.7.3 Test von verschiedenen Gram-positiven Replikons für Shuttleplasmide in *C. kluyveri*

Im weiteren Verlauf sollen verschiedene Shuttleplasmide sowohl auf *codBA* (3.9), als auch auf pMTL-Basis (3.8) für die Transkonjugation in *C. kluyveri* konstruiert werden. Hierfür müssen jedoch vorab geeignete Gram-positive Replikationsursprünge (kurz: Oris) gefunden werden, welche später für die Vervielfältigung des Plasmids im Zielorganismus *C. kluyveri* verantwortlich sind. Bei den Versuchsreihen zur Etablierung eines Konjugationsprotokolls ergab sich bereits ein erster Hinweis darauf, dass der Ori CB102 aus pMTL83151 für die Replikation in *C. kluyveri* vielversprechend ist (Abschnitt 3.7.2). In zwei unabhängigen Konjugationen sollten daher neben CB102 zusätzlich die Oris BP1 aus pMTL82151, CD6 aus pMTL84151 und IM13 aus pMTL85151 für *C. kluyveri* untersucht werden. Die Konjugation wurde hierzu nach 2.9.2 in zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen unter Verwendung des Methylierungsplasmids pCKL_2671 durchgeführt.

Insgesamt konnte nur bei den Ansätzen mit den Oris CB102 und BP1 Thiamphenicol-resistenten Kolonien beobachtet werden (Tabelle 3.3). Hierbei war die Anzahl der pro Konjugationsexperiment gewonnenen Kolonien unter Verwendung des Gram-positiven Oris BP1 rund 2,7-Fach höher als mit dem Ori CB102 im Shuttleplasmid. Zudem waren die Klone des Ansatzes mit BP1 nicht nur größer, sondern waren bereits 3 Tage früher auf den TM 4040 Selektionsplatten sichtbar als mit CB102 (nicht gezeigt).

Ergebnisse

Tabelle 3.3. Koloniezahlen nach der Transkonjugation von *E. coli*-Clostridium Shuttle-Plasmiden mit vier unterschiedlichen Gram-Positiven Replikationsursprüngen in *C. kluyveri*.

Die vier Oris BP1, CB102, CD6 und IM13 wurden parallel in zwei unabhängigen Konjugationsexperimenten getestet. Angegeben ist jeweils die Summe der Thiampenicol-Resistenten (Tm^R) Kolonien der technischen Duplikate nach 11 Tagen bei 37°C.

Gram+ Ori	BP1	CB102	CD6	IM13
Tm ^R Kolonien Experiment 1	210	75	0	0
Tm ^R Kolonien Experiment 2	620	227	0	0

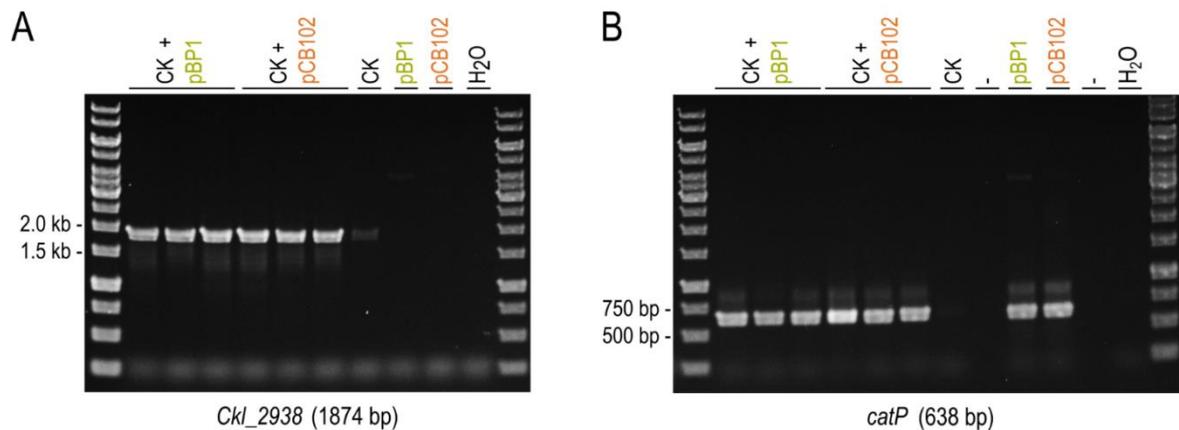


Abbildung 3.17. Kontroll-PCR mit der gDNA aus sechs unabhängigen Klonen zum Nachweis einer erfolgreichen Plasmidtranskonjugation in *C. kluyveri* DSM 555^T.

Es wurden jeweils drei Kolonien nach der Konjugation mit pMTL82151 (CK + pBP1, grün) oder mit pMTL83151 (CK + pCB102) getestet. Als Kontrollen wurde die gDNA von *C. kluyveri* ohne Plasmid (CK), sowie pMTL82151 (pBP1) und pMTL83151 (pCB102) mitgeführt. (A) Amplifizierung des *C. kluyveri* Gens *CKL_2938* zum Nachweis der Kolonie-Identität (erwartetes Fragment 1874 bp). (B) Nachweis der Antibiotika-Resistenzkassette *catP* zum Nachweis von pMTL82151 bzw. pMTL83151 in den gDNA-Proben (erwartetes Fragment 638 bp). Elektrophoretische Auftrennung der Fragmente über ein 0,8 % (w/v) Agarose-Gel für 35 min bei 120 V. Größenstandard: 1 kb GeneRuler® (Thermo Fischer).

Zur Kontrolle wurden je drei unabhängige Klone aus den Konjugationsansätzen mit BP1 oder CB102 als Flüssigkulturen angeimpft. In einer nachfolgenden Kontroll-PCR mit der gDNA nach 2.6.6 mit diesen 6 Kolonien konnte sowohl das *C. kluyveri* Gen *CKL_2938*, als auch die Antibiotika-Resistenzkassette *catP* der pMTL-Plasmide entsprechend der jeweils erwarteten Fragmentlängen amplifiziert werden (Abbildung 3.17). Die *C. kluyveri* Wildtyp gDNA zeigte hingegen lediglich eine Bande für *CKL_2938* und keine Bande für das *catP*-Gen auf dem Plasmid. Ferner konnte die Identität dieser 6 Kolonien über 16S rRNA-Sequenzierung und BLASTn nach 2.5.6 als *C. kluyveri* bestätigt werden. Somit konnten mit BP1 und CB102 insgesamt zwei geeignete Gram-positive Oris für *C. kluyveri* Shuttleplasmide identifiziert werden.

3.8 Thiolase-Überexpression im *C. kluyveri* Wildtypstamm

Das Enzym Acetyl-CoA C-Acetyltransferase (kurz: Thiolase) katalysiert die thermodynamisch ungünstige Kondensationsreaktion von zwei Acetyl-CoA Molekülen zu Acetoacetyl-CoA (Wiesenborn *et al.* 1988), welches das erste Intermediat der reversen β -Oxidation (RBO) im Energiestoffwechsel von *C. kluyveri* bildet (Kapitel 1.3.2). Die Thiolase begünstigt damit die C-Kettenverlängerung von organischen Säuren über RBO und ist ein erfolgsversprechendes Enzym, um die Produktion von Fettsäuren zu modifizieren. Das Ziel ist hierbei eine bevorzugte Freisetzung von Hexanoat und Oktanoat bei der Ethanol-Acetat-Fermentation durch *C. kluyveri*. Ein möglicher genetischer Ansatz zum Erreichen dieses Projektziels ist in diesem Zusammenhang, wie im Folgenden Abschnitt näher beleuchtet, die Überexpression des Thiolase-Gens in *C. kluyveri*.

3.8.1 Die Thiolasen im Genom von *C. kluyveri* DSM555^T

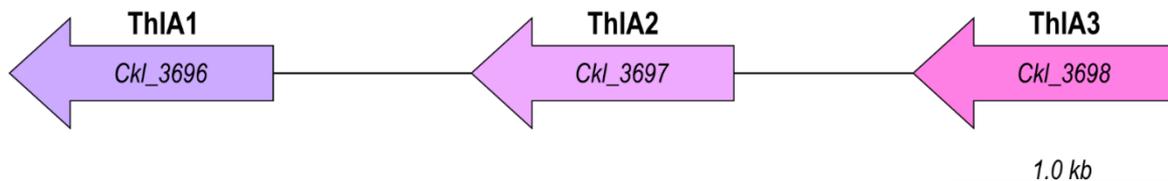


Abbildung 3.18. Schematische Darstellung der Anordnung der drei Thiolase-Gene *thIA1-A3* im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T.

Alle drei Gene besitzen insgesamt eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit zueinander. Die Abbildung wurde auf Basis der Genomdaten aus NCBI und von Seedorf *et al.* (2008) maßstabsgetreu in Inkscape erstellt (Stand: 03/2023).

In der von Seedorf *et al.* (2008) veröffentlichten Genomsequenz von *C. kluyveri* DSM555^T sind bereits drei Gene für Thiolasen annotiert worden (*CKL_3696-3698*). Die paarweise Identität dieser *C. kluyveri* Thiolasen liegt hierbei zwischen 79-81 %. Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, befinden sich die drei Thiolase-Gene *thIA1*, *thIA2* und *thIA3* in unmittelbarer Nähe zueinander. Die Abstände zwischen den Genen betragen 880 bp zwischen *thIA1* und *thIA2*, sowie 796 bp zwischen *thIA2* und *thIA3*. Die mit BPROM (Softberry, 2.1.3) vorhergesagten potenziellen Promotorregionen (vgl. Tabelle 6.7) lagen bei den Thiolasen A1 und A3 80 bp bzw. 79 bp vor den ATG-Start-Codon entfernt. Für die Thiolase A2 betrug der Abstand zwischen dem potenziellen Promotor und dem Start-Codon 242 bp und ist damit deutlich größer als bei *thIA1* oder *thIA3*. Da es sich bei diesen nicht-codierenden Bereichen möglicherweise um cis-regulatorische RNA-Sensoren (Riboswitches) handeln könnte, wurden weitere Analysen durchgeführt. Hierbei waren in der Datenbank „RiboD“ für das Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T zwar 51 potenzielle Riboswitches hinterlegt, jedoch nicht für den Genabschnitt *CKL_3696-3698*. Und auch mit den Onlineprogrammen „Riboswitch finder“ und „Riboswitch scanner“ (2.15.2) konnten keine potenziellen Riboswitches in diesem Abschnitt detektiert werden (Stand: 06/2023).

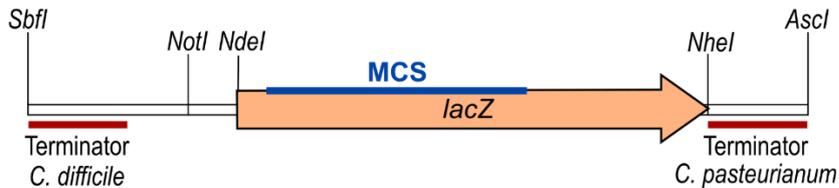
3.8.2 Generierung von *C. kluyveri* Transkonjuganten mit Thiolase-Expressionsplasmiden

Abbildung 3.19. Aufbau des „Multiple cloning site“ (MCS) Moduls aus der modularen Plasmidserie „pMTL8000“ nach Heap *et al.* 2009 mit den Enzym-Schnittstellen *SbfI* und *AscI*.

Das *LacZ*-Gen inklusive der MCS wird hierbei stromauf- und -abwärts von zwei transkriptionellen Terminatoren eingefasst, zum einen aus *C. difficile* (ORF CD0164) und zum anderen aus *C. pasteurianum* (*fdx* Gen). Abbildung modifiziert nach Heap *et al.* (2009) in Inkscape (Stand: 03/2023).

Um die Thiolaseexpression in *C. kluyveri* zu verändern, sollte ein zusätzliches Thiolase-Gen über ein Expressionsplasmid in den Stamm eingebracht werden. Für diesen Versuch wurden die Thiolase-Gene aus *C. acetobutylicum* DSM792^T oder *C. saccharobutylicum* DSM13864^T (vgl. Tabelle 2.8) nach 2.7.4 *in frame* in die Multiple Cloning Site von pMTL82151 ligiert, sodass sie von den im pMTL-Modul befindlichen transkriptionellen Terminatoren stromauf- und abwärts umrahmt werden (vgl. Abbildung 3.19). Es entstanden die Thiolase-Expressionsplasmide pMTL82151_P_{Cac,Thl}_Thl_{Cac} und pMTL82151_P_{Csa,Thl}_Thl_{Csa}.

Im Anschluss wurde versucht, die beiden Thiolase-Expressionsplasmide in *C. kluyveri* zu transkonjugieren. Dazu wurde die in 2.9.2 beschriebene tri-parentale Konjugation unter Zuhilfenahme des Methylierungsplasmids pCKL2671 verwendet. Hierbei konnte auch nach fünf unabhängigen Konjugationen mit dem *C. saccharobutylicum* Thiolase-Plasmid pMTL82151_P_{Csa,Thl}_Thl_{Csa} kein *C. kluyveri* Transkonjugant auf den Selektionsplatten mit Thiamphenicol wachsen. Mit dem *C. acetobutylicum* Thiolase-Expressionsplasmid pMTL82151_P_{Cac,Thl}_Thl_{Cac} konnten hingegen zwei Thiamphenicol-resistente Kolonien gewonnen werden. Die Identität der gewonnenen Transkonjuganten CK_Ra9#K2A und CK_Ra9#K2B als *C. kluyveri*, sowie die erfolgreiche Plasmidübertragung konnte über Kontroll-PCR (2.6.6) und 16S rRNA-Sequenzierung (2.5.6) erfolgreich nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Ferner wurde auf die gleiche Weise das pMTL82151 Plasmid ohne Thiolase (= Vektor-Kontrolle) ebenfalls über tri-parentale Konjugation in *C. kluyveri* eingebracht. Diese Transkonjuganten CK_82#K1B1 und CK_82#K1B2 wurden in der nachfolgenden phänotypischen Analyse (3.8.3) und für die qRT-PCR (3.8.4) als Kontrolle herangezogen.

Ergebnisse

3.8.3 Phänotypische Analyse der *C. kluyveri* Transkonjuganten CK_Ra9#K2A und CK_Ra9#K2B

Nachdem das Plasmid pMTL82151_{P_{Cac,Thl}_Thl_{Cac}} mit dem Thiolase-Gen aus *C. acetobutylicum* (= CK_Ra9), sowie die Vektor-Kontrolle pMTL82151 (= CK_82) erfolgreich in *C. kluyveri* eingebracht werden konnten, sollten die von den Transkonjuganten gebildeten organischen Fettsäuren und Alkohole miteinander verglichen werden. Hierzu wurde ein Wachstumsversuch mit den Transkonjuganten CK_Ra9#K2A und CK_Ra9#K2B, sowie CK_82#K1B1 und CK_82#K1B2 in 5 mL Hurst Medium nach Tabelle 2.17 mit 10 mg/L Thiamphenicol bei 37°C für 72 h durchgeführt und die gebildeten Produkte mittels HPLC nach 2.14.1 quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mit dem *C. kluyveri* DSM555^T Wildtyp in Hurst Medium ohne Antibiotikum verglichen.

Zunächst zeigte sich bei den Werten der optischen Dichte ein schwächeres Wachstum der beiden *C. kluyveri* Transkonjuganten CK_Ra9 mit dem Thiolase-Expressionsplasmid pMTL82151_{P_{Cac,Thl}_Thl_{Cac}}. Die maximale OD₆₀₀ lag hier nach 54 h bei nur $1,17 \pm 0,12$, wohingegen sowohl die Vektor-Kontrolle CK_82, als auch die Wildtyp- Kontrolle Werte von $1,40 \pm 0,12$ bzw. $1,43 \pm 0,10$ aufwiesen (Abbildung 3.20 A).

Beim Substrat Ethanol, sowie bei den Produkten Butyrat und Hexanoat konnten ebenfalls Unterschiede in den gemessenen Konzentrationen zwischen den drei getesteten Kulturtypen beobachtet werden. So war die nach 72 h in der Kultur verbliebene Ethanolmenge beim *C. kluyveri* Transkonjuganten mit dem Thiolase-Plasmid CK_Ra9 mit $5,90 \pm 0,41$ g/L höher im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die Mengen lagen hier bei $3,84 \pm 0,36$ g/L Ethanol für den Wildtyp und $4,59 \pm 0,80$ g/L für den Leer-Plasmid Stamm CK_82. Dieser Unterschied konnte bei der ersten Messung nach 24 h zwischen den Kulturtypen noch nicht beobachtet werden (Abbildung 3.20 B).

Für das C₄-Produkt Butyrat wurde hingegen nach einer anfänglichen Konzentrationszunahme in allen drei Kulturtypen zwischen 48 h und 72 h eine erneute Abnahme der Konzentration festgestellt (Abbildung 3.20 C). Zudem wurden beim *C. kluyveri* Stamm mit dem Thiolase-Plasmid CK_Ra9 insgesamt höhere Butyratkonzentrationen quantifiziert als in den beiden Kontrollansätzen. Hierbei lag die gemessene maximale Menge nach 48 h bei im Durchschnitt $2,65 \pm 0,07$ g/L mit einer Abnahme auf eine finale Konzentration von $2,30 \pm 0,09$ g/L. Im Vergleich dazu waren zwar die maximalen Butyratmengen in den Kontrollansätzen nach 48 h zwar etwas niedriger mit $2,28 \pm 0,10$ g/L (Wildtyp) bzw. $2,13 \pm 0,19$ g/L (Vektor-Kontrolle CK_82). Diese Kulturen zeigten dafür aber eine stärkere erneute Konzentrationsabnahme auf jeweils $1,58 \pm 0,10$ g/L bzw. $1,65 \pm 0,18$ g/L Butyrat.

Ergebnisse

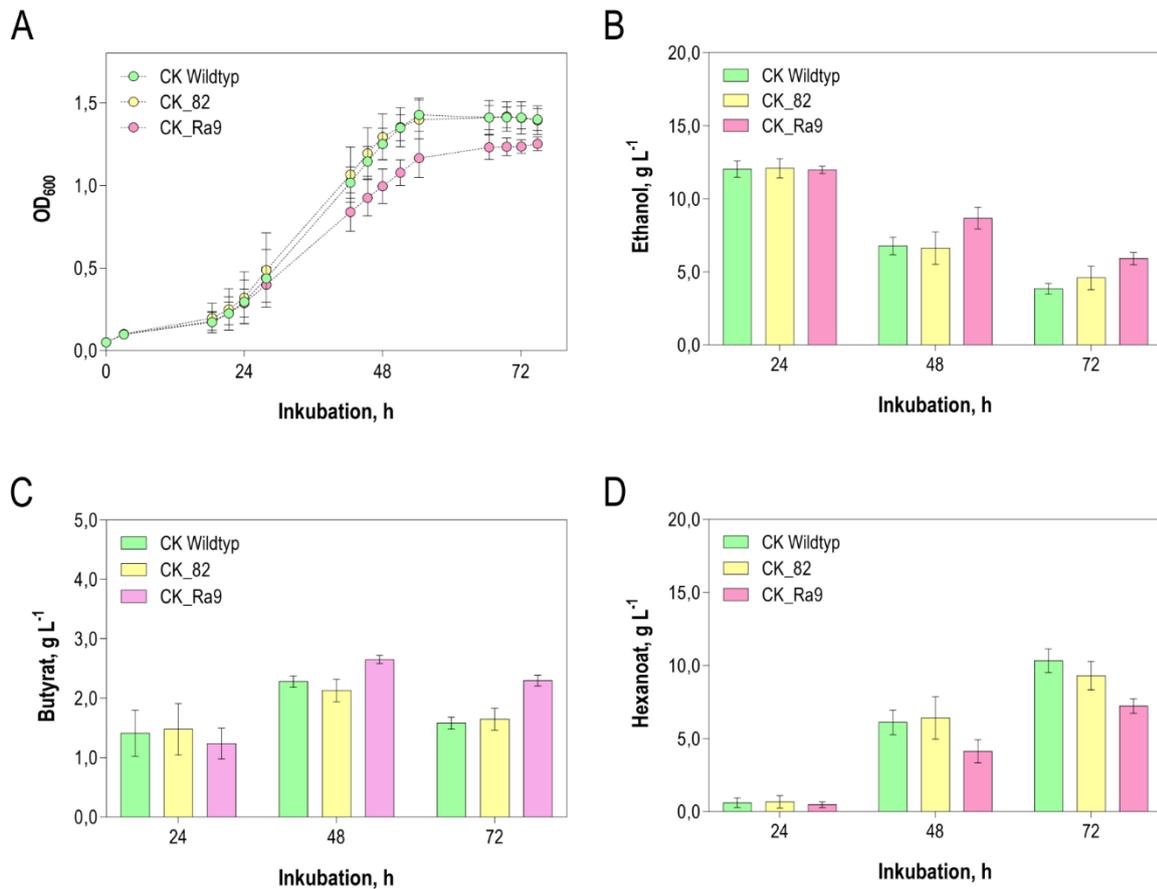


Abbildung 3.20. Phänotypische Charakterisierung des *C. kluyveri* Transkonjuganten CK_Ra9 mit einem Plasmid zur Expression des Thiolase-Gens aus *C. acetobutylicum*.

Das Wachstum und die Produktbildung wurde über 72 h bei 37 °C in 5 mL modifiziertem Hurst Medium mit 15 g/L MES, 343 mM Ethanol, 102 mM Acetat, 52 mM NaHCO₃ und ggf. 10 µg/mL Tm bestimmt. Die Resultate des *C. kluyveri* Expressionsstamms CK_Ra9 (pink) sind jeweils den Messwerten des Wildtyps (grün), sowie denen des Vektor-Kontrollstamms CK_82 gegenübergestellt. (A) Wachstum der Kulturen über 72 h bei 37 °C als OD₆₀₀-Werte, (B) die über HPLC quantifizierte Menge des Substrates Ethanol im Kulturmedium in g/L, sowie (C+D) Quantifizierung der Endprodukte Butyrat und Hexanoat im Kulturmedium in g/L über HPLC. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von jeweils zwei unabhängigen Klonen in technischen Triplikaten.

Anders als beim Butyrat konnte beim C₆-Produkt Hexanoat beim *C. kluyveri* Transkonjuganten mit dem Thiolase-Expressionsplasmid CK_Ra9 keine erhöhten Bildungsraten festgestellt werden (Abbildung 3.20 D). Vielmehr lag die finale Hexanoatmenge im Medium nach 72 h bei den beiden CK_Ra9 Transkonjuganten deutlich niedriger als in beiden Kontrollansätzen. Ohne das zusätzliche Thiolase-Gen wurde von *C. kluyveri* CK_82 noch 9,31 ± 0,97 g/L Hexanoat produziert, welche vergleichbar mit der Hexanoatmenge des Wildtypstamms von 10,32 ± 0,82 g/L ist. Mit dem episomalen Thiolase-Gen von *C. acetobutylicum* lag hingegen die finale Hexanoatkonzentration bei *C. kluyveri* CK_Ra9 nur noch bei 7,23 ± 0,49 g/L. Insgesamt wurde damit in allen drei Kulturtypen zum

Endzeitpunkt nach 72 h deutlich mehr Hexanoat als Butyrat gebildet. Ferner konnte jedoch in keiner der untersuchten Kulturen das C₈-Produkt Oktanoat nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.8.4 Nachweis der *C. acetobutylicum* Thiolase-mRNA im *C. kluyveri* Transkonjuganten mittels qRT-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die *C. kluyveri* Thiolase-Plasmid Transkonjuganten CK_Ra9 andere Produktmengen bilden als die Leer-Plasmid Transkonjuganten CK_82 (3.8.3). Im Unterschied zu CK_82 liegt in CK_Ra9 ein zusätzliches Thiolase-Gen aus *C. acetobutylicum* episomal auf einem Plasmid vor. Um zu zeigen, dass die veränderten Produktmengen in CK_Ra9 tatsächlich auf eine Transkription des episomalen Thiolase-Gens zurückzuführen ist, wurde die mRNA dieses Gens mit Hilfe einer Echtzeit Reverse Transkriptions PCR (= real-time RT-PCR oder qRT-PCR) nach 2.12 nachgewiesen.

Hierzu wurde zunächst, wie in 2.12.1 beschrieben, ein geeignetes qRT-PCR Assay auf Basis der Gene *gyrA1* aus *C. kluyveri* (CKL_0007) als Referenz, sowie *thl* aus *C. acetobutylicum* (CA_RS14790) als Zielgen etabliert. Unter den als optimal identifizierten Annealing-Temperaturen von 61 °C für die *gyrA1* Primer CK_GyrA1_fw/rv und 57 °C für die *thl* Primer Cac_Thl_fw/rv (Tabelle 6.5) konnten geeignete PCR-Effizienzen von 0,941 bzw. 0,997 erzielt werden. Der Unterschied zwischen Ziel- und Referenzgen liegt damit bei 0,056. Somit konnten diese beiden Primerpaare zur Analyse der *C. kluyveri* Transkonjuganten CK_82 und CK_Ra9 herangezogen werden.

Im Anschluss wurden sowohl die Leer-Plasmid (CK_82), als auch die Thiolase-Plasmid (CK_Ra9) *C. kluyveri* Transkonjuganten aus 3.8.2 wie in Abschnitt 2.12.2 beschrieben mit einem qRT-PCR Assay untersucht. Die biologischen Duplikate der beiden Transkonjuganten (CK_82#K1B1 und CK_82#K1B2, sowie CK_Ra9#K2A und CK_Ra9#K2B) zeigten hierbei identische C_T-Werte bezüglich des Referenzgens *gyrA1* aus *C. kluyveri* mit 24,81 ± 0,55 für CK_82 bzw. 24,39 ± 0,19 für CK_Ra9 über drei technische Replikate. Beim plasmidcodierten Gen *thl* aus *C. acetobutylicum* lag hingegen der C_T-Wert bei den Leer-Plasmid Transkonjuganten CK_82 mit 31,44 ± 0,35 um einiges höher als bei den Thiolase-Plasmid Transkonjuganten CK_Ra9 mit 18,27 ± 0,49. Relativ quantifiziert mit der Pfaffl-Methode nach 2.12.3 bedeutet dies, bezogen auf das Referenzgen *gyrA1*, eine 5.566-Fache Erhöhung der *thl* Expression in den CK_Ra9 Transkonjuganten im Vergleich zu den CK_82 Leer-Plasmid Transkonjuganten von *C. kluyveri*. Somit konnte die mRNA der *C. acetobutylicum* Thiolase eindeutig in den Thiolase-Plasmid Transkonjuganten CK_Ra9 von *C. kluyveri* nachgewiesen werden.

3.9 Konstruktion von *codBA*-Basisvektoren für *C. kluyveri*

Wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt, sollen im Rahmen dieser Arbeit *codBA*-Plasmide zur Generierung von markerfreien Deletionen oder Insertionen im Genom von *C. kluyveri* konstruiert werden. Neben einer Optimierung des *C. kluyveri* RBO-Stoffwechsels im Hinblick auf eine Syngas-fermentierende Co-Kultur mit *C. carboxidivorans* sollte zunächst eine Deletion der in Kapitel 3.6 analysierten, vollständigen Restriktions-/Modifikationssysteme zur Erhöhung der Transformationseffizienz erfolgen. Vorab sollten hierfür verschiedene *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmide erstellt werden. In diese können später homologe Flanken für eine Integration ins Genom eingefügt werden.

3.9.1 Empty Shuttleplasmid pMS1_fdx

Alle *codBA*-Plasmide dieser Arbeit wurden ausgehend von dem Empty Shuttleplasmid pHE1-C2 konstruiert (Tabelle 2.6). Wie in Kapitel 3.7.3 erwähnt, konnte unter Verwendung des IM13 Gram-positiven Oris keine *C. kluyveri* Transkonjuganten im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden. Daher wurde für die Arbeit mit *C. kluyveri* zunächst das Empty Shuttleplasmid pMS1_fdx konstruiert. In diesem Plasmid wurde, wie in 2.7.5 beschrieben, der Ori IM13 von pHE1-C2 erfolgreich über ein Gibson Assembly gegen den Ori CB102 aus pMTL83151 ausgetauscht. Folglich befindet sich in pMS1_fdx das *codBA*-Gen aus *C. ljungdahlii* auch weiterhin unter der Kontrolle des Ferredoxin Promotors P_{fdx} aus *C. sporogenes*.

3.9.2 Empty Shuttleplasmid pMS1_upp und pMS2_upp

Um zu verhindern, dass in pMS1_fdx das *codBA*-Gen aufgrund von P_{fdx} aus *C. sporogenes* nach Transkonjugation in *C. kluyveri* zu stark exprimiert wird, sollte für zukünftige Basisvektoren ein alternativer Promotor gefunden werden.

Eine Insertion des *codBA*-Gens aus *C. ljungdahlii* zusammen mit seinem nativen Promotor in pMS1_fdx war im Rahmen dieser Arbeit bereits während der Konstruktion in *E. coli* mehrfach gescheitert (nicht gezeigt). Daher wurde, wie im Kapitel 4.5.2 näher erläutert, als Alternative der Promotor der *C. ljungdahlii* Uracil-Phosphoribosyltransferase (P_{upp}) für *C. kluyveri codBA*-Basisvektoren untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pMS1_upp, wie in 2.7.5 erläutert, über ein Gibson Assembly konstruiert. Hierbei konnte P_{fdx} aus *C. sporogenes* im pMS1_fdx erfolgreich gegen P_{upp} aus *C. ljungdahlii* ausgetauscht werden.

Ferner wurde während einer Bachelorarbeit der Gram-positive Ori CB102 in pMS1_upp gegen den ebenfalls in *C. kluyveri* als funktional identifizierten Ori BP1 (siehe 3.7.3) getauscht (Bachelorarbeit Jennifer Reif, TU München 2022, nicht veröffentlicht). Dieses Empty Shuttleplasmid wurde als pMS2_upp benannt.

3.9.3 *In frame* Deletionsplasmide für das putativen Typ-II RM-Systems in *C. kluyveri*

Ausgehend von den in 3.9.2 konstruierten, Empty Shuttleplasmiden pMS1_upp und pMS2_upp für das *codBA*-System konnten im Anschluss verschiedene Varianten von Deletionsplasmiden erstellt werden. Als erstes sollte eine Deletion der RM-Systembarrieren in *C. kluyveri* erfolgen, um die Transformationseffizienz von für nachgeschaltete genetische Modifikationen zu steigern. Auf Basis des ZFE Assays (3.6.3) und der Transkonjugationsexperimente (3.7) wurde das potenzielle Typ-II RM-System mit den Genen *CKL_2669* - *CKL_2671* ausgewählt (Abbildung 3.14), da dieses eine wichtige Transformationsbarriere in *C. kluyveri* sein könnte. Um diese Vermutung zu prüfen, soll das potenzielle Typ-II RM-System inaktiviert werden. Die Konstruktion der hierzu benötigten Deletionsplasmide über ein Gibson Assembly ist detailliert in Kapitel 2.7.6 beschrieben.

Da die Rekombinationswahrscheinlichkeiten von homologen Flanken variabel sind und somit auch den Deletionserfolg beeinflussen können, wurde für die *in frame* Deletion des putativen Typ-II RM-Systems in *C. kluyveri* zwei unterschiedliche Flankenpaare designt (2.7.6). Mit dem ersten Flankenpaar („ $\Delta 2671$ “) sollte das Gencluster vollständig mit allen drei Genen (*CKL_2669* - *CKL_2671*) deletiert werden. Durch das zweite Flankenpaar („ $\Delta 2670$ “) sollte hingegen lediglich das für die Restriktion der Fremd-DNA mutmaßlich verantwortliche, REase-Gen *CKL_2670* aus dem *C. kluyveri* Genom entfernt werden.

Nachdem in der Vergangenheit je nach Quelle die Flanken an unterschiedlichen Stellen in das leere *codBA*-Plasmidbackbone eingefügt worden sind (Kostner *et al.* 2013, Huang *et al.* 2018) wurden auch hier zwei Varianten getestet: (1) zwischen dem Ori BR322 und der *oriT/traJ*-Region, sowie (2) zwischen dem *codBA*-Gen und der *catP*-Kassette. Allerdings ging die Insertion des ersten Flankenpaars „ $\Delta 2671$ “ in pMS1_upp zwischen BR322 und *oriT/traJ* mit einem vollständigen Verlust der Konjugationsfähigkeit dieses Deletionsplasmids einher (nicht gezeigt). Daher wurden nachfolgend für die Insertion der Flanken „ $\Delta 2670$ “ und „ $\Delta 2671$ “ die Region zwischen dem *codBA*-Gen und der *catP*-Kassette verwendet. Die so gewonnenen neuen Plasmidvarianten konnten im Anschluss erfolgreich in *C. kluyveri* transkonjugiert werden (persönliche Kommunikation Andreas Abstreiter, TU München, nicht veröffentlicht). Aufgrund des recht zeitaufwendigen Konjugationsprotokolls für *C. kluyveri* wurde eine Deletion des potenziellen Typ-II RM-Systems nicht mehr im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt, sondern wird aktuell in der zweiten Projektphase von SynCoClos durch den Doktoranden Andreas Abstreiter fortgesetzt. Alle auf Basis von pMS1_upp und pMS2_upp erfolgreich konstruierten Deletionsplasmide sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

3.10 Untersuchung der CO-Toxizität in *C. kluyveri* durch Transkriptomanalyse

3.10.1 Fermentation von *C. kluyveri* mit kurzzeitiger CO-Begasung

In mehreren veröffentlichten Fermentationsprozessen zeigte *C. kluyveri* übereinstimmend bei kontinuierlicher CO-Begasung eine Wachstumsinhibierung (Diender *et al.* 2016, Bäumler *et al.* 2022, Bäumler *et al.* 2023). Daneben konnte in Bäumler *et al.* (2023) gezeigt werden, dass eine zeitlich begrenzte Begasung (9 h) von *C. kluyveri* im Rührkesselreaktor mit 100 mbar CO während der exponentiellen Wachstumsphase mit einem Absinken der Wasserstoffbildungsrate in diesem Zeitraum einhergeht. Die verringerte Wasserstoffbildungsrate trat hierbei ausschließlich während des CO-Begasungszeitraums auf (Bäumler *et al.* 2023).

Um zu untersuchen, ob die verringerte Wasserstoffbildungsrate von *C. kluyveri* aus Bäumler *et al.* (2023) möglicherweise durch eine Hemmung der beiden [FeFe] Hydrogenasen über das CO hervorgerufen wird, wurde eine Transkriptomanalyse realisiert. Hierfür wurden zwei identische Fermentationen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM School of Engineering and Design, Garching, Deutschland) unter der Anleitung von Miriam Bäumler durchgeführt. Die Fermentation von *C. kluyveri* erfolgte nach 2.4.9 in 1 L Hurst Medium mit 6,0 g/L Acetat und 15 mL/L Ethanol in einem 2 L STR. In einem Batchprozess wurde *C. kluyveri* während der exponentiellen Wachstumsphase für 3 h mit 100 mbar CO kontinuierlich begast (= Reaktor 1), der zweite Batchprozess wurde hingegen als Referenz ohne CO-Begasung durchgeführt (= Reaktor 2). Die während der CO-Fermentation aufgezeichneten Wasserstoffbildungs- und Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik sind der vorliegenden Arbeit ergänzend angehängt (Abbildung 6.8).

Für die Transkriptomanalyse wurden sowohl aus dem CO- als auch aus dem Kontroll-Batchprozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten Zellen aus dem Bioreaktor entnommen und die RNA nach 2.11.1 und 2.11.2 mit der Kugelmühle und dem TRIzol™ Reagenz extrahiert. Die Beprobung des CO-Batchprozesses (= Reaktor 1) erfolgte sowohl direkt vor (19,5 h), als auch zwei Mal während (20,2 h bzw. 22,5 h), sowie 1 h nach (23,5 h) der Begasung mit 100 mbar CO. Zum Vergleich wurden aus dem Kontroll-Batchprozess (= Reaktor 2) als Referenz zu denselben Zeitpunkten wie zuvor beim CO-Reaktor ebenfalls Proben entnommen.

3.10.2 Transkriptomanalyse von *C. kluyveri* mit bzw. ohne CO-Begasung

Um auf Transkriptomebene Veränderungen in der *C. kluyveri* Genexpression durch die zeitweise Begasung mit 100 mbar CO erkennen zu können, wurde die RNA aus 3.10.1 über Illumina NovaSeq nach 2.13.2 sequenziert und bioinformatisch nach 2.15.4 ausgewertet. Im Anschluss wurden die generierten Read-Count-Werte von 46 ausgewählten, mit dem RBO-Stoffwechsel assoziierten Genen zwischen der *C. kluyveri* CO- und Kontroll-Batchfermentation verglichen (Tabelle 6.8)

Ergebnisse

Mit Ausnahme der beiden [FeFe] Hydrogenasen lagen hierbei die Differenzen aller untersuchten Genexpressionswerte zwischen den beiden Konditionen (mit bzw. ohne CO) unterhalb des zuvor festgelegten Schwellenwerts 2,0. Insgesamt ließen sich somit keine wesentlichen Unterschiede im *C. kluyveri* Genexpressionsprofil durch die zeitweise Begasung mit 100 mbar CO erkennen. Bei den [FeFe] Hydrogenase-Genen *CKL_0841* und *CKL_2257* wichen hingegen die Expressionswerte der CO-Fermentation deutlich von den Werten des Kontroll-Batchprozesses ab. So waren zu beiden Zeitpunkten unter CO-Exposition (20,2 h und 22,5 h) die Read-Count-Werte von *CKL_0841* und *CKL_2257* der CO-Batchfermentation in Reaktor 1 um ein Vielfaches erhöht, zwischen 2,8 und 7,2-Fach im Vergleich zu Reaktor 2 ohne CO (Tabelle 3.4, grüne Felder). Beide Zeitpunkte entsprechen einer Exposition von *C. kluyveri* mit CO im Reaktor 1 für 40 min bzw. 3 h (Abbildung 6.8). Dieser Effekt konnte kurz vor Beginn der CO-Begasung in Reaktor 1 noch nicht beobachtet werden (Tabelle 3.4, Zeitpunkt 19,5 h). Hier lag die Differenz der Genexpressionswerte zum Kontrollreaktor 2 ohne CO noch unterhalb des Schwellenwerts 2,0. Nach dem vollständigen Stopp der CO-Begasung in Reaktor 1 und einer erneuten Beprobung beider Fermentationsansätze eine Stunde später wurde hingegen beobachtet, dass die Read-Count-Werte beider [FeFe] Hydrogenasen für den CO-Batchprozess nun um ein Vielfaches kleiner waren, genauer gesagt 2,1 bzw. 5,7-Fach niedriger im Vergleich zum Kontroll-Batchprozess in Reaktor 2. Zu diesem Zeitpunkt war *C. kluyveri* in Reaktor 1 bereits über 1 h wieder ohne CO weitergewachsen (Abbildung 6.8).

Somit waren die beiden [FeFe] Hydrogenase-Gene von *C. kluyveri* (*CKL_0841* und *CKL_2257*) unter CO-Einfluss stärker exprimiert als ohne CO.

Tabelle 3.4. Read-Count Werte der [FeFe] Hydrogenase-Gene aus der Transkriptomanalyse zur Untersuchung der CO-Sensitivität von *C. kluyveri*.

Für Reaktor 1 (=CO-Batchprozess) wurde zeitweise für 3 h mit 100 mbar CO begast. Reaktor 2 (=Kontroll-Batchprozess) wurde als Referenz ohne CO gefahren. Beide Prozesse wurden nacheinander in demselben Reaktor durchgeführt und jeweils zu identischen Zeitpunkten beprobt. Die Extrahierte RNA wurde mittels Illumina NovaSeq analysiert. Grün = höhere Expression und rot = niedrigere Expression Reaktor 1 im Vergleich zu Reaktor 2.

Locus	Gen	Reaktor 1: CO-Batchprozess				Reaktor 2: Kontroll-Batchprozess			
		19,5 h	20,2 h	22,5 h	23,5 h	19,5 h	20,2 h	22,5 h	23,5 h
CKL_0841	[FeFe] Hydrogenase 2	624	7.781	4.661	335	1.155	1.077	770	1.926
CKL_2257	Fe-only hydrogenase 1	9.510	26.797	28.491	5.995	13.144	9.586	7.732	12.834

4 Diskussion

4.1 Design von FISH-Sonden für Co-Kulturen

4.1.1 Auswahl einer geeigneten Bindestelle für die Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb

Zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* wurden die beiden 23S rRNA Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb mit dem ARB-Softwarepaket neu abgeleitet. Dies war zum einen nötig, da die beiden Organismen derselben Gattung angehören, was eine Anwendung von gruppenspezifischen Sonden nahezu unmöglich macht. Zum anderen war die bereits publizierte, 16S-rRNA Oligonukleotidsonde KCLZ nach Hu *et al.* (2018) ebenfalls nicht für die Unterscheidung zwischen *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* geeignet (siehe 3.1.1).

Bei der Ableitung neuer Oligonukleotidsonden scheint insbesondere die Wahl des für die Sondensequenzen zugrunde gelegten rRNA-Moleküls eine wichtige Rolle zu spielen. Die bakterielle rRNA besteht aus 5S-, 16S- und 23S-Molekülen mit einer ungefähren Größe von 120, 1.600 bzw. 3.000 Nukleotiden (Olsen *et al.* 1986). Diese Moleküle werden häufig als phylogenetische Marker verwendet, wobei 16S rRNA und 23S rRNA im Vergleich zur viel kleineren 5S rRNA häufiger verwendet werden (Ludwig *et al.* 1994). Obwohl das 23S rRNA-Molekül doppelt so lang und informativ ist und im Vergleich zum 16S rRNA-Molekül größere Insertionen und Deletionen enthält (Olsen *et al.* 1993), basiert die phylogenetische Analyse immer noch hauptsächlich auf dem Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen (Ludwig *et al.* 1994). Es wurde jedoch häufig berichtet, dass die 23S rRNA eine genauere Differenzierung ermöglicht, wie zum Beispiel zwischen *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* (Sallen *et al.* 1996). Da auch *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* derselben Gattung angehören, wurde hier ebenfalls das 23S rRNA-Molekül für das Design der artspezifischen Oligonukleotidsonden verwendet.

4.1.2 Analyse der Bindungsspezifität von ClosKluy und ClosCarb

Bereits bei früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass *C. carboxidivorans* P7 (= DSM 15243^T), *Clostridium scottologenes* ATCC 25775^T (= DSM 757^T) und *Clostridium drakei* SL1 (= DSM 12750^T) sehr nahe miteinander verwandt sind und auf 16S rRNA-Ebene eine Sequenzübereinstimmung von >99 % besitzen (Liou *et al.* 2005). Diese Beobachtung spiegelt sich so auch in den Spezifitätsanalysen mit der 23S rRNA-Gensonde ClosCarb für *C. carboxidivorans* wider. So schließt ClosCarb zwar durch insgesamt 7 Fehlpaarungen den Nachweis von *C. kluyveri* aus. Allerdings deuten die mit der ClosCarb Gensonde durchgeführten *in silico* Analysen darauf hin, dass eine unspezifische Bindung der Sonde an *C. drakei* bzw. *C. scottologenes* möglich sein könnte (3.1.3). Dies deutet auf eine hohe Sequenzähnlichkeit dieser drei Stämme auch auf 23S rRNA-Ebene hin. Die *C. kluyveri* Gensonde

ClosKluy kann hingegen aufgrund der ermittelten Fehlpaarungen zu rRNA-Sequenzen anderer Organismen aktuell als hoch spezifisch eingestuft werden, sowohl innerhalb der Clostridien, als auch innerhalb der drei Domänen (3.1.3).

Für die Validierung der nachfolgenden Hybridisierungsexperimente mit den Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb im Labor wurden bei jedem Durchgang Kontrollreaktionen durchgeführt. Zum einen konnte durch die Verwendung der allgemeinen Bakterien-Gensonde EUB338 I gezeigt werden, dass sich alle als Referenz gewählten Bakterienstämme über FISH anfärben lassen (Abbildung 3.4). Zum anderen konnte über Hybridisierungsansätze mit nicht-fluoreszierenden Sonden bewiesen werden, dass alle nachfolgend detektierten Fluoreszenzsignale spezifisch waren und nicht durch eine Autofluoreszenz der Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop verursacht wurden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt decken sich die *in silico* Analysen zur Bindungsspezifität mit den später im Labor durchgeführten Hybridisierungsexperimente mit ClosKluy bzw. ClosCarb gegenüber verschiedenen Bakterienstämmen. Auch hier kam es zu keiner unspezifischen Bindung von ClosKluy und ClosCarb unter den getesteten Bakterienstämmen (3.2.3). Allerdings waren *C. drakei* und *C. scatologenes* nicht unter den getesteten Referenzstämmen. Somit lässt sich die auf Basis der *in silico* Daten getroffene Vermutung einer möglichen Bindung von ClosCarb an diese beiden Clostridien weder bestätigen, noch ausschließen. Daher sind in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen, sowie ein erweitertes Sondendesign für die ClosCarb-Gensonde ratsam, wenn diese Sonde für andere Zwecke als die in der vorliegenden Arbeit etablierten Anwendung eingesetzt werden soll. Dies gilt insbesondere dann, wenn eine unspezifische Bindung von ClosCarb an die am engsten mit *C. carboxidivorans* verwandten 23S rRNA-Sequenzen zwingend ausgeschlossen sein muss, wie beispielsweise in Umweltproben mit verschiedenen Mitgliedern der Clostridiengruppe. Im Co-Kultur-Kontext dieser Arbeit ist hingegen, wie bereits in Abbildung 3.9 gezeigt, eine Unterscheidung zwischen *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* Zellen über eine FISH-Färbung mit ClosKluy und ClosCarb sehr gut möglich.

Alles in allem unterstreichen die hier gezeigten Spezifitätsanalysen eine potenzielle Anwendung der Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb mit den oben genannten Einschränkungen für die Identifizierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* nicht nur in Co-Kulturen, sondern auch in verschiedenen Umweltproben. Beide Sonden erweitern somit die Zahl der für Clostridien zur Verfügung stehenden gruppen- oder artspezifischen FISH-Sonden, die noch immer limitiert ist (Franks *et al.* 1998, Hu *et al.* 2018). Somit könnten ClosCarb und vor allem ClosKluy dazu beitragen, *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in Umweltproben direkt und quantitativ zu identifizieren.

4.1.3 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für ClosKluy und ClosCarb

Wie bereits von Amann *et al.* (2008) ausführlich erläutert, hängt der Erfolg von FISH-Färbungen neben der Qualität der zugrunde gelegten Sondensequenz auch von der Probenvorbereitung ab. Hierbei spielen sowohl Permeabilisierungs- als auch Fixierungstechniken eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang wird bei FISH-Experimenten routinemäßig das Denaturierungsmittel Formamid eingesetzt. Diese Chemikalie erhöht nicht nur die Zugänglichkeit der Zielstelle für die Sonde, sondern verbessert auch gleichzeitig die Stringenz der Sondenbindung an die jeweilige Zielsequenz (Haroon *et al.* 2013). Für andere FISH-Sonden wurde bereits berichtet, dass eine Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer über dem bestimmten Optimum nicht nur die Intensität spezifischer Signale drastisch reduziert, sondern gleichzeitig die unspezifische Hintergrundfluoreszenz der Proben erhöht (Manz *et al.* 1992, Hu *et al.* 2018). Ähnliches zeigte sich auch bei der Formamid-Reihe für die ClosKluy und ClosCarb Oligonukleotidsonde (Abbildung 3.3). Daher sollte so wenig Formamid wie möglich im Hybridisierungspuffer verwendet werden. Für ClosKluy und ClosCarb wurde das Optimum der Formamidkonzentration zu 30 % (v/v) bestimmt, da bei dieser Konzentration weder unspezifische Bindungen noch zu schwache spezifische Fluoreszenzsignale beobachtet werden konnten (3.2.1).

Die Permeabilisierung der Zellen ist besonders bei Gram-positiven Bakterien mit ihren starren Zellwänden erfolgsentscheidend. Diese Zellen neigen häufig zu schwachen Fluoreszenzsignalen nach der Hybridisierung, da die intrazellulären Nukleinsäuren nur begrenzt zugänglich sind (Beimfohr *et al.* 1993, Roller *et al.* 1994). Eine zusätzliche para-Formaldehyd (PFA) Fixierung der Zellen kann diesen Effekt weiter verstärken, da Zellwandkomponenten durch diese Chemikalie noch stärker reversibel vernetzt sein könnten (Beimfohr *et al.* 1993). Auch bei den Gram-positiven Zellen von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* zeigte eine vor der Hybridisierung durchgeführte Permeabilisierung mit Lysozym einen positiven Effekt auf das FISH-Färbeergebnis sowohl bei Ethanol- als auch bei PFA-fixierten Zellen (3.2.2). Allerdings war hierbei für FISH-Färbungen mit *C. kluyveri* eine stärkere enzymatische Vorbehandlung nötig als mit *C. carboxidivorans*. Solche artspezifischen Unterschiede bei der Permeabilisierung sind so auch in der Literatur beschrieben (Beimfohr *et al.* 1993). Daher empfiehlt sich vorab eine Erprobung verschiedener Permeabilisierungstechniken mit den jeweils zu färbenden Zellen.

4.1.4 Limitierung der heterotrophen Glukose Co-Kultur von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans*

C. carboxidivorans kann chemo-organotroph mit Glukose als Kohlenstoffquelle wachsen, wobei vor allem Essigsäure, Butyrat, Ethanol und Butanol als metabolische Endprodukte gebildet werden (Liou *et al.* 2005). Andererseits fermentiert *C. kluyveri* Ethanol und Acetat, während Glukose für dieses

Bakterium kein Substrat ist (Barker *et al.* 1942, Bornstein *et al.* 1948a). Um die Substratverfügbarkeit für *C. kluyveri* in der Glukose-Co-Kultur sicherzustellen, wurde *C. carboxidivorans* 8 h vor *C. kluyveri* im Medium angeimpft. Bei diesem Ansatz wurde angenommen, dass das Wachstum von *C. kluyveri* nur dann stattfindet, wenn die Glukose im Medium von *C. carboxidivorans* in kurzkettige Alkohole und Fettsäuren umgewandelt wird.

Bei der *C. kluyveri*-Monokultur, die in modifiziertem Hurst Medium mit 5,0 g/L Glukose kultiviert wurde, wurden jedoch leichtes Wachstum, sowie geringe Mengen an Butyrat und eine erstaunlich hohe Hexanoatkonzentration zum Endzeitpunkt der Fermentation im Medium gemessen (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Die Hauptkulturen wurden für dieses Experiment direkt mit 2,5 mL einer *C. kluyveri* Vorkultur beimpft, wobei das für die Vorkultur verwendete modifizierte Hurst Medium insgesamt 10 g/L Kaliumacetat und 20 mL/L Ethanol enthielt. Daher ist es wahrscheinlich, dass neben dem Hefeextrakt auch die geringen Spuren von Ethanol und Acetat im Inokulum zum schwachen Wachstum und den Endproduktkonzentrationen beigetragen haben, welche in den *C. kluyveri*-Monokulturen in einem Medium mit nur Glukose als Substrat festgestellt wurden. Der für die *C. kluyveri*-Monokulturen mit Glukose angenommene Ethanol-Acetat Substratmangel könnte zudem auch das Hexanoat in diesem Ansatz erklären, welcher aus einer vermehrten Umsetzung des RBO-Stoffwechselintermediates Butyryl-CoA zu Hexanoyl-CoA und nachfolgend zu Hexanoat resultiert haben könnte (Seedorf *et al.* 2008). Daher erscheint für diesen Co-Kulturansatz die Butyratbildung besser als Marker für die Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* geeignet zu sein als das Hexanoat.

Dennoch war der Ansatz einer Co-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in kleinem Maßstab mit Glukose nicht optimal. So zeigte *C. carboxidivorans* bei der Hybridisierung mit der CloCarb-Sonde nach 24 h morphologische Veränderungen, sowie schwache und ungleichmäßige Fluoreszenzsignale (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Vitalität der *C. carboxidivorans* Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits stark abgenommen hatte.

4.1.5 Praktische Anwendung der FISH-Sonden im Co-Kulturkontext

Insgesamt deuteten die Vorversuche zu den neuen 23S rRNA Oligonukleotidsonden darauf hin, dass es möglich ist, verschiedene Co-Kulturproben von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* über FISH zu färben. Die daraus resultierende Fluoreszenzmarkierung ermöglichte im Anschluss eine zuverlässige Unterscheidung zwischen den Zellen dieser beiden Clostridienarten (3.3).

Eine mögliche Limitierung der FISH-Färbung im Co-Kulturkontext besteht in der Notwendigkeit von möglichst frisch entnommenen Proben. Nur so kann sichergestellt werden, dass die Zellen intakt sind und ausreichend ribosomale Zielmoleküle für die Hybridisierung besitzen (Hoshino *et al.* 2008). Zwar können Zellen vorab durch PFA fixiert werden, wodurch Proteine und DNA quervernetzt werden

(Hayat 2000), was eine längere Lagerung der Proben ermöglicht. Dadurch wird allerdings auch eine Homogenisierung der Zellen erschwert, was einen negativen Einfluss auf nachfolgende Anwendungen haben kann (Yilmaz *et al.* 2010). Daher wurde bei der im Anschluss für die Co-Kultur von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* weiterentwickelten *in solution* FISH-Färbung mit ClosKluy und ClosCarb entnommene Proben lediglich mit Ethanol fixiert. Daraufhin war es möglich, die Zellzahlen von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* in autotrophen Co-Kulturproben über eine im Anschluss an die FISH durchgeführte Durchflusszytometrie zu bestimmen (Bäumler *et al.* 2022).

Schwache Fluoreszenzsignale nach der Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden stellen nicht nur ein Problem bei Zellen mit geringen intrazellulären Ribosomenkonzentrationen dar (Pernthaler *et al.* 2002b). Auch die Art der verwendeten Sonde (gruppen- oder artspezifisch) sowie das Zielmolekül (16S oder 23S rRNA) sind für starke und spezifische FISH-Signale entscheidend. In diesem Zusammenhang sind vor allem die in Onlinedatenbanken wie „probeBase“ (Greuter *et al.* 2016) hinterlegten, gruppenspezifische Sonden mit Vorsicht zu genießen. Hierbei ist insbesondere zu beachten, dass viele der verfügbaren Sonden teilweise vor bereits vor über 20 Jahren publiziert worden sind und damit auf lediglich einem Bruchteil der aktuell zur Verfügung stehenden rRNA-Sequenzen basieren (Amann *et al.* 2008). Daher sollte nach Möglichkeit, wie im Rahmen dieser Arbeit, auf Softwareanwendungen wie ARB und aktuelle rRNA-Datenbanken wie SILVA zurückgegriffen werden. Somit können für die jeweiligen Anwendungen und Organismen passende, artspezifische Oligonukleotidsondensequenzen abgeleitet werden. Alternativ dazu könnten in diesem Zusammenhang Fluoreszenzsignale auch über andere FISH-Methoden noch weiter verbessert werden, z.B. „Double Labeling of Oligonucleotide Probes“ (=DOPE) FISH (Stoecker *et al.* 2010).

4.2 TM 4040 als neue festes Medium für *C. kluyveri*

4.2.1 Anforderungen an das neue feste *C. kluyveri* Medium

Für die Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen stehen neben den klassischen Petrischalen, welche in speziellen Anaerob-Behältern bebrütet werden müssen, auch die „Roll Tube“ Technik (Hungate 1969) zur Verfügung. Die „Roll Tube“ Methode kam auch bei der ursprünglichen Isolierung von *C. kluyveri* zum Einsatz (Barker *et al.* 1942). Um die genetische Arbeit mit *C. kluyveri* zukünftig möglichst unkompliziert zu gestalten, sollten jedoch bevorzugt Petrischalen zum Einsatz kommen, da bei diesen die Kolonien anders als bei den „Roll Tubes“ frei auf der Oberfläche zugänglich sind. Daneben sollten zudem ein geeignetes Puffersystem, sowie eine optimierte Substratzusammensetzung die Koloniebildung von *C. kluyveri* auf der Agaroberfläche positiv beeinflussen.

4.2.2 Die wichtige Rolle von CO₂ für das Wachstum von *C. kluuyveri*

Bereits 1948 wurde postuliert, dass CO₂ essentiell für das Wachstum von *C. kluuyveri* ist (Bornstein *et al.* 1948a). Über den Einsatz von radioaktiv markiertem CO₂ (C¹⁴O₂) konnte einige Jahre später gezeigt werden, dass der in CO₂ gebundene Kohlenstoff für dieses Bakterium ein wichtiger Ausgangsstoff für die Synthese von mindestens 17 Aminosäuren ist. Zudem ließen sich im Rahmen derselben Studie mehr als 25 % des gesamten zellulären Kohlenstoffs in *C. kluuyveri* Zellen auf fixiertes CO₂ zurückführen. (Tomlinson *et al.* 1954). CO₂ ist somit ein wichtiger Bestandteil des *C. kluuyveri* Metabolismus.

Die Bedeutung von CO₂ für die Vitalität von *C. kluuyveri* wurde auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit erneut veranschaulicht. Zwar war es möglich, mehrere Subkulturen von *C. kluuyveri* in flüssigem TM 4040 Medium ohne CO₂ zu kultivieren. Diese zeigten allerdings nach einiger Zeit (ca. 10. Subkultur) eine reduzierte Vitalität von *C. kluuyveri* mit deutlich verzögertem Wachstum und morphologischen Veränderungen der Zellen. Dies könnte durch den CO₂-Mangel hervorgerufen worden sein, da sich das Bakterium bei erneuter Überführung in CO₂-gepuffertes DSMZ-52 Medium wieder vollständig erholen konnte. Dieser Effekt war später bei den sukzessiven Ausstrichen auf TM 4040 Agarplatten trotz Supplementierung mit Bicarbonat noch deutlicher und bereits ab der fünften Überimpfung sichtbar (nicht gezeigt). Ein Grund könnte hierfür eine schlechtere Verfügbarkeit sowohl von CO₂ aus Bicarbonat, als auch von Ethanol im festen Medium sein, da beide Substanzen in den ca. 60 °C warmen Agar gegeben werden. Beim Natriumhydrogencarbonat könnte unter diesen Temperaturen die Reaktion zu Natriumcarbonat begünstigt sein, welche zu einem Verlust von gebundenem CO₂ führt. In einem offenen System steht dieses gelöste CO₂ danach nicht mehr als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, was sich, ähnlich wie beim Flüssigmedium, negativ auf das Wachstum von *C. kluuyveri* auswirken könnte. Dieser kann vermutlich auch nicht durch die Atmosphäre im Anaerobiertopf ausgeglichen werden, da das AnaeroGen 2,5 L Päckchen laut dem Hersteller Oxoid (Thermo Fisher) lediglich einen CO₂-Gehalt im Topf zwischen 9-13 % (v/v) erzeugt.

4.2.3 Auswahl eines geeigneten Puffersystems für das Festmedium

Das Carbonat-Puffersystem dient im synthetischen *C. kluuyveri* Flüssigmedium nicht nur der Stabilisierung des pH-Wertes, sondern das dort gebundene CO₂ stellt zusätzlich auch, wie bereits erläutert, eine wichtige Kohlenstoffquelle für *C. kluuyveri* dar. Der pKs Wert von Carbonat liegt mit 10,25 deutlich im alkalischen Bereich (Good *et al.* 1972). Der pH-Bereich für *C. kluuyveri* liegt hingegen zwischen 6,0 – 7,5 mit einem pH-Optimum von 6,8 (Barker *et al.* 1942). Da der pKs von Bicarbonat bei 6,3 liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits zu Beginn der 9,4 mM Na₂CO₃ Puffer im DSMZ-52 Medium durch 22 mM NaHCO₃ ersetzt (vgl. Tabelle 2.15). Allerdings setzt der Bicarbonatpuffer ein

geschlossenes System voraus, damit das CO₂ nicht entweichen kann (Good *et al.* 1972). Im Gegensatz zu den Hungate-Röhrchen ist das Überschichten von Agarplatten während ihrer Herstellung nicht praktikabel. Dies wäre jedoch eine Grundvoraussetzung für die Verwendung eines Bicarbonatpuffers im festen Medium gewesen. Eine mögliche Idee zur Umgehung dieses Problems bestand darin, das bisherige Bicarbonat-Puffersystem mit einem Zwitterionenpuffer zu kombinieren. Hierbei sollte der Zwitterionenpuffer den pH-Wert zusätzlich stabilisieren, sodass das Bicarbonat lediglich als zusätzliche CO₂-Quelle für *C. kluyveri* zur Verfügung steht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der Zwitterionenpuffer MOPS oder MES eine Alternative zum (Bi-)Carbonat-Puffersystem für *C. kluyveri* ist (3.4.1). In Flüssigmedium mit Zwitterionen-Puffersystem konnte *C. kluyveri* bei identischer Substratmenge mindestens genauso gut wachsen wie im Medium mit Bicarbonat (Abbildung 3.10). Auch wenn ursprünglich für die Kultivierung von *C. kluyveri* in flüssigem Tanner Medium MES als Puffer zum Einsatz gekommen war (Bielzer 2019), konnte beim festen Tanner oder Hurst Medium mit Ethanol, Acetat und Succinat kaum ein Unterschied zwischen den Kolonien auf Platten mit MES- oder MOPS-Puffer festgestellt werden (nicht gezeigt). Dies ist erstaunlich, da theoretisch aufgrund der Pufferbereiche MES mit 5,2-7,1 besser für *C. kluyveri* geeignet sein sollte als MOPS mit 6,5-7,9 (Barker *et al.* 1942, Good *et al.* 1972). Allerdings ließ sich der pH-Wert beim MOPS-gepuffertem Tanner Medium leichter auf den Ausgangs-pH von 6,8 für *C. kluyveri* einstellen, vermutlich da der pKs Wert von MOPS mit 7,15 näher am Ausgangs-pH liegt als MES mit 6,15. Daher wurde sowohl für das flüssige, als auch für das feste Tanner Medium MOPS als Puffer verwendet.

4.2.4 Eine optimierte Substratzusammensetzung für das *C. kluyveri* Festmedium

Neben dem Puffersystem sollte auch die Substratzusammensetzung für das *C. kluyveri* Festmedium optimiert werden. Ziel war es hierbei das für *C. kluyveri* charakteristische langsame Wachstum zu beschleunigen. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass *C. kluyveri* dazu in der Lage ist, genug Biomasse für das Ausbilden von Einzelkolonien auf der Agaroberfläche zu produzieren. Wie bereits erläutert, kommen als Substrate für *C. kluyveri* lediglich Alkohole und organische Säuren infrage.

Bei der Supplementierung von warmen Agar könnte sich unter Umständen ein Problem aufgrund der Siedepunkte der jeweiligen Alkohole ergeben. Für Ethanol liegt der Siedepunkt beispielsweise mit 78 °C relativ nahe bei der Temperatur des flüssigen Agars (ca. 60 °C). Folglich muss angenommen werden, dass ein gewisser Teil des Ethanols bereits bei der Agarherstellung verdampft und somit nicht mehr für die Synthese von Acetyl-CoA von *C. kluyveri* zur Verfügung steht (Kapitel 1.3.2). Eine Alternative wäre hierbei eine Substitution von Ethanol durch Propanol, da dieser Alkohol im Vergleich zu Ethanol einen höheren Siedepunkt besitzt. Die Datenlage zu diesem Substrat war hierzu

jedoch nicht eindeutig, da es trotz negativer Resultate von Bornstein *et al.* (1948a) später durch Kenealy *et al.* (1985) gelang, Wachstum von *C. kluyveri* auf Propanol und Acetat nachzuweisen. Im flüssigen Tanner Medium konnte *C. kluyveri* hingegen erneut nicht auf den Substraten Propanol und Acetat wachsen (Masterarbeit Lisa Pütthoff, TU München, 2021, nicht veröffentlicht). Theoretisch sollte die Aldehyd Dehydrogenase von *C. kluyveri* neben Ethanol auch Butanol und Propanol als Substrat verwerten können (Burton *et al.* 1953). Am wahrscheinlichsten war beim erwähnten Wachstumsversuch in der Masterarbeit von Lisa Pütthoff die für das Tanner Medium gewählte Propanolmenge von 150 mM für *C. kluyveri* deutlich zu hoch. Für die Experimente von Kenealy *et al.* (1985) wurden lediglich 30 mM Propanol eingesetzt. Vermutlich haben also bereits geringe Mengen Propanol einen inhibitorischen Effekt auf *C. kluyveri*, wie bereits von Bornstein *et al.* (1948a) vermutet. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse zum Propanol wurde entschieden, im festen *C. kluyveri* Medium auch weiterhin nur Ethanol als Substrat zu verwenden. Die erfolgreiche Verwendung von Ethanol in TM 4040 Agarplatten für *C. kluyveri* (Kapitel 3.4) deuten zudem darauf hin, dass das Verdampfen des Ethanols während der Zugabe zum warmen Agar insgesamt nicht entscheidend ist. Dennoch könnte für zukünftige Experimente die Ethanolmenge des TM 4040 Agars noch etwas erhöht werden, zum Beispiel auf 343 mM wie im DSMZ-52 Medium (Tabelle 2.15).

Wie bereits von Bornstein *et al.* (1948a) postuliert, konnte *C. kluyveri* auch im Tanner Medium mit Ethanol auf den organischen Säuren Butyrat und Propionat wachsen (Masterarbeit Lisa Pütthoff, TU München, 2021, nicht veröffentlicht). Allerdings trug die zusätzliche Anwesenheit von Butyrat oder Propionat hierbei nicht zu einem verbesserten Wachstum von *C. kluyveri* bei. Daher wurde als weitere Alternative zusätzlich noch die organische Säure Succinat getestet. Dieser Ansatz erschien vielversprechend, da bereits Kenealy *et al.* (1985) gezeigt hatten, dass *C. kluyveri* in Anwesenheit von Succinat mehr Zellen pro Mol Ethanol bildet als mit Acetat. Dieser Effekt ging einher mit einem erhöhtem Ethanolverbrauch, sowie einer verstärkten Acetatproduktion in diesen Kulturen (Kenealy *et al.* 1985). Auch im Tanner Medium zeigte *C. kluyveri* insgesamt höhere OD₆₀₀-Werte in Anwesenheit von Succinat im Medium (Abbildung 3.10), welches auf eine höhere Biomasseproduktion in diesen Medien mit dieser organischen Säure hindeutet. Diese erhöhte Biomasseproduktion auf Succinat war ferner dazu ausreichend, um auf Basis von Ethanol, Acetat, Succinat und NaHCO₃ ein festes Medium zu etablieren, auf welchem *C. kluyveri* Kolonien bilden kann (Abbildung 3.11). Hierbei waren die gewonnenen *C. kluyveri* Einzelkolonien ausreichend groß, um im Folgenden genetisch mit diesem Bakterium arbeiten zu können (3.7). Interessanterweise war hierbei das Wachstum von *C. kluyveri* am besten, wenn neben Ethanol und Succinat zusätzlich auch Acetat im Medium vorhanden war. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zum für *C. kluyveri* vermuteten Succinat-Stoffwechsel, bei welchem es zu einer vermehrten Produktion von Acetat kommt. Zunächst werden zwei Moleküle Succinat zu vier Molekülen Acetat umgesetzt, wodurch zwar

kein ATP gebildet, aber zwei Reduktionsäquivalente verbraucht werden. Diese erlauben im Anschluss die Oxidation eines Ethanol-Moleküls zu einem weiterem Acetat-Molekül, wodurch ein ATP freigesetzt wird. Damit trägt das Succinat nur indirekt zur ATP-Produktion bei, indem es als Elektronenakzeptor fungiert (Kenealy *et al.* 1985, Wolff *et al.* 1993). Theoretisch wäre damit in Anwesenheit von Succinat eine zusätzliche Supplementierung des Tanner Mediums mit Acetat für die genetische Arbeit nicht zwingend nötig, da das Acetat in ausreichenden Mengen von *C. kluyveri* selbst aus Succinat gebildet werden sollte. Auf Basis der gewonnenen Daten lässt sich jedoch nur schwer abschätzen, inwieweit sich der *C. kluyveri* Stoffwechsel langfristig in Abwesenheit von Acetat möglicherweise verändert. Um sicherzustellen, dass zukünftig generierte *C. kluyveri* Mutanten auch weiterhin dazu in der Lage sind, auf den von *C. carboxidivorans* produzierten Produkten Ethanol und Acetat wachsen zu können, ist die zusätzliche Verwendung von Acetat neben Ethanol und Succinat in den Festmedien für die genetische Arbeit durchaus sinnvoll. Die auf TM 4040 gewonnenen *C. kluyveri* Transkonjuganten konnten bisher alle problemlos in dem für die Co-Kultur mit *C. carboxidivorans* verwendeten Hurst Medium (Tabelle 2.17) mit Ethanol und Acetat anwachsen (nicht gezeigt).

4.3 Vorbereitungen für die genetische Arbeit mit *C. kluyveri*

4.3.1 Antibiotikasensitivität von *C. kluyveri*

Bei Clostridien können Transkonjuganten über die Antibiotika-Resistenzkassetten *catP*, *ermB*, *aad9* und *tetA* identifiziert werden. Die Kassetten ermöglichen eine Selektion über die Antibiotika Thiamphenicol (Tm), Erythromycin (Em), Spectinomycin (Sp) oder Tetracyclin (Tet) und wurden bereits erfolgreich in zahlreichen Clostridien verwendet (Heap *et al.* 2009).

Insgesamt konnte bei den vier getesteten Antibiotika mit *C. kluyveri* lediglich für Sp keine Minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt werden (Tabelle 3.2). Daher liegt die Vermutung nahe, dass *C. kluyveri*, ähnlich wie *Clostridium acetobutylicum* DSM 792^T, Sp-resistent (Sp^R) ist (Heap *et al.* 2009). Eine mögliche Erklärung für die Sp^R von *C. kluyveri* liefert das Gen *CKL_2614*, welches laut UniProt vermutlich für eine Streptomycin 3''-Adenylyltransferase (A5N0I0_CLOK5) codiert. Dieses potenzielle Sp^R-Gen aus *C. kluyveri* wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie (TUM School of Life Science, Freising, Deutschland) im Rahmen des SynConso4Butanol Projekts näher untersucht (persönliche Kommunikation Aline Schöllkopf). Hierbei konnte über episomale Expression in *E. coli* gezeigt werden, dass das Gen *CKL_2614* aus *C. kluyveri* eine Sp^R hervorruft, welche mit der des Gens *aad9* aus *Enterococcus faecalis* vergleichbar ist (Masterarbeit Cristina González Rivero, TU München, 2022, nicht veröffentlicht). Folglich ist es sehr wahrscheinlich, dass die hier beobachtete Sp^R von *C. kluyveri* DSM 555^T auf das Gen *CKL_2614* zurückzuführen ist. Aufgrund seines clostridialen Ursprungs könnte

das Gen *CKL_2614* potenziell gut als Sp^R-Resistenzmarker für den Einsatz in neuen *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmiden geeignet sein.

Für die drei übrigen Antibiotika konnten hingegen MHK-Werte in flüssigem und festem Medium ermittelt werden (Tabelle 3.2). Somit ist theoretisch ein Einsatz von Tm, Em oder Tet bei der genetischen Arbeit mit *C. kluyveri* möglich. Allerdings sollte hierbei beachtet werden, dass Tet und Em als hitzeinstabil eingestuft werden (Traub *et al.* 1995), wodurch die Wirkung dieser Antibiotika bei deren Einsatz im Festmedium verringert sein könnte. Dies ist für Tm als hitzestabile Substanz nicht der Fall (Traub *et al.* 1995, Franje *et al.* 2010). Daneben wurde für die wachstumshemmende Wirkung von Em auf *C. kluyveri* starke Schwankungen innerhalb der unabhängigen Wiederholungen beobachtet (Abbildung 3.12), wodurch eine Selektion von Transkonjuganten bei Verwendung dieses Antibiotikums weniger verlässlich sein könnte als mit Tm oder Tet.

Da zudem bereits für die *in vivo* Methylierungsplasmide eine Tet^R-Kassette aus pACYC184 zum Einsatz kommt (Tabelle 2.3), wurde als Selektionsmarker für die genetische Arbeit mit *C. kluyveri* in nachfolgenden Experimenten mit der Tm^R-Kassette *catP* aus *C. perfringens* gearbeitet. Diese scheint, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, auch in *C. kluyveri* gut zu funktionieren. Nach einer erfolgreichen Übertragung von pMTL83151 mit *catP* konnte für *C. kluyveri* Transkonjuganten eine 50-fach höhere Toleranz gegenüber Tm im Vergleich zum Wildtypstamm beobachtet werden (3.7.2). Da die für Tm bestimmten MHK-Werte für *C. kluyveri* im Festmedium höher liegen als im Flüssigmedium (Tabelle 3.2), sollte für die Selektion nach Transkonjuganten immer eine Arbeitskonzentration von mindestens 10 µg/mL Tm verwendet werden. Sie liegt damit nur etwas niedriger als die nach Heap *et al.* (2009) bestimmte Arbeitskonzentration von 15 µg/mL Tm für *C. acetobutylicum* (DSM 792^T), *Clostridium difficile* (R20291) und *Clostridium botulinum* (ATCC 3592).

4.3.2 Eliminierung von *E. coli* nach der Konjugation

Nicht nur für die Selektion nach Transkonjuganten, sondern auch für das Entfernen von *E. coli* nach der Konjugation kommen Antibiotika zum Einsatz. Möglich ist hier beispielsweise der Einsatz von Polymyxin B (= Colistin), welches einen starken wachstumshemmenden Effekt auf Gram-negative Bakterien wie *E. coli* besitzt (Schwartz *et al.* 1959, Wright *et al.* 1959). Jedoch könnten diese gegen *E. coli* eingesetzten Antibiotika unter Umständen auch zusätzlich einen negativen Selektionsdruck auf den Gram-positiven Akzeptorstamm ausüben und somit die Gewinnung von Transkonjuganten erschweren.

Daher bestand zunächst die Idee, das Wachstum von *E. coli* auf den Selektionsplatten durch einen Mangel an Kohlenstoffquellen zu verhindern. Dies erschien vielversprechend, da in den TM 4040 Selektivplatten (2.3.2) kein Zucker eingesetzt werden muss und der Hefeextrakt weggelassen wurde.

Dennoch konnte auf diesem Medium trotz Verwendung eines hochreinen Agars ein schwaches Wachstum von *E. coli* unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies lässt sich am wahrscheinlichsten auf die im Medium enthaltenen 1 g/L Casaminsäuren (CAS) zurückzuführen, einer undefinierten Mischung von Aminosäuren und Oligopeptiden aus verdautem Milchprotein (Wang *et al.* 2013). Da aber gleichzeitig gezeigt werden konnte, dass das Wachstum von *C. kluyveri* auf TM 4040 Festmedium bis zu einer Konzentration von 40 µg/mL Colistin nahezu uneingeschränkt möglich ist (nicht gezeigt), wurde entschieden, in den TM 4040 Selektivplatten zukünftig Colistin gegen *E. coli* einzusetzen. Da *E. coli* auf TM 4040 Agar mit 1 g/L CAS bereits stark im Wachstum eingeschränkt war, konnte die Arbeitskonzentration für Colistin zu 10 µg/mL festgelegt werden. Zudem ist davon auszugehen, dass das Colistin in den Selektionsplatten keinen negativen Einfluss auf das Wachstum von *C. kluyveri* haben sollte.

4.3.3 Etablierung eines Konjugationsprotokolls für *C. kluyveri*

Bei der Übertragung der auf *in vivo* Methylierung basierenden Konjugation nach Lesiak *et al.* (2014) von *C. saccharobutylicum* auf *C. kluyveri* wurden einige größere Änderungen am ursprünglichen Protokoll vorgenommen (3.7.1). Dazu zählt, wie in Abschnitt 4.4 näher beleuchtet, die Konstruktion von an die RM-Systeme von *C. kluyveri* angepassten Methylierungsplasmiden. Daneben wurden aber auch noch weitere Änderungen vorgenommen, insbesondere im Hinblick auf die Medienzusammensetzung und Inkubationszeiten. Insgesamt scheint hierbei vor allem der RBO-Stoffwechsel von *C. kluyveri* eine zentrale Rolle zu spielen, welcher sich vom Stoffwechsel der solventogenen Clostridien stark unterscheidet.

Eine Besonderheit des sekundären Gärers *C. kluyveri* besteht darin, dass das Bakterium nicht dazu in der Lage ist, Zucker als Energie- und C-Quelle zu verwenden (Barker *et al.* 1942, Bornstein *et al.* 1948a). Folglich sind im TM 4040 Festmedium für *C. kluyveri* lediglich Hefeextrakt, sowie organische Säuren und Alkohole als Kohlenstoffquellen verfügbar (3.4.3). Im Gegensatz dazu enthält das modifizierte 2x YTG-Medium für den solventogenen *C. saccharobutylicum* unter anderem neben Hefeextrakt zusätzlich auch 42 mM Glukose (Lesiak *et al.* 2014). Diese Glukose kann anaerob sowohl von *C. saccharobutylicum* saccharolytisch (Keis *et al.* 2001), als auch von *E. coli* fermentativ (Morrison 1953) zur Energiegewinnung genutzt werden. Für die Konjugation mit *C. kluyveri* wurde zunächst angenommen, dass eine Erhöhung der Hefeextraktkonzentration im TM 4040 Medium von 0,1 % auf 5,0 % (w/v) ausreichend sein könnte, um nicht nur das anaerobe Wachstum von *E. coli*, sondern auch eine Plasmidübertragung durch Konjugation zu ermöglichen. Diese Theorie konnte so jedoch nicht bestätigt werden. Trotz erhöhter Hefeextraktmenge im TM 4040 Medium konnten im Anschluss keine *C. kluyveri* Transkonjuganten gewonnen werden, obwohl als Donorstamm *E. coli* TOP10 mit dem Methylierungsplasmid pCKL_2671 und dem Shuttleplasmid pMTL82151 verwendet wurde

(Masterarbeit Lisa Pütthoff, TU München, 2021, nicht veröffentlicht). Erst durch die zusätzliche Supplementierung der TM 4040 Matingplatten mit 2,5 mM Glukose konnten, unter denselben Bedingungen wie zuvor, *C. kluyveri* Transkonjuganten gewonnen werden (3.7.2). Auch 2,5 mM Fruktose zeigten hierbei den gleichen positiven Effekt auf die Transkonjugation von *C. kluyveri* wie 2,5 mM Glukose (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Zucker eine wichtige Rolle bei der anaeroben Konjugation von *E. coli* spielen könnte, beispielsweise in Form einer Energiequelle für das Ausbilden der für die Konjugation benötigten Pili. Auf Basis der gewonnenen Daten scheinen hierfür bereits 2,5 mM ausreichend zu sein.

Zudem kann der sekundäre Gärer *C. kluyveri* über den RBO-Stoffwechsel (Abbildung 1.1) nur maximal 2,5 ATP pro Durchgang generieren. Ein wichtiges Intermediat für die ATP-Gewinnung ist hierbei Acetyl-CoA, welches über Oxidation aus Ethanol generiert wird (Seedorf *et al.* 2008, Candry *et al.* 2018). Zum einen kann daher davon ausgegangen werden, dass die geringe ATP-Ausbeute über RBO die vergleichsweise langsame Biomasseproduktion von *C. kluyveri* auch auf Platten mit Ethanol, Acetat und Succinat bedingt. Zum anderen muss *C. kluyveri* nach der Plasmidtranskonjugation auf den Selektionsplatten zusätzlich eine Chloramphenicol Acetyltransferase (*catP*) aus *C. perfringens* exprimieren. Dieses für die Thiamphenicolresistenz notwendige Protein benötigt für seine Entgiftungsreaktion eine Acetylgruppe (Shaw 1967) und konkurriert damit um den für die ATP-Synthese benötigten Acetyl-CoA-Pool. Zusätzlich wurde für *C. kluyveri* eine extrem hohe Sensitivität gegenüber Thiamphenicol mit 0,5 µg/mL bestimmt (Tabelle 3.2). Unter der Annahme, dass in Anwesenheit von Thiamphenicol folglich noch weniger Acetyl-CoA für die ATP-Synthese zur Verfügung steht als unter normalen Bedingungen, liefert dies eine plausible Erklärung für das deutlich verzögerte Wachstum von Thiamphenicol-resistenten *C. kluyveri* Transkonjuganten auf TM 4040 Selektivplatten mit durchschnittlich 11 Tagen (3.7.2).

4.4 In vivo Methylierungssystem zur Überwindung der RM in *C. kluyveri*

4.4.1 Charakterisierung der potenziellen RM-Systeme in *C. kluyveri* DSM 555^T

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige neue Erkenntnisse über die Restriktions-/Modifikations-(RM-) Systeme von *C. kluyveri* gewonnen werden. Diese Informationen waren insbesondere im Hinblick auf die Transformation des *C. kluyveri* Wiltypstamms wichtig.

Insgesamt wurden über die Webanwendung REBASE 21 potenzielle RM-assoziierte Gene im Genom von *C. kluyveri* identifiziert (Tabelle 6.6). Im Allgemeinen beinhalten bakterielle RM-Systeme zwei intrazelluläre Enzyme, die antagonistisch zueinander wirken. Dies ist zum einen eine Endodeoxyribonuklease (REase) und zum anderen eine DNA-Methyltransferase (MTase). Beide

interagieren mit ein und derselben Nukleotidsequenz (Wilson *et al.* 1991). Bei den potenziellen RM-assoziierten Genen im Genom von *C. kluyveri* war jedoch die Mehrheit der Gene einzeln im Genom positioniert und als putative MTasen ohne zugehörige REase-Funktion annotiert (Abbildung 3.13). Dies kommt in Bakterien zwar nur sehr selten vor, deutet aber in diesem Zusammenhang häufig darauf hin, dass diese für die Restriktion von Fremd-DNA nur eine untergeordnete Rolle spielen (Wilson *et al.* 1991). Möglicherweise handelt es sich bei diesen einzelständigen MTasen aber auch um fehlerhafte bioinformatische Annotationen über REBASE.

Für die *in vivo* Methylierung lag daher der Fokus auf den drei „vollständigen“ RM-System Gencluster von *C. kluyveri* mit insgesamt 8 Genen (Abbildung 3.14). Für diese Gene war, wenn überhaupt, maximal eine Information über die potenzielle Proteinfunktion auf Basis von Homologie verfügbar (UniProt, Stand: 01/2023). Aus dem Einsatz der putativen MTase-Gene für die *in vivo* Methylierung konnten nun jedoch neue Erkenntnisse über eine mögliche Funktionsweise der drei potenziellen *C. kluyveri* RM-Systeme gewonnen werden.

Interessanterweise waren zum potenziellen Typ-I RM-System von *C. kluyveri* in REBASE zwar Gene für eine Spezifitäts- (S) (*CKL_2595*) und eine Restriktions- (R) (*CKL_2596*), aber nicht für eine Modifikationsuntereinheit (M) annotiert (3.6.1). Dies wäre sehr ungewöhnlich für ein Typ-I RM-System, da dort normalerweise M- und S-Gen gemeinsam in einem Cluster liegen (Wilson *et al.* 1991) und beide später ohne die R-Untereinheit eine ATP-unabhängige MTase bilden (Suri *et al.* 1984). Bei genauerer Betrachtung des Gen-Lokus fiel jedoch auf, dass sich stromabwärts vom R-Gen am Locus *CKL_2597* ein Gen für eine putative Methylaseuntereinheit befindet. Das R-Gen würde damit in diesem Cluster M- und S-Gen voneinander separieren. Diese ungewöhnliche Anordnung wäre eine Erklärung dafür, warum das M-Gen vom REBASE Algorithmus nicht erfasst wurde, da dieser für Typ-I RM-Systeme vermutlich nach einem M-S-Komplex im Genom sucht. Am wahrscheinlichsten ist, dass es sich bei diesem potenziellen RM-System von *C. kluyveri* um ein falsch annotiertes oder unvollständiges Typ-I System handelt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Transkonjugationsexperimente über *in vivo* Methylierung mit *C. kluyveri*, die insgesamt auf das Typ-II RM-System als wichtigste Transformationsbarriere hindeuten (3.7).

Bakterielle RM-Systeme vom Typ-II sind zwar weniger komplex im Vergleich zu Typ-I oder III, aber dennoch unter Bakterien weit verbreitet (Wilson 1991). Das im Genom von *C. kluyveri* identifizierte, potenzielle Typ-II RM-System beinhaltet neben der putativen REase *CKL_2670* und der korrespondierenden MTase *CKL_2671* auch ein dazugehöriges Regulatorprotein (*CKL_2669*) (Abbildung 3.14). Hierbei weist die Sequenz von *CKL_2671* eine ~90%ige Ähnlichkeit zur Cytosin-spezifischen Typ-II MTase *M.BsuFI* aus *Bacillus subtilis* auf. Für diese wurde bereits auf Proteinebene nachgewiesen, dass es bei der Erkennungssequenz 5'-CCGG das C₁-Molekül methyliert (Walter *et al.*

1990). Für die potenzielle MTase *CKL_2671* konnte im ZFE beobachtet werden, dass Plasmide nach vorausgegangener Anwesenheit dieses Gens in *E. coli* im Anschluss nicht mehr an der Erkennungssequenz 5'-CCGG von der REase *HpaII* geschnitten werden konnten (3.6.3). Dies würde sich nur dann erklären lassen, wenn *CKL_2671* tatsächlich MTase Aktivität besitzt und dadurch eine Restriktion des Plasmids an allen vorhandenen CCGG-Stellen verhindern kann. Da von Typ-II RM-Systemen sehr häufig Isoschizomere in verschiedenen Organismen gefunden werden können (Wilson *et al.* 1991), ist *CKL_2671* sehr wahrscheinlich unter anderem neben *HpaII* eine weitere isoschizomere MTase mit der Erkennungssequenz 5'-CCGG.

Eine Besonderheit der Typ-III RM-Systeme ist die Bifunktionalität der M-Untereinheit, welche allein als MTase fungiert, aber zusammen als Heterodimer mit der R-Untereinheit aber auch REase Aktivität besitzt. Gleichzeitig sind nur wenige Erkennungssequenzen bei diesen RM-Systemen bekannt (Wilson *et al.* 1991). Bei *C. kluyveri* konnte für die potenzielle MTase *CKL_3239* eine Ähnlichkeit zu einer Domäne der M-Untereinheit des Typ-III RM-Systems *EcoP15I* aus *E. coli* gefunden werden (Pfam T3RM_EcoP15I_C). Eine mögliche Erkennungssequenz des potenziellen Typ-III RM-Systems in *C. kluyveri* könnte daher ebenfalls wie für die *EcoP15I* Restriktionsendonuklease 5'-CAGCAG sein (Meisel *et al.* 1992, Wyszomirski *et al.* 2012). Diese Erkennungssequenz ist beispielsweise in pMTL82151 sechs Mal vorhanden. Im *C. kluyveri* ZFE Assay wurde in Anwesenheit von *CKL_3239* lediglich eine zusätzliche längere Bande im Vergleich zum Ansatz ohne zusätzliches Methyltransferase-Gen beobachtet (Abbildung 3.16). Unter der Annahme, dass für das Typ-III RM-System zwei Erkennungssequenzen in inverser Orientierung zueinander vorhanden sein müssen (Meisel *et al.* 1992), was in dieser Art und Weise in pMTL82151 einmal vorkommt, wäre die Erkennungssequenz 5'-CAGCAG für das *C. kluyveri* Typ-III RM-System eine mögliche Erklärung für das leicht veränderte Bandenmuster im ZFE Assay durch eine Methylierung an dieser Schnittstelle.

4.4.2 Plasmidübertragung mittels *in vivo* Methylierung

Es ist bereits seit einigen Jahrzehnten bekannt, dass die Aktivität von Restriktionsendonukleasen (REase) eine effektive Übertragung von Plasmid-DNA in Akzeptorstämme verhindern kann. Ein prominentes Beispiel ist hierfür die Typ-II REase *Cac824I* aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Mermelstein *et al.* 1992, Mermelstein *et al.* 1993). In diesem Zusammenhang bietet die *in vivo* Methylierung eine einfache Möglichkeit zur Verbesserung der Transformationseffizienz. Eine wichtige Voraussetzung ist hierfür, dass zu den REasen des jeweiligen Stammes passende Methyltransferase-Gene in *E. coli* exprimiert werden können. Nachdem die *in vivo* Methylierung bereits 1991 in *Xanthomonas campestris* erfolgreich war, fand sie nachfolgend unter anderem auch Anwendung bei der genetischen Arbeit mit Gram-positiven Anaerobiern wie *C. acetobutylicum* und *C. saccarobutylicum* (De Feyter *et al.* 1991, Mermelstein *et al.* 1993, Lesiak *et al.* 2014). Es lag also

nahe, diese Methode auch zur Überwindung der RM-Systeme in *C. kluyveri* anzuwenden. Im Gegensatz zur Konjugation, bei welchem wie in Kapitel 3.7.1 näher ausgeführt einige Anpassungen nötig waren, ließ sich die *in vivo* Methylierung zügig und nahezu problemlos von *C. saccharobutylicum* auf *C. kluyveri* übertragen.

Eine große Hilfe war in diesem Zusammenhang das Assay mit einem zellfreien Extrakt (ZFE), mit dessen Ergebnissen nicht nur Rückschlüsse auf die potenziellen RM-Systeme in *C. kluyveri* gezogen werden konnten (3.6.3). Sondern es war außerdem möglich, direkt aus mehreren Kandidaten pCKL_2671 als Methylierungsplasmid auszuwählen, welches im Anschluss erfolgreich für die Plasmidtranskonjugation verwendet werden konnte (3.7). Ferner wurde aus dem ZFE Assay geschlussfolgert, dass innerhalb der drei potenziellen RM-Systeme vorwiegend das vom Typ-II in *C. kluyveri* aktiv sein könnte. Hierbei könnte es jedoch über das ZFE Assay zu einer Über- oder Unterschätzung der Enzymaktivitäten gekommen sein. Zwar wurden vorab einige Hypothesen zu den Erkennungssequenzen der RM-Systeme aufgestellt (4.4.1). Diese müssen so jedoch nicht unbedingt den tatsächlichen Aktivitäten der Proteine *in vivo* entsprechen. Einerseits wurde durch die als Template für den ZFE-Verdau gewählten Plasmide nur einen Bruchteil aller in der Natur theoretisch möglichen Erkennungssequenzen für REasen und MTasen abgedeckt. Andererseits lassen sich mit dem ZFE Assay nicht alle bakteriellen REasen gleich gut nachweisen. In diesem Kontext gab es bereits Probleme mit REasen aus *Agrobacterium radiobacter* (syn. *A. tumefaciens*) und *Pseudomonas facilis*, vermutlich da hier die Enzyme instabil oder schwer aufzureinigen waren. Stattdessen schienen diese Stämme vermehrt unspezifische REasen zu besitzen (Whitehead *et al.* 1985). Daher sollten Resultate des ZFE Assays grundsätzlich kritisch hinterfragt werden, nicht nur im Zusammenhang mit *C. kluyveri*, sondern auch mit anderen Bakterien.

Alles in allem konnte somit auch bei der Arbeit mit dem sekundären Gärer *C. kluyveri* dargelegt werden, dass das Überwinden der RM-Systembarrieren ein zentraler Aspekt bei der Etablierung eines genetischen Systems für einen neuen Organismus ist. Zu deren Überwindung kann die *in vivo* Methylierung als vielversprechendes Hilfsmittel eingesetzt werden.

4.4.3 Mögliche Auswirkung der Restriktionssysteme auf die Transformationseffizienz

Es ist bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt, dass ein Verlust von Restriktionssystemen die Transformierbarkeit von verschiedenen Bakterien deutlich erhöht (Liebl *et al.* 1989, O'Callaghan *et al.* 1990, Keller *et al.* 2009, Lesiak *et al.* 2014). Dennoch konnte bis heute keine eindeutige Schlussfolgerung darüber gezogen werden, welcher RM-Systemtyp in diesem Zusammenhang die größte Transformationsbarriere darstellt. Interessanterweise trug bei *C. kluyveri* eine Typ-II MTase zum ersten Transkonjugationserfolg über *in vivo* Methylierung bei (3.7.2). Dies ist ein Hinweis darauf, dass in *C. kluyveri* anders als in *C. saccharobutylicum*, das Typ-II RM-System die größte

Transformationsbarriere sein könnte. Obwohl theoretisch alle RM-Systemtypen gleichermaßen zum Schutz der Bakterienzelle vor Fremd-DNA beitragen könnten, schien bisher jedoch vor allem die Deletion des Typ-I RM-Systems die Transformation deutlich zu verbessern (Keller *et al.* 2009, Kostner 2014, Lesiak *et al.* 2014). Allerdings weist das potenzielle *C. kluyveri* Typ-I RM-System bereits im Genom einen ungewöhnlichen Aufbau vor (3.6.1). Selbst wenn das RM-System nicht falsch annotiert worden ist, würde ein unvollständiges Typ-I System vermutlich nur wenig Schutz vor Fremd-DNA bieten, da eine freie Typ-I R-Untereinheit selbst nur eine sehr schwache Nukleaseaktivität *in vivo* besitzt (Bourniquel *et al.* 2002). Dies wäre eine Erklärung dafür, warum alle bisher erfolgreich durchgeführten Plasmidtranskonjugationen in *C. kluyveri* unter ausschließlicher Nutzung der Typ-II MTase CKL_2671 möglich waren (3.7). Zusätzlich wäre es noch möglich, dass die aktuell verwendeten Plasmide keine passende Erkennungssequenz besitzen, da diese für die putative Typ-I REase bisher noch nicht bekannt ist. Ob und wie aktiv das potenzielle Typ-I RM-System in *C. kluyveri* tatsächlich ist, ließe sich schlussendlich nur über einen gezielten *Knock-out* der R-Untereinheit und einer nachfolgenden Bestimmung der Transformationseffizienz aufklären.

Anders als beim potenziellen Typ-I RM-System könnte hingegen das potenzielle Typ-III RM in *C. kluyveri* durchaus aktiv sein. Darauf deutet zumindest das veränderte ZFE-Bandenmuster unter der Anwesenheit der putativen MTase CKL_3239 hin (Abbildung 3.16). Nichtsdestotrotz war die alleinige Anwesenheit der potenziellen Typ-II MTase CKL_2671 ausreichend, um Shuttleplasmide vor dem Verdau durch den *C. kluyveri* ZFE zu schützen (3.6.3). Dennoch kann aus diesem Ergebnis nicht geschlossen werden, dass das Typ-II RM-System in *C. kluyveri* stärker aktiv ist als das Typ-III RM, da die Aussagekraft für das ZFE Assay wie bereits in Kapitel 4.4.2 erläutert, limitiert ist. Trotzdem ist es sehr erstaunlich, dass die Aktivität der Typ-II MTase CKL_2671 verschiedene Shuttleplasmide scheinbar auch vor dem Typ-III RM-System zu schützen scheint. Es wird vermutet, dass Methylierungen deshalb DNA vor einem Abbau durch REase schützen, weil sie sterisch eine Interaktion von Enzym und Substrat verhindern. Dieser Effekt kann an der Erkennungssequenz nicht nur durch die zur REase zugehörige MTase, sondern in manchen Fällen auch durch eine andere MTase hervorgerufen werden (McClelland *et al.* 1988). Unter der Annahme, dass die Typ-II MTase CKL_2671 an einer ähnlichen Stelle methyliert, wie sie von der Typ-III REase CKL_3240 zum Erkennen oder Schneiden genutzt wird, könnte das Shuttleplasmid somit bereits durch CKL_2671 ausreichend vor beidem RM-Systemen geschützt worden sein. Da dieser Effekt auf andere Plasmidsequenzen unter Umständen nicht mehr zutreffen könnte, ist es ratsam, neben den bereits untersuchten pMTL-Plasmiden (3.6.3) noch weitere Plasmide mit dem ZFE Assay zu testen. Somit kann sichergestellt werden, dass auch diese Plasmide unter Zuhilfenahme des Typ-II Methylierungsplasmids pCKL_2671 erfolgreich in *C. kluyveri* transkonjugiert werden können.

Trotz einer möglichen Aktivität des potenziellen Typ-III RM-Systems ist es ratsam, in *C. kluyveri* zunächst das potenzielle Typ-II RM-System (*CKL_2669* – *CKL_2671*) zu deletieren. Die bisherigen Transkonjugationserfolge unter Verwendung der putativen Typ-II RM-System MTase *CKL_2671* lassen, unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei der genetischen Arbeit mit *C. saccharobutylicum* (Lesiak *et al.* 2014), darauf schließen, dass sich durch den *Knock-out* dieses RM-Systems die Zahl gewonnener Transformanten durch Konjugation mit *C. kluyveri* ebenfalls deutlich erhöhen lässt. Der Vorteil bestünde hierbei nicht nur darin, dass für die Konjugation mit einem restriktionsdefizienten Stamm die *in vivo* Methylierung nicht mehr notwendig ist. Zusätzlich ergibt sich mit einem solchen Stamm eine Vielzahl möglicher Modifizierungen am RBO-Stoffwechsel von *C. kluyveri*, wie beispielsweise eine Veränderung der Thiolaseexpression zur Steigerung der Hexanoatsynthese (4.6). Vier für diesen *Knock-out* potenziell geeignete Deletionsplasmide wurden hierzu bereits im Rahmen dieser Arbeit konstruiert (3.9.3).

4.4.4 Promotoren für die *in vivo* Methylierung in *E. coli*

Zur Expression der *C. kluyveri* MTase *CKL_2671* kamen für die *in vivo* Methylierung zwei unterschiedliche Plasmidvarianten zum Einsatz. Hierbei besitzt pCKL_2671 einen T7-Promotor (P_{T7}), wohingegen pCKL_2671-Lac einen *lac*-Promotor (P_{lac}) zur Kontrolle der MTase Aktivität hat. Beide Methylierungsplasmide sollten im Anschluss in *E. coli* TOP10 exprimiert werden. Dieser *E. coli* Stamm besitzt laut seines Genotyps (Tabelle 2.1) kein Gen für eine T7 RNA Polymerase, welche jedoch für die Transkription des T7 Promotorsystems zwingend benötigt wird (Tabor *et al.* 1985). Folglich sollte es also eigentlich nicht möglich sein, dass in *E. coli* TOP10 die potenziellen *C. kluyveri* MTase *CKL_2671* aktiv über P_{T7} transkribiert wird. Allerdings weisen die Ergebnisse des ZFE Assays (3.6.3) und die zahlreichen erfolgreichen Plasmidtranskonjugationen in dieser Arbeit darauf hin, dass das MTase-Gen *CKL_2671* auf pCKL_2671 trotz P_{T7} in *E. coli* TOP10 aktiv transkribiert worden sein muss. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits von Justyna Lesiak (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) für das *C. saccharobutylicum* Methylierungsplasmid pJL2 beschrieben. Das Plasmid pJL2 wurde als Basisvektor für die Konstruktion von pCKL_2671 für *C. kluyveri* verwendet (3.6.2). Für pJL2 wurde damals vermutet, dass die Expression der MTase nicht über P_{T7} , sondern entweder über den nativen MTase Promotor des *C. saccharobutylicum* Gens oder den Promotor des Tet^R-Gens auf dem Plasmid erfolgen könnte (Lesiak 2015). Da für die Konstruktion von pCKL_2671 ausschließlich das Gen *CKL_2671* genau zwischen Start- und Stop-Codon amplifiziert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass der native Promotor der *C. kluyveri* MTase für die Expression in *E. coli* verantwortlich ist. Allerdings wurde bei der Konstruktion von pCKL_2671 die Region mit dem nativen MTase Promotor der *C. saccharobutylicum* RM-System -Gene beibehalten. Daher ist es durchaus möglich, dass ähnlich wie in pJL2 auch die potenzielle *C. kluyveri* MTase *CKL_2671* in pCKL_2671 über den nativen

C. saccharobutylicum MTase-Promotor abgelesen wird. Die genaue Regulation der MTase-Aktivität in pCKL_2671 bleibt daher ungeklärt.

Um sicherzustellen, dass die *C. kluyveri* MTase *CKL_2671* auch in einem *E. coli* Stamm ohne T7 RNA Polymerase aktiv ist, wurde in pCKL_2671 der P_{T7} gegen P_{lac} ausgetauscht (3.6.2). Dieser Promotor des *lac*-Operons aus *E. coli* erlaubt eine gezielte Induktion der Genexpression über Lactose oder über das Lactose-Analogon Isopropyl- β ,D-Thiogalactosid (IPTG) (Glascock *et al.* 1998). Im nachfolgenden ZFE Assay mit dem P_{lac} -kontrollierten *C. kluyveri* MTase-Expression in pCKL_2671-Lac konnten vergleichbare Ergebnisse zu der ursprünglichen Plasmidvariante pCKL_2671 mit P_{T7} erzielt werden (3.6.3). Interessanterweise zeigte hierbei das Methylierungsplasmid mit P_{T7} bereits ohne vorhandenen Induktor eine MTase-Aktivität. Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, dass P_{lac} „undicht“ ist, vermutlich da bei der für Plasmide verwendeten Version des P_{lac} die vom Repressor gebildete DNA-Schleife schwächer ausgebildet wird, was zu einer unvollständigen Hemmung führt (Lewis *et al.* 1996, Setty *et al.* 2003). Insgesamt konnte jedoch beobachtet werden, dass die Anzahl der gewonnenen *C. kluyveri* Transkonjuganten mit der MTase *CKL_2671* unter P_{lac} -Kontrolle in *E. coli* TOP10 deutlich geringer ausfiel als unter P_{T7} Promotorkontrolle. Dieser negative Effekt trat sowohl mit als auch ohne Induktion des P_{lac} im Methylierungsplasmid in *E. coli* auf (nicht gezeigt). Dennoch bleibt unklar, warum das Plasmid mit P_{T7} für die Konjugation besser funktioniert hat als das mit P_{lac} , obwohl beide Plasmide zuvor im ZFE Assay vergleichbar gut funktioniert hatten. Zwar werden die *E. coli* Kulturen für die Konjugation mit ca. 2,5 h deutlich kürzer inkubiert als für das ZFE Assay mit ca. 16 h, was mit einer unvollständigen Methylierung und einer damit verbundenen schlechteren Transformationseffizienz des Donorplasmids während der Konjugation einhergegangen sein könnte. Dies erklärt jedoch nicht das gleichermaßen schlechte Abschneiden des P_{lac} während der Konjugation. Möglicherweise ist bei der *in vivo* Methylierung die Expressionsstärke der MTase in *E. coli* ein kritischer Faktor. Hierbei könnte sowohl eine zu schwache Transkription ohne Induktor, als auch eine zu starke Transkription mit Induktor beim P_{lac} zu dem schlechteren Transkonjugationsergebnissen mit *C. kluyveri* geführt haben. Zwar könnte versucht werden, dieses Problem über einen erneuten Tausch des MTase-Promotors in pCKL_2671 zu beheben. Allerdings ist bereits in naher Zukunft die Deletion des Typ-II RM-Systems in *C. kluyveri* angedacht (4.4.3), welche die *in vivo* Methylierung überflüssig machen wird. Daher sollte eine weitere Optimierung der bisherigen Methylierungsplasmide für *C. kluyveri* nicht mehr nötig sein.

4.5 Herausforderungen bei der Arbeit mit den *codBA*-Genen

4.5.1 Voraussetzungen für die Verwendung von *codBA* in *C. kluyveri*

Die Idee zum *codBA*-basierten Gegenselektionssystem geht auf die Arbeit von Kostner *et al.* (2013) mit dem Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* zurück und gilt als Weiterentwicklung der *upp*-basierten Gegenselektionsmethode für diesen Stamm nach Peters *et al.* (2013). Eine wichtige Voraussetzung zur Verwendung von *codBA* ist das Vorhandensein einer Uracil Phosphoribosyltransferase (UPP) im Genom des für die genetische Arbeit ausgewählten Organismus. Die UPP katalysiert die Umwandlung von 5-Fluorouracil (FU) zu 5-Fluorouridin-Monophosphat (Martinussen *et al.* 1994), welches nach weiterer Umwandlung zu 5-Fluorodesoxyuridin-monophosphat die Replikation und Reparatur der DNA blockiert (Neuhard 1983). Um eine zuverlässige Genselektion in *upp*-positiven Stämmen zu ermöglichen, werden in das Plasmidsystem Gene für einen Cytosin-Transporter (*codB*), sowie eine Cytosin-Deaminase (*codA*) integriert, welche sowohl einen Import von 5-Fluorocytosin (FC) in die Zelle, als auch eine Umwandlung von FC in FU mit den oben beschriebenen toxischen Effekten ermöglichen (Kostner *et al.* 2013). Im Genom von *C. kluyveri* codiert das Gen *CKL_3702* mutmaßlich für eine UPP. Gleichzeitig konnte für den *C. kluyveri* DSM 555^T Wildtyp sowohl eine Resistenz gegen FC, als auch eine hohe Sensitivität gegen FU nachgewiesen werden (3.5.2). Ferner konnten im Genom von *C. kluyveri* kein *codA*-Gen identifiziert werden (nicht gezeigt). Damit sollte *C. kluyveri* theoretisch alle nötigen Voraussetzungen für die Anwendung des *codBA*-basierten Gegenselektionssystems nach Kostner *et al.* (2013) erfüllen.

4.5.2 Unterschiede der *codBA*-Basisvektoren

Das *codBA*-Gegenselektionssystem wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich nicht nur bei der genetischen Arbeit mit Essigsäurebakterien und *Bacillus*, sondern auch bei Clostridien eingesetzt (Kostner *et al.* 2013, Kostner *et al.* 2017, Huang *et al.* 2018, Bimmer *et al.* 2022). Über diesen Arbeiten sind verschiedene Plasmidsysteme entstanden, die sich insbesondere im für die Gegenselektion verwendeten *codBA* und dessen Promotor unterscheiden. Beim pKOS6b Plasmidsystem für die Essigsäurebakterien wurde das *codBA*-Gen aus *E. coli* K12 vor den Promotor des *upp*-Gens (P_{upp}) aus *G. oxydans* eingefügt (Kostner *et al.* 2013). Im Gegensatz dazu wurde für das pKVM4 *Bacillus* Plasmidsystem zwar ebenfalls das *E. coli* *codBA*-Gen verwendet, allerdings unter der Kontrolle des konstitutiven P_{clpB} -Promotors aus *Staphylococcus aureus* (Rachinger *et al.* 2013, Kostner *et al.* 2017). Der P_{clpB} -Promotor lag hierbei vermutlich deshalb besonders nahe, da er zuvor bereits erfolgreich bei der Expression des β -Galaktosidase-Gens in *Bacillus cereus* eingesetzt wurde (Arnaud *et al.* 2004).

Um die Gegenselektion in Clostridien weiter zu verbessern, wurde beim pChN Plasmid das *E. coli* *codBA*-Gen aus pKVM4 nachträglich gegen *codBA* aus *C. ljungdahlii* ausgetauscht, wobei P_{clpB} aus *S. aureus* erhalten blieb. Durch die Verwendung eines Clostridien-Gens sollte hierbei sichergestellt werden, dass *codBA* ausreichend stark im Zielorganismus *C. saccharobutylicum* exprimiert werden kann (Huang *et al.* 2018). Da die pChN Plasmide in *C. saccharobutylicum* erfolgreich angewendet werden konnten, sollte dieses Empty Suicideplasmid die Konstruktionsgrundlage für *C. kluyveri* *codBA*-Basisvektoren bilden.

4.5.3 Mögliche Probleme mit dem clostridialen *codBA*-Gen aus pChN in *E. coli*

Die Konstruktion neuer Plasmidvarianten in *E. coli* auf Basis von pChN gestaltete sich jedoch im Folgenden als äußerst schwierig. Viele Konstrukte ließen sich, wenn überhaupt, nur sehr schwer in *E. coli* exprimieren. Hierbei könnten Probleme durch das clostridiale *codBA*-Gen in *E. coli* aufgetreten sein. Neben dem Promotor und der Ribosomen-Bindestelle spielt bei Expression von Genen in artfremden Organismen vor allem die Anzahl der im Zielorganismus vorhandenen tRNA-Moleküle eine wichtige Rolle, die dazu in der Lage sind, das spezifische Codon-Verwendungsmuster des Fremd-Gens zu erkennen (Winkler *et al.* 1988). Dies würde insbesondere die Probleme bei der Gegenselektion in *C. saccharobutylicum* unter Verwendung des *E. coli* *codBA*-Gens erklären, wie zuvor von Huang *et al.* (2018) beschrieben.

Zudem stellt möglicherweise die zusätzliche episomale Kopie des *codBA*-Gens ebenfalls ein Problem dar. Normalerweise wird die Expression der Gene für den Cytosin-Transporter und die Cytosin-Deaminase in *E. coli* sehr genau über Purin- oder Pyrimidin-Konzentrationen in der Umgebung reguliert (Andersen *et al.* 1989, Danielsen *et al.* 1992). Dieser Mechanismus könnte bei einer zu starken Aktivität des episomalen *codA*-Gens unter Umständen nicht mehr so gut greifen und daher, wie von Cartman *et al.* (2012) postuliert, zu einem letalen Shift im zellulären Pyrimidin-Pool von Cytosin zu Uracil führen. Auch eine zu starke Expression des Cytosin-Transporters *codB* könnte in *E. coli* problematisch sein. Eine Überexpression von zusätzlichen Membranproteinen könnte die Cytoplasmamembran möglicherweise so destabilisieren, dass die Funktionalität anderer membranständiger Enzyme, z.B. aus der Atmungskette, negativ beeinflusst wird (Wagner *et al.* 2007). Daher häufen Laborstämme, welche solche toxischen Gene exprimieren, häufig Mutationen an. Diese Mutationen verringern die Genexpression, sodass der Selektionsdruck reduziert wird und damit ein besseres Wachstum des Organismus möglich ist (Gubellini *et al.* 2011). Diese Beobachtung wurde so auch im Zusammenhang mit dem *C. ljungdahlii* *codBA*-Gen in *E. coli* gemacht (nicht gezeigt).

4.5.4 Suche nach einem geeigneten Promotor für *codBA* in *E. coli*

Um Probleme bei der Plasmidkonstruktion mit kritischen Genen wie *codBA* zu vermeiden, sollte daher der Promotor vor dem jeweiligen Gen gewissenhaft gewählt werden. Bei *codBA* ist hierbei jedoch zusätzlich zu beachten, dass im Zielorganismus später eine gewisse Expressionsstärke notwendig ist, um die Gegenselektion zuverlässig zu ermöglichen. Der P_{clpB} Promotor von *S. aureus* scheint hierfür nicht ideal zu sein. Zwar ermöglichte dieser im Anschluss die Gegenselektion in *C. saccharobutylicum* (Huang *et al.* 2018). Das *codBA*-Plasmid pChN mit P_{clpB} konnte aber vermutlich nur deshalb halbwegs stabil in *E. coli* gehalten werden, da zufällig Mutationen im P_{clpB} Promotor zu einer reduzierten Expressionsstärke vom Clostridien *codBA* geführt haben könnten. Diese Mutationen in P_{clpB} wurden kürzlich bei einer routinemäßigen Kontrolle der Plasmide durch Sequenzieren identifiziert (nicht gezeigt). Durch den Einsatz des P_{fdx} Promotors aus *C. sporogenes* vor *codBA* im pChN basierten Plasmid pHE1-C2 (Tabelle 2.6) konnte zwar die Stabilität des *codBA*-Systems im Vergleich zu P_{clpB} verbessert werden (Masterarbeit Andreas Abstreiter, TU München, 2022, nicht veröffentlicht). Es wurde allerdings vermutet, dass dieser Promotor unter Umständen im Zielorganismus zu einer toxischen Überexpression von *codBA* führen könnte. Analog zu P_{upp} aus *G. oxydans* in dem pKOS6b Essigsäurebakterien-Plasmiden könnte daher P_{upp} aus *C. ljungdahlii* eine geeignete Alternative für das Clostridien *codBA*-System sein. Erfreulicherweise ließen nach dem Wechsel des *codBA*-Promotors von P_{fdx} zu P_{upp} (pMS1_upp und pMS2_upp) korrekte Plasmidkonstrukte deutlich leichter gewinnen als zuvor, vermutlich aufgrund der schwächeren Aktivität von P_{upp} in *E. coli*. Zudem deuten erste erfolgreiche Plasmidtranskonjugationen darauf hin, dass mit P_{upp} *codBA* nicht in toxischen Mengen exprimiert wird (nicht gezeigt). Allerdings könnte es auch sein, dass P_{upp} in *C. kluyveri* zu schwach oder gar nicht aktiv ist, wodurch im schlimmsten Fall die Gegenselektion über 5-FC gar nicht erst möglich ist. Um dies zu prüfen, müssten *C. kluyveri* Transkonjuganten mit *codBA* auf ihre Sensitivität gegenüber 5-FC getestet werden.

Eine Möglichkeit zur Messung von Promotorstärken wie dem P_{upp} bietet das „Fluorescence-activating and absorption-shifting tag“ (FAST) Protein (Plamont *et al.* 2016), welches aufgrund seiner sauerstoffunabhängigen Fluoreszenz bereits als Reportersystem für verschiedene acetogene und solventogene Anaerobier angewendet wurde (Streett *et al.* 2019, Charubin *et al.* 2020b, Flaiz *et al.* 2022). Dieses Reportersystem wurde kürzlich zur Untersuchung von Promotoren in *C. cellulovorans* modifiziert (persönliche Kommunikation Aline Schöllkopf, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München) und ist daher auch vielversprechend für die Anwendung in *C. kluyveri*. Hierzu müssten lediglich bereits vorhandene FAST-Plasmidkonstrukte über das hier beschriebene Konjugationsprotokoll in *C. kluyveri* eingebracht werden. Neben den bereits erwähnten konstitutiven Promotoren (P_{clpB} , P_{fdx} , P_{upp}) könnten über FAST alternativ auch so genannte Riboswitches als genregulatorische Elemente in *C. kluyveri* getestet werden. Besonders synthetische Riboswitch-Varianten ermöglichen durch

Induktion mit einem Liganden eine gezielte Genexpression in verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Topp *et al.* 2010). Somit könnten zukünftig kritische Proteine wie *codA* und *codB* oder auch die Cas9 aus dem CRISPR/Cas9 System leichter verwendet werden, da sie gezielt nur dann im Zielorganismus synthetisiert werden, wenn sie zwingend benötigt werden. Ob und welche Riboswitch-Varianten für *C. kluuyveri* geeignet sein könnten, müsste in diesem Zusammenhang jedoch noch getestet werden.

4.5.5 Auswahl einer passenden Flanken-Insertionsstelle bei *codBA*-Plasmiden

Neben dem *codBA*-Gen aus *C. ljungdahlii* wurde auch die Wahl der geeigneten Insertionsstelle für die homologen Flanken als kritischer Aspekt bei der Konstruktion von Deletionsplasmiden identifiziert (3.9.3). In bisherigen Deletionsplasmiden wurden die homologen Flanken entweder vor dem *codBA* zwischen der *oriT/traJ* Region und P_{clpB} (Kostner *et al.* 2017), oder nach dem *codBA* zwischen *codA* und der Antibiotika-Resistenzkassette *catP* (Huang *et al.* 2018) eingefügt.

Beide Varianten schienen zunächst gleich gut geeignet zu sein, da in beiden Fällen erfolgreich Mutanten generiert werden konnten. Somit wurde zunächst für die Konstruktion von *C. kluuyveri* Deletionsplasmiden auf Basis von pMS1_upp (Tabelle 2.6) versucht, die homologen Flanken wie bei Kostner *et al.* (2017) zwischen dem MB1 aus pCB322 und der *oriT/traJ* Region einzufügen. Da sich an dieser Stelle ein größerer, nicht-codierender Abschnitt mit ca. 1,3 kb befindet, wurde entschieden, diesen zu entfernen, um das neue Deletionsplasmid so klein wie möglich zu gestalten. Dies sollte später dabei helfen, das Plasmid leichter in *C. kluuyveri* zu transkonjugieren. Trotz erfolgreicher Konstruktion des Deletionsplasmids pMS1_upp_Δ2671 konnte dieses nicht erfolgreich in *C. kluuyveri* transkonjugiert werden. Erst, als die homologen Flanken in pMS1_upp bzw. pMS2_upp wie bei Huang *et al.* (2018) zwischen *codBA* und *catP* eingefügt worden sind, konnten im Anschluss *C. kluuyveri* Transkonjuganten gewonnen werden (3.9.3). Da die neuen Plasmidvarianten mit 10,1 - 10,9 kb sogar größer waren als zuvor pMS1_upp_Δ2671 mit 9,7 kb (Tabelle 2.6), scheint das Problem bei der Transkonjugation hierbei eher von der gewählten Position zur Insertion der Flanken nahe *oriT/traJ* auszugehen.

Das in pMS1_upp für die Konjugation verwendete *oriT/traJ*-Segment wurde von Rachinger *et al.* (2013) aus pKV12 (Strätz *et al.* 1994) in den nicht-codierenden Abschnitt zwischen MB1 und P_{clpB} von pMAD (Arnaud *et al.* 2004) eingefügt, und findet sich so später auch in pKVM4 und pChN wieder (Kostner *et al.* 2017, Huang *et al.* 2018). Hierbei aktiviert das Protein TraJ als Masterregulator in einem komplexen Mechanismus das *tra*-Operon, welches in die Konjugation involviert ist (Zahl *et al.* 2007). Am *oriT*-Lokus kommt es zu einem Nick der DNA, ein Schritt, welcher essentiell für einen Konjugationsprozess nach einem ‚rolling circle‘-Mechanismus ist (Willetts 1972, Tsai *et al.* 1990).

Eventuell befinden sich in der Nähe von *oriT/traJ* noch weitere regulatorische Elemente, welche für die Konjugation wichtig sind, aber in den bisherigen Plasmidkarten nicht verzeichnet worden sind. Unter der Annahme, dass bei der Konstruktion von pMS1_upp_Δ2671 versehentlich ein solches regulatorisches Element beeinflusst wurde, erscheint es durchaus möglich, dass dadurch eine Transkonjugation dieses Plasmids in *C. kluyveri* nachfolgend nicht mehr möglich war. Daher sollte für die Konstruktion weiterer Plasmide auf Basis von pMS1_upp bzw. pMS2_upp homologe Flanken bevorzugt zwischen *codBA* und *catP* eingefügt werden, um eine mögliche negative Auswirkung auf die *oriT/traJ*-Region zu vermeiden.

4.5.6 Arbeit mit dem sekundären Gärer *C. kluyveri*

Die Arbeit mit dem sekundären Gärer *C. kluyveri* stellte die Wissenschaft bereits sehr früh vor einige Herausforderungen. Besonders die Isolierung der *C. kluyveri* Reinkultur war hierbei zu Beginn äußerst schwierig, da dieses Bakterium ein sehr ungewöhnliches Substratspektrum besitzt (1.3.1). Einige Enzyme, wie z.B. die Re-Citrat-Synthase (Gottschalk *et al.* 1966, Li *et al.* 2007) oder sogar vollständige Gencluster (Söhling *et al.* 1996) wurden bereits für verschiedene Studien aus dem *C. kluyveri* Genom amplifiziert und in andere Organismen eingebracht. Warum der Organismus trotz seines für biotechnologische Anwendungen äußerst vielversprechenden Stoffwechsels, der C-Kettenverlängerung, bis heute noch nicht genetisch zugänglich gemacht werden konnte, ist daher umso mehr erstaunlich. Neben den RM-Systembarrieren, welche es zu überwinden galt (3.6), ist vor allem das langsame Wachstum insbesondere auf dem Festmedium ein Flaschenhals bei der genetischen Arbeit mit *C. kluyveri*. Dies lässt sich wegen der geringen Energiegewinnung und damit Biomassebildung, bedingt durch die geringe ATP-Ausbeute der auf RBO beruhenden sekundären Gärung, nicht wesentlich verbessern (1.3.2). Die Auswirkungen des langsamen Wachstums und der geringen Biomassebildung auf verschiedene Aspekte des genetischen Arbeitens mit *C. kluyveri* wurden bereits ausführlich in den Kapiteln 4.3 und 4.4 diskutiert

Alles in allem muss für die genetische Arbeit mit *C. kluyveri* somit deutlich mehr Zeit eingeplant werden als beispielsweise bei *C. acetobutylicum* und *C. saccharobutylicum*. Nicht nur die Vorkulturen, Hauptkulturen und das ‚Mating‘, sondern insbesondere die Selektion nach resistenten Transkonjuganten sind mit *C. kluyveri* sehr zeitaufwendig. So kann mit Transkonjuganten von *C. acetobutylicum* oder *C. saccharobutylicum* in der Regel bereits 2 Tage nach dem Ausplattieren der Spots weitergearbeitet werden (persönliche Kommunikation Holger Edelman, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München), wohingegen ausreichend große Kolonien von *C. kluyveri* Transkonjuganten für nachfolgende Arbeitsschritte erst nach ca. 11 Tagen angewachsen sind (3.7). Prinzipiell sollte diese Tatsache kein großes Problem darstellen, da Konjugationsansätze durchaus gestaffelt angesetzt werden können, um somit die langen Inkubationszeiten sinnvoll zu überbrücken.

Allerdings sind für einige Arbeitsschritte sukzessive Ausstriche des Stamms auf Festmedien notwendig. Diese Ausstriche könnten zum Beispiel dabei helfen, positive Klone nach der ersten homologen Rekombination zu identifizieren, da eine Integration des Plasmids ins Genom häufig auch mit einer phänotypischen Aufspaltung einhergeht (Cartman *et al.* 2012, Ehsaan *et al.* 2016). Hierbei entstehen nach der Integration des Plasmids größere Kolonien auf den Selektivplatten, da ihr Wachstum im Folgenden nicht mehr durch die Replikation und Segregation des Plasmids an die Tochterzellen abhängt (Cartman *et al.* 2012). Bis diese Aufspaltung sichtbar wird, können jedoch mehrere, aufeinanderfolgende Ausstriche nötig sein (persönliche Kommunikation Holger Edelmann, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München). Da eine phänotypische Aufspaltung nach Koloniegröße die Auswahl von potenziell für eine Gegenselektion geeigneten Klonen deutlich erleichtert, wäre es ratsam, diese Methode trotz des damit verbundenen längeren Zeitaufwands durch die Inkubationen auch für *C. kluyveri* zu testen. Hierzu könnte allerdings eine weitere Optimierung des TM 4040 Mediums auf Basis der Überlegungen aus Kapitel 4.2 sinnvoll und nötig sein.

4.5.7 Auswahl eines geeigneten Gram-positiven Replikationsursprungs

Ein wichtiger Bestandteil der *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmide nach Heap *et al.* (2009) ist der Gram-positive Replikationsursprung (Ori). Hierbei sollte der Gram-positive Ori passend zum jeweiligen Organismus und der späteren Anwendung gewählt werden, da sich nicht jeder Ori in jedem Zielorganismus gleich gut transformieren und stabil halten lässt. So sollte ein Ori für ein Expressionsplasmid möglichst lange stabil episomal vorliegen können, wohingegen für eine genomische Integration ein Plasmid mit „Pseudo-Suizid“-Effekt vorteilhaft sein kann. Bei Letzteren kann das Plasmid zwar in der Wirtszelle replizieren, lässt sich aber nicht über längere Zeit stabil im Organismus halten. Dies kann mit einer verbesserten Anreicherung von Plasmidintegranten unter Antibiotika-Selektionsdruck einhergehen (Cartman *et al.* 2010, Cartman *et al.* 2012).

Für *C. kluyveri* wurden die Oris BP1, CB102, CD6 und IM13 über die pMTL-8000 Plasmidserie nach Heap *et al.* (2009) getestet. Hierbei konnten lediglich Transkonjuganten mit den Oris BP1 oder CB102 gewonnen werden. Alle vier getesteten Plasmide unterschieden sich lediglich in ihrem Gram-positiven Ori (Heap *et al.* 2009) und wurden unter identischen Transformationsbedingungen getestet (3.7.3). Zudem sollten sich theoretisch auf Basis des ZFE Assays (3.6.3) alle vier Plasmide gleichermaßen mit dem Methylierungsplasmid pCKL_2671 vor den *C. kluyveri* RM-Systemen schützen lassen. Daher sollten die beobachteten Unterschiede lediglich auf den jeweils verwendeten Replikationsursprung im Plasmid zurückzuführen sein.

Die beobachteten Unterschiede in den Koloniegrößen (3.7.3) deuten hierbei darauf hin, dass der Replikationsmechanismus von BP1 in *C. kluyveri* besser abzulaufen scheint als der von CB102,

wodurch mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Plasmidkopie an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Es könnte aber auch darauf hindeuten, dass das Plasmid mit BP1 Ori in *C. kluuyveri* stabiler ist als mit CB102. Dies wäre in Übereinstimmung zu den Daten mit *C. acetobutylicum* und *C. saccharobutylicum*, wonach Plasmide mit Ori BP1 ebenfalls lange stabil episomal vorliegen, mit Ori CB102 jedoch rasch ohne Antibiotika-Selektionsdruck wieder verloren gehen (Heap *et al.* 2009, Lesiak 2015). Bei *Acetobacterium woodii* wurde hingegen kürzlich genau das Gegenteil beobachtet, sodass hier Plasmide mit CB102 äußerst stabil episomal vorlagen (Baker *et al.* 2022).

Auf Basis der Ergebnisse sollte daher für ein *C. kluuyveri* Expressionsplasmid vorzugsweise der Ori BP1, für ein Deletionsplasmid hingegen der Ori CB102 gewählt werden, um bei letzterem den bereits geschilderten ‚Pseudo-Suizid‘-Effekt ausnutzen zu können. Zur genauen Abklärung wäre hierbei zusätzlich noch ein Plasmid-Stabilitätsassay, z.B. nach Sato *et al.* (2013) für *C. kluuyveri* und Ori BP1 bzw. CB102 notwendig. Somit könnte sichergestellt werden, dass ein Plasmid mit Ori BP1 auch ohne Antibiotika-Selektionsdruck stabil in *C. kluuyveri* gehalten werden kann. Diese Information wäre insbesondere für den *C. kluuyveri* Transkonjuganten CK#Ra9 mit dem Thiolase-Expressionsplasmid aus Kapitel 3.8 im Hinblick auf die autotrophe Co-Kultivierung mit *C. carboxidivorans* hilfreich. In dieser kann kein Antibiotikum zur Plasmidselektion verwendet werden, da *C. carboxidivorans* äußerst Thiamphenicol-sensitiv ist (persönliche Kommunikation Miriam Bäuml, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TU München). Eine Co-Kultivierung mit CK#Ra9 wäre folglich nur dann sinnvoll, wenn das Thiolase-Expressionsplasmid mit Ori BP1 auch ohne Thiamphenicol stabil in *C. kluuyveri* gehalten werden kann.

Ferner deuten weitere Ergebnisse darauf hin, dass neben BP1 und CB102 auch der neu für die pMTL8000 Plasmidserie verfügbare Ori UB110 (pMTL87151) für die Transkonjugation von Shuttleplasmiden in *C. kluuyveri* geeignet sein könnte (Bachelorarbeit Jennifer Reif, TU München, 2022, nicht veröffentlicht). Der Replikationsursprung UB110 stammt hierbei aus *S. aureus* (LeBlanc *et al.* 1992). Allerdings wurde bei der Kontrolle von pMTL87151 durch Sanger-Sequenzierung einige Unstimmigkeiten in der Ori-Region entdeckt. Im Gegensatz zu der auf der Website der pMTL-Plasmide „Plasmidvectors.com“ verfügbaren Vektorkarte annotiert, scheint die tatsächliche Ori-Region von pMTL87151 laut Sequenzierung deutlich größer zu sein. So befinden sich nach der *AscI*-Schnittstelle vor UB110 zusätzliche 363 bp und nach UB110 vor der *FseI*-Schnittstelle weitere zusätzliche 66 bp (persönliche Kommunikation Helga Gaenge, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München). Prinzipiell sollten diese zusätzlichen Basenpaare die Funktion von UB110 nicht negativ beeinflussen. Damit könnte auch UB110 aus pMTL87151 bei *C. kluuyveri* Anwendung finden. Allerdings waren die Versuchsparameter zum Zeitpunkt des Ori-Tests nicht optimal (Bachelorarbeit Jennifer Reif, TU München 2022, nicht veröffentlicht), weshalb eine Wiederholung dieses Transkonjugations-Experiments mit UB110 dringend zu empfehlen ist.

4.6 Metabolic Engineering der C-Kettenverlängerung von *C. kluyveri*

4.6.1 Enzyme der C-Kettenverlängerung von *C. kluyveri*

Von allen für die RBO notwendigen Enzymen (Kapitel 1.3.2) sind mindestens zwei Genkopien im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T vorhanden, wobei einige dieser Gene Cluster ausbilden. So gibt es ein RBO-Cluster mit *crt1*, *bcd1*, *etfB1*, *etfA1* und *hbd1* (*CKL_1072 - 1078*), sowie ein Thiolase-Cluster mit *thIA1-A3* (*CKL_3696 - 3698*). Das zweite Set mit RBO-Genen (*crt2*, *bcd2*, *etfB2*, *etfA2* und *hbd2*) bildet hingegen kein gemeinsames Cluster im *C. kluyveri* Genom aus (Seedorf *et al.* 2008). Warum allerdings genau homologe Genkopien dieser Enzyme in Genom existieren, konnte bisher noch nicht genau geklärt werden.

Möglich wäre zum einen eine unterschiedliche Substratspezifität der einzelnen Enzyme (C₄ oder C₆). So wurde bereits für *C. kluyveri* die Hypothese aufgestellt, dass die Gensets jeweils entweder nur für die Synthese von Butyryl-CoA oder von Hexanoyl-CoA zuständig sein könnten (Seedorf *et al.* 2008). Dies würde bedeuten, dass beide Gensets zwingend für die Synthese von C₆ Molekülen vorhanden sein müssen, vergleichbar mit den Ergebnissen von Lauer *et al.* (2022) zur autotrophen Produktion von Hexanol über einen *C. ljungdahlii* Stamm mit beiden *C. kluyveri* RBO-Genclustern. Andererseits deutet eine Untersuchung von Wirth *et al.* (2021) zur Caproatproduktion von *C. carboxidivorans* darauf hin, dass ähnlich wie in *C. drakei* auch ein einzelnes RBO-Gencluster die Kettenverlängerung von Acetyl-CoA über Butyryl-CoA zu Hexanoyl-CoA katalysieren kann. Dies würde wiederum gegen eine Substratspezifität der einzelnen homologen Enzyme sprechen. Da folglich beide Varianten auf die homologen Gene in *C. kluyveri* zutreffen könnten, wäre eine einzelne Charakterisierung der RBO-Enzyme und hierbei insbesondere der drei Thiolasen (3.8.1) notwendig.

4.6.2 Das Thiolase-Gencluster von *C. kluyveri*

Im Kontext der RBO-assoziierten Gene von *C. kluyveri* stach insbesondere das Thiolase-Gencluster hervor, welches die drei paralogen Gene *thIA1-A3* (*CKL_3696 - 3698*) (Abbildung 3.18) beinhaltet (Seedorf *et al.* 2008). Zwar ist es nicht ungewöhnlich, dass in einem Clostridien-Genom mehrere potenzielle Thiolase-Gene annotiert sind. So sind beispielsweise laut KEGG im Genom von *Clostridium pasteurianum* DSM 525^T zwei und in dem von *C. drakei* DSM 12750^T sogar vier potenzielle Thiolasen zu finden. Allerdings sind hier die Thiolasen im Gegensatz zu *C. kluyveri* DSM 555^T nicht direkt nebeneinander im Genom annotiert.

Die Größen der drei potenziellen *C. kluyveri* Thiolasen (Tabelle 6.7) sind in etwa mit der Größe der Thiolase aus *C. acetobutylicum* vergleichbar, welche bereits aufgereinigt und charakterisiert worden ist (Wiesenborn *et al.* 1988, Stim-Herndon *et al.* 1995). Daher ist anzunehmen, dass die drei

C. kluyveri Thiolasen im Genom nach Seedorf *et al.* (2008) korrekt annotiert worden sind. Es sollte sich hierbei folglich um drei unabhängige Thiolasen mit jeweils eigenem Promotor handeln.

Der große Abstand zwischen den drei potenziellen *C. kluyveri* Thiolasen (Abbildung 3.18) ist jedoch sehr ungewöhnlich, da bei Bakterien die Gene im Genom normalerweise so dicht wie möglich aneinander gepackt sind. Da die wenigen nicht-codierenden Bereiche zumeist der transkriptionellen Regulation dienen (Rogozin *et al.* 2002) ist es durchaus denkbar, dass auch im *C. kluyveri* Genom regulatorische Elemente wie z.B. Riboswitches vorhanden sind. Für die *C. kluyveri* Thiolasen wäre es beispielsweise denkbar, dass unter Annahme einer Substratspezifität über genregulatorische Elemente die Expression der drei Thiolasen an die jeweils in der Zelle aktuell vorhandenen CoA-Ester angepasst werden (vgl. 4.6.1).

Ein Riboswitch ist ein nicht-codierter Bereich am 5'-Ende der bakteriellen mRNA mit einer charakteristischen 3D-Struktur (Nahvi *et al.* 2002, Winkler *et al.* 2002, Mandal *et al.* 2004). Dieser charakteristische Aufbau aus Aptamer-Domäne zur Bindung des Liganden und Expressionsplattform zur Modifizierung der Genexpression hilft unter anderem bei der *in silico* Vorhersage von potenziellen Riboswitches in bakteriellen Genomen (Bengert *et al.* 2004). In der Riboswitch-Datenbank „RiboD“ sind aktuell 31 verschiedene Riboswitch-Familien mit unterschiedlichen Substrataffinitäten hinterlegt. Hierunter sind jedoch keine Riboswitches für Acetyltransferasen oder Thiolasen zu finden. Anhand der Genomsequenz wurden zwar 51 mögliche Riboswitches für *C. kluyveri* DSM 555^T vorhergesagt, diese sind jedoch nicht mit den potenziellen Thiolase-Genen *CKL_3696 – 3698* assoziiert (RiboD Datenbank, Stand: 06/2023). Dies ist in Übereinstimmung zu den Suchergebnissen mit den Onlinesuchmaschinen „Riboswitch finder“ und „Riboswitch scanner“, da auch hierüber keine Riboswitches für den Genabschnitt *CKL_3696 – 3698* gefunden werden konnten (3.8.1). Beide Programme berücksichtigen zudem bei ihrer Suche nach Riboswitches auch mögliche Sekundärstrukturen der eingegebenen RNA-Sequenzen (Bengert *et al.* 2004, Mukherjee *et al.* 2016).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Onlineprogramme zur Vorhersage von Riboswitches könnten jedoch in ihrer Aussagekraft für mögliche Riboswitches im Genus *Clostridium* limitiert gewesen sein. Sie basieren zum Beispiel auf gut charakterisierten RNA-Motiven wie dem Guanin-Riboswitch (Bengert *et al.* 2004). So ist es durchaus denkbar, dass im Clostridien-Genom jene Riboswitches über die Suchmaschinen nicht erkannt werden, welche sich in ihrem Motiv zu stark von bereits bekannten Riboswitch-Strukturen unterscheiden. Dies könnte insbesondere auf die 5'-Enden der Thiolase-mRNA zutreffen, da für diese Gruppe bisher noch keine Riboswitches beschrieben worden sind. Somit bleibt es zum aktuellen Zeitpunkt durchaus möglich, dass Riboswitches im *C. kluyveri* Thiolase-Genabschnitt *CKL_3696 – 3698* annotiert sein könnten. Da Onlinesuchmaschinen

und Datenbanken in der Regel immer wieder aktualisiert werden, ist eine erneute Überprüfung des oben genannten Genabschnitts zu einem späteren Zeitpunkt empfehlenswert.

4.6.3 Episomale Expression einer Thiolase aus *C. acetobutylicum* in *C. kluyveri*

Im Zusammenhang des Metabolic Engineerings von *C. kluyveri* wurde zu Beginn dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die C-Kettenverlängerung und dadurch auch die Synthese von Hexanoat durch eine Erhöhung der Thiolaseaktivität gesteigert werden könnte. Hierfür wurde angenommen, dass die Kondensationsreaktion der Acetyl-CoA Moleküle einen limitierenden Faktor bei der C-Kettenverlängerung darstellt (3.8). Bei ausreichend starker Expression des *thl*-Gens könnten somit mehr Acetyl-CoA Moleküle pro CoA-Ester angehängt werden, was sich günstig auf die Bildung langkettiger Fettsäuren auswirken könnte.

Zur Generierung eines Stamms mit einem Überexpressionsphänotyp könnte entweder direkt die zelleigene Thiolaseexpression modifiziert oder ein Expressionsplasmid eingebracht werden. Bisher liegen nur wenige Informationen zu den *C. kluyveri* eigenen Thiolasen und deren nativen Promotoren vor (4.6.2). Außerdem sind noch keine Promotoren bekannt, welche eine starke Genexpression in *C. kluyveri* hervorrufen können (4.5.4). Daher sollte zunächst die Thiolase eines anderen Organismus zusätzlich episomal in *C. kluyveri* über ein Expressionsplasmid eingebracht werden. Die Entscheidung fiel hierbei auf eine Thiolase von *C. acetobutylicum* (CA_RS14790), da dieses Enzym gut charakterisiert und die Promotorsequenz bereits bekannt ist (Wiesenborn *et al.* 1988, Stim-Herndon *et al.* 1995). Da der Thiolase-Promotor aus *C. acetobutylicum* standardmäßig zur Genexpression in Clostridien verfügbar ist (Girbal *et al.* 2003, Heap *et al.* 2009), war seine Verwendung in *C. kluyveri* ebenfalls vielversprechend. Für das Expressionsplasmid wurde ferner der Ori BP1 gewählt, da sich Plasmide mit diesem Ori bisher sehr gut in *C. kluyveri* haben transformieren lassen (3.7.3). Zudem scheinen Plasmide mit BP1 in anderen Clostridien recht lange stabil vorzuliegen (Heap *et al.* 2009, Lesiak 2015), was für Expressionsplasmide vorteilhaft ist.

Insgesamt entsprach das gemessene, veränderte Produktspektrum des Transkonjuganten CK_Ra9 mit dem Thiolase-Expressionsplasmid den Erwartungen zur Thiolase aus *C. acetobutylicum*. So wurden, im Vergleich zur Vektorkontrolle CK_82 vom Thiolase-Expressionsstamm CK_Ra9 final zwar mehr Butyrat, aber auch insgesamt weniger Hexanoat gebildet (3.8.3). Ein Grund könnte hierfür sein, dass in CK_Ra9 die plasmidcodierte *C. acetobutylicum* Thiolase potenziell in höheren Mengen vorlag als die zelleigenen *C. kluyveri* Thiolasen. Hierfür spricht nicht nur der für die Expression verwendete, stark exprimierende P_{thl} aus *C. acetobutylicum* (Tummala *et al.* 1999, Huang *et al.* 2016), sondern auch der deutliche Nachweis der *C. acetobutylicum* Thiolase-mRNA in den *C. kluyveri* Transkonjuganten CK_Ra9 als Hinweis auf eine aktive Transkription des Gens über P_{thl} (3.8.4).

Dadurch könnte es zu einer ungünstigen Konstellation von Enzymen und vorhandenen Substraten im *C. kluyveri* Transkonjuganten CK_Ra9 gekommen sein.

In *C. acetobutylicum* bilden vor allem die Lösungsmittel Aceton, Acetat und Butyrat, sowie später die Alkohole Ethanol und Butanol die Hauptfermentationsprodukte (McCoy *et al.* 1926). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Thiolase aus diesem Organismus vor allem auf die Kondensation von C₂ zu C₄ Körpern spezialisiert ist. Zudem wurde bereits berichtet, dass hohe Konzentrationen von ATP oder Butyryl-CoA als Feedback-Inhibitoren der *C. acetobutylicum* Thiolase wirken können (Wiesenborn *et al.* 1988). Aufgrund einer erhöhten Thiolaseaktivität in CK_Ra9 könnte zunächst die Acetoacetyl-CoA Menge in CK_Ra9 erhöht gewesen sein. Infolgedessen stieg vermutlich auch die zellinterne Butyryl-CoA-Konzentration in CK_Ra9 an, nach einer schrittweisen Umsetzung des Acetoacetyl-CoA über Hbd, Crt und Bcd/EtfAB. Hierbei wird angenommen, dass mehr Acetoacetyl-CoA zu Bildung von Butyryl-CoA zur Verfügung steht, dieses aber gleichzeitig nicht schnell genug in Butyrat umgesetzt wird, weil die Expressionsstärke von Cat3 in CK_Ra9 nicht verändert wurde. Diese erhöhte Butyryl-CoA-Menge hemmt ihrerseits die *C. acetobutylicum* Thiolaseaktivität (Wiesenborn *et al.* 1988), wodurch wiederum die Kondensationsreaktion von Acetyl-CoA Molekülen zurückgeht. Dieses wäre jedoch nötig, um längere C-Ketten und weiteres ATP zu bilden. Diese Feedback-Inhibition der *C. acetobutylicum* Thiolase konnte vermutlich nur im geringen Ausmaß von den *C. kluyveri* Thiolasen kompensiert werden, wofür auch die geringen Ausbeuten von Hexanoat, sowie das schwächere Wachstum von CK_Ra9 im Vergleich zu den Kontrollen sprechen (3.8.3).

Daher sollte für zukünftige Experimente mit *C. kluyveri* bevorzugt Enzyme aus Caproat-bildenden Organismen verwendet werden, wie zum Beispiel *C. scatologenes* oder *C. drakei* (Wirth *et al.* 2021). Somit könnte verhindert werden, dass später die Intermediate des *C. kluyveri* Stoffwechsels einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität haben. Diese sind, bezogen auf den RBO-Stoffwechsel, neben Acetyl-CoA auch Butyryl-CoA und Caproyl-CoA (Seedorf *et al.* 2008). Ferner deuten die Ergebnisse der Thiolaseexpression darauf hin, dass P_{thl} aus *C. acetobutylicum* auch in *C. kluyveri* aktiv ist. Ohne einen aktiven P_{thl} hätten sonst weder die Thiolase-mRNA (3.8.4), noch das veränderte Produktspektrum in CK_Ra9 beobachtet werden können (3.8.3). Daher könnte P_{thl} aus *C. acetobutylicum* eine vielversprechende Positivkontrolle für einen Promotortest über FAST in *C. kluyveri* sein.

4.6.4 Metabolic Engineering auf Basis der nativen *C. kluyveri* Thiolasen

Insgesamt lieferten die Expressionsexperimente mit der Thiolase aus *C. acetobutylicum* in *C. kluyveri* bereits einen ersten Hinweis darauf, dass eine Thiolaseüberexpression ein vielversprechender Ansatz zur Steigerung der Fettsäurebiosynthese über RBO sein könnte (3.8.3).

Dennoch spricht einiges dafür, dass für zukünftige Experimente bevorzugt die Expressionsstärke der nativen *C. kluyveri* Thiolasen modifiziert werden sollte. Zum einen gestaltete sich die Konstruktion der Expressionsplasmide mit verschiedenen Thiolasen in *E. coli* als schwierig. So konnten die Expressionsplasmide mit den Thiolasen aus *C. acetobutylicum* und *C. saccharobutylicum* erst konstruiert werden, als diese wie in Kapitel 3.8.2 geschildert, zwischen zwei transkriptionellen Terminatoren eingebracht wurden (Forschungspraktikum Karina Krammer, TU München 2022, nicht veröffentlicht). Derselbe Ansatz zur Konstruktion von Plasmiden mit den nativen *C. kluyveri* Thiolasen *thIA1-A3* scheiterte hingegen sogar mehrfach (nicht gezeigt). Hier könnte das Problem analog zu *codBA* ebenfalls auf den clostridialen Thiolase-Promotor zurückzuführen sein, da beispielsweise der P_{thi} von *C. acetobutylicum* als stark gilt (Yang *et al.* 2017). Zum anderen bringt eine direkte Integration eines Gens oder Promotors in das Genom eines Organismus einige zusätzliche Vorteile mit sich. So fällt nicht nur die Notwendigkeit einer Selektion durch Antibiotika für das Plasmid weg, was vor allem im Bereich der Co-Kultivierung vorteilhaft ist (4.5.7). Zudem kann sich eine genomische Integration später auch positiv auf das metabolische Verhalten des Stamms auswirken, wie die Experimente von Lauer *et al.* (2022) an *C. ljungdahlii* veranschaulichen. Hierbei wurde vermutet, dass infolge mehrerer episomaler Genkopien ein Stoffwechsellgleichgewicht entstehen könnte, weil diese zu exzessiv transkribiert werden (Mairhofer *et al.* 2013). Je nach Enzym könnte sich dies beispielsweise negativ auf die Art und Menge der gebildeten Produkte auswirken. Ferner könnte durch die Verwendung der nativen *C. kluyveri* Thiolasen umgangen werden, dass es wie bei der Thiolase aus *C. acetobutylicum*, zu einer unerwünschten Feedback-Inhibierung durch Stoffwechselintermediate kommt (4.6.3). Somit müsste nicht nach weiteren Thiolasen aus anderen Organismen gesucht werden.

Bevor jedoch die Expressionsstärke der nativen *C. kluyveri* Thiolasen *in vivo* modifiziert werden kann, sollte vorab noch geklärt werden, ob, wie bereits vermutet, eine Substratspezifität der drei Enzyme *thIA1-A3* vorliegt. Für die Aktivitätsbestimmung von Thiolasen ist bereits ein photometrisches Assay beschrieben worden (Hartmanis *et al.* 1982). Hierbei wird, im Gegensatz zur Fettsäurebildungsreaktion *in vivo*, die Thiolaseaktivität anhand der CoA-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Spaltung bestimmt (Hartmanis *et al.* 1984). Da nur Acetoacetyl-Thiol-Ester eine charakteristische Absorption zwischen 280 und 320 nm aufweisen, lässt sich die Thiolaseaktivität über die Abnahme der Absorption bei 303 nm im Photometer determinieren (Stern 1955). Somit könnten die drei *C. kluyveri* Thiolasen beispielsweise einzeln in *E. coli* exprimiert und auf verschiedenen Acetoacetyl-Substraten getestet werden. Sollte tatsächlich eine Substratspezifität vorliegen, könnte so direkt diejenige Thiolase verstärkt in *C. kluyveri* exprimiert werden, welche eine höhere Affinität für C₄ oder C₆ CoA-Ester besitzt.

4.6.5 Metabolic Engineering über eine Alkohol Aldehyd Dehydrogenase (AdhE)

Ein weiterer Ansatz zum Metabolic Engineering von *C. kluyveri* zur autotrophen Co-Kultivierung mit *C. carboxidivorans* bestand darin, zusätzliche Gene zur Verbesserung der Alkoholsynthese in *C. kluyveri* einzubringen. Für *C. carboxidivorans* wurde auf Basis einer Monokulturstudie von Doll *et al.* (2018) angenommen, dass eine effektive Reduktion von Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen im Reaktor erst nach einem Absenken des pH-Werts von 6,0 auf 5,0 stattfindet (Abbildung 1.2). Zur Verbesserung der Alkoholsynthese könnten daher die Expression zusätzlicher Enzyme in *C. kluyveri* sinnvoll sein. Laut dem ursprünglichen Projektplan für SynCoClos aus dem Jahr 2019 sollten hierzu eine Aldehyd Ferredoxin Oxidoreduktase (AOR) in Kombination mit einer Alkohol Dehydrogenase (ADH) in *C. kluyveri* eingebracht werden, da diese Enzyme nach Nissen *et al.* (2019) essenziell für die anaerobe Alkoholsynthese sind.

Eine Besonderheit der AOR besteht hierbei jedoch in der Abhängigkeit des Enzyms vom Co-Faktor Trungsten (=Wolfram). Dies kommt in biologischen Systemen nur sehr selten vor, wie beispielsweise beim hyperthermophilen Organismus *Pyrococcus furiosus* (Mukund *et al.* 1991, Kletzin *et al.* 1996). Für *C. kluyveri* ist anhand der Genomsequenz beispielsweise bekannt, dass Molybdän-, Vanadium- und Eisenabhängige Nitrogenasen an der Stickstofffixierung in diesem Organismus beteiligt sein könnten (Seedorf *et al.* 2008). Enzyme mit Wolfram als Co-Faktor konnten hingegen bei einer Untersuchung der Genomsequenz in KEGG nicht gefunden werden. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass Wolfram in *C. kluyveri* als Co-Faktor für die AOR zur Verfügung steht. Deshalb wurde alternativ zur AOR eine kombinierte Alkohol Aldehyd Dehydrogenase (AdhE) für das Metabolic Engineering von *C. kluyveri* in Betrachtung gezogen. Die AdhE ist nicht nur unabhängig vom Co-Faktor Wolfram, sondern kann direkt Acyl-CoA Ester aus der RBO in die korrespondierenden Alkohole reduzieren (Fontaine *et al.* 2002, Dekishima *et al.* 2011). Damit wäre bei der AdhE, im Gegensatz zur AOR, lediglich die Expression eines einzelnen Enzyms für die Alkoholsynthese ausreichend. Zwar wurde mittlerweile gezeigt, dass bei einer autotrophen Co-Kultivierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* auch bei pH 6.0 die Reduktion zu den Alkoholen Butanol und Hexanol gut stattfindet (Bäumler *et al.* 2022). Dennoch könnte die Expression von AdhE2 aus *C. acetobutylicum* in *C. kluyveri* noch immer sinnvoll sein, da sich das Enzym nicht nur positiv auf die Alkoholbildung, sondern auch auf das Gleichgewicht der Redoxäquivalente in *C. kluyveri* unter CO-Stress auswirken könnte. Dieser Zusammenhang wird genauer in Abschnitt 4.6.6 erläutert.

4.6.6 Untersuchungen zur CO-Sensitivität von *C. kluyveri*

CO bildet neben CO₂ und H₂ einen wichtigen Hauptbestandteil des Synthesegases (Daniell *et al.* 2012, Diender *et al.* 2016, Molitor *et al.* 2016a), welches zukünftig in der autotrophen Co-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* zum Einsatz kommen soll. Kultivierungsversuche deuten jedoch

eindeutig darauf hin, dass das Wachstum von *C. kluyveri* bei hohen CO-Partialdrücken deutlich vermindert ist (Diender *et al.* 2016, Bäumlner *et al.* 2022, Bäumlner *et al.* 2023). Zusätzlich konnte bei Fermentationen mit *C. kluyveri* beobachtet werden, dass die Anwesenheit von CO mit einer verminderten H₂-Bildungsrate verbunden ist (Bäumlner *et al.* 2023).

Kohlenmonoxid ist bereits dafür bekannt, die Aktivität von [FeFe] Hydrogenasen zu hemmen (Lemon *et al.* 1999). Die beiden [FeFe] Hydrogenasen von *C. kluyveri* spielen indes eine wichtige Rolle bei der Regenerierung von Redoxäquivalenten, indem sie durch die Reduktion von Protonen zu H₂ Ferredoxin oxidieren (Seedorf *et al.* 2008). Diese Bildung von molekularem H₂ könnte, wie bereits von Schoberth *et al.* (1969) postuliert, von zentraler Bedeutung für den *C. kluyveri* Energiestoffwechsel sein. Möglicherweise könnten somit sowohl das reduzierte Wachstum als auch die verminderte H₂-Bildung in einer Hemmung der [FeFe] Hydrogenasen durch das CO begründet sein. Daher wurde bei der Transkriptomanalyse im Rahmen dieser Arbeit insbesondere der Einfluss von CO auf die Expression der beiden [FeFe] Hydrogenase-Gene *CKL_0841* und *CKL_2257* betrachtet (3.10).

Da sich zwischen der CO- und der Kontroll-Batchfermentation bei 44 von 46 untersuchten Genen keine wesentlichen Unterschiede im *C. kluyveri* Genexpressionsprofil gezeigt haben (Tabelle 6.8), kann insgesamt von einer guten Reproduzierbarkeit des hier gezeigten Transkriptionsexperiments ausgegangen werden. Daneben entsprach das veränderte Expressionsmuster der [FeFe] Hydrogenase-Gene von *C. kluyveri* in Anwesenheit von CO den Erwartungen, da eine mögliche Folge der durch das CO gehemmten [FeFe] Hydrogenasen die in Tabelle 3.4 für *C. kluyveri* beobachtete, verstärkte Expression der korrespondierenden Gene sein könnte. Dies könnte dazu dienen, um die verlorene [FeFe] Hydrogenaseaktivität infolge der CO-Hemmung zu kompensieren und damit einem Ungleichgewicht der Redoxäquivalente im RBO-Stoffwechsel entgegenzuwirken. Dennoch scheint die Stoffwechselaktivität trotz erhöhter Hydrogenaseexpression in *C. kluyveri* unter CO-Begasung insgesamt zurückzugehen, worauf ferner auch die verminderte CO₂-Aufnahmerate in diesem Zeitraum hindeutet (Abbildung 6.8). Der erneute starke Rückgang der [FeFe] Hydrogenase-Genexpression nach dem Stopp der CO-Begasung (23,5 h) lässt zudem vermuten, dass es sich bei der Interaktion zwischen dem CO und den Hydrogenasen um eine reversible Hemmung handelt. Insbesondere, da die Expression beider [FeFe] Hydrogenase-Gene in der CO-Batchfermentation eine Stunde nach dem Abbruch der CO-Begasung um ein Vielfaches schwächer war als zur selben Prozesszeit während der Kontroll-Batchfermentation ohne CO (Tabelle 3.4). Dies deutet darauf hin, dass zuvor gehemmte [FeFe] Hydrogenasen ohne CO ihre Aktivität wieder aufnehmen konnten.

Zudem konnten durch die Transkriptomanalyse von *C. kluyveri* mit Ausnahme der [FeFe] Hydrogenasen keine weiteren CO-sensitiven Gene identifiziert werden, welche laut Seedorf *et al.* (2008) essentiell an der C-Kettenverlängerung beteiligt sind. Zusammengefasst bildet damit die

reversible Hemmung der [FeFe] Hydrogenasen durch CO in *C. kluyveri* einen zentralen Flaschenhals für eine optimierte autotrophe Synthesegas-Fermentierung mit diesem Organismus.

Eine mögliche Strategie, um diese Limitierung zu überwinden, wäre die zusätzliche Expression des Enzyms AdhE2 aus *C. acetobutylicum* in *C. kluyveri*. Diese kombinierte Alkohol Aldehyd Dehydrogenase benötigt für ihre enzymatische Reaktion NADH als Reduktionsmittel (Fontaine *et al.* 2002). Das durch die AdhE2 generierte NAD⁺ könnte damit nicht nur über den am Rnf-Komplex gebildeten Protonengradienten zur ATP-Synthese beitragen, sondern gleichzeitig auch reduziertes Ferredoxin regenerieren (Seedorf *et al.* 2008). Somit könnte durch die AdhE2 nicht nur direkt in *C. kluyveri* Fettsäuren zu Alkoholen reduziert werden. Gleichzeitig könnte dadurch auch die Funktion der durch das CO reversibel gehemmten [FeFe] Hydrogenasen kompensiert werden, was sich möglicherweise auch positiv auf das Wachstum und die metabolische Aktivität von *C. kluyveri* in der Synthesegas-fermentierenden Co-Kultur auswirken könnte. Hierbei sollte beachtet werden, dass die AdhE2 jedoch auch mit anderen Enzymen des RBO-Stoffwechsels um Acyl-CoA Ester konkurriert. Dies könnte sich wiederum negativ auf die C-Kettenverlängerung auswirken. Um negative Effekte auf die Bildung mittelkettiger Fettsäuren zu verhindern, sollte daher die Expressionsstärke der AdhE2 in *C. kluyveri* über geeignete Promotoren möglichst gut ausbalanciert werden.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die genetische Arbeit mit Clostridien sollte trotz all der Fortschritte in den vergangenen 20 Jahren keinesfalls als trivial angesehen werden, da jeder neu zu transformierende Organismus andere Herausforderungen mit sich bringt. Bei *C. kluyveri* bestand die größte Herausforderung zu Beginn vor allem darin, das vergleichsweise langsame Wachstum des Stamms auf den Substraten Ethanol, Acetat und CO₂ auch im festen Medium zu umgehen. Schlussendlich ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, verschiedene *E. coli*-Clostridium Shuttleplasmide in *C. kluyveri* einzubringen. Es handelt sich hierbei unseres Wissens nach um die erste erfolgreiche Transkonjugation von DNA in diesen Organismus. Neben der noch ausstehenden Deletion des Typ-II RM-Systems besteht mit einer gut funktionierenden Genübertragungsmethodik nun die Möglichkeit, weitere Werkzeuge zur genetischen Modifizierung, wie z.B. das *codBA*-System zur Gegenselektion, in *C. kluyveri* zu etablieren.

Derartige genetische Werkzeuge bietet eine Vielzahl möglicher Anwendungen, wie beispielsweise das Metabolic Engineering von *C. kluyveri* im Kontext der autotrophen Co-Kultivierung mit *C. carboxidivorans* auf Synthesegas. Ziel wäre hierbei im besten Fall ein optimierter *C. kluyveri* Stamm, welcher dazu in der Lage ist, die aktuellen Flaschenhalse in der autotrophen Co-Kultur zu überwinden. Diese sind, nach dem heutigen Wissensstand, ein schwaches Wachstum von *C. kluyveri* in der Co-Kultur, aller Wahrscheinlichkeit aufgrund der Stoffwechsellinhibitorischen Effekte durch das Substrat CO, sowie eine lediglich mit der *C. carboxidivorans* Monokultur vergleichbare Hexanolproduktion (Bäumler *et al.* 2022). Insbesondere die Generierung eines CO-resistenten *C. kluyveri* Stamms wurde bereits als Hauptziel für die zweiten Projektphase des Verbundvorhabens SynCoClos formuliert. Hierbei soll die CO-Resistenz nicht nur durch genetische Modifizierung über das Einfügen des Gens *AdhE2*, sondern darüber hinaus auch über gezielte Laborevolution generiert werden. Ferner könnte ein optimierter *C. kluyveri* RBO-Stoffwechsel dazu beitragen, die aktuell von der Co-Kultur gebildete Nebenprodukte wie Ethanol und Butanol effektiver bis zum gewünschten Endprodukt Hexanol oder sogar bis zum Oktanol umzusetzen. Letztere Alkohole sind, aufgrund ihrer höheren Energiedichte, insbesondere im Bereich der Kraftstoffe von großem Interesse. Für diesen Ansatz könnte eine veränderte Genexpression der drei *C. kluyveri* Thiolasen vielversprechend sein.

Darüber hinaus kann zukünftig bei der Arbeit mit der synthetischen, autotrophen Co-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* auf Synthesegas auf eine 23S rRNA-basierte, *in solution* FISH-FC Messmethode zurückgegriffen werden. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit gemeinsam mit dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik erfolgreich als Monitoringmethode für anaerobe Co-Kulturen entwickelt. Sie bietet ein wichtiges Hilfsmittel, um auf Basis der Zellzahldynamik die Prozessparameter dieser synthetischen Co-Kultur noch weiter optimieren zu können. Da die für die

FISH-Färbung verwendeten Oligonukleotidsonden organismusabhängig ausgetauscht werden können, ergibt sich daraus eine flexible Anwendung der FISH-FC Methode zur Überwachung verschiedenster Co-Kultursysteme. Ferner sind die beiden spezifischen 23S rRNA Oligonukleotidsonden ClosKluy und ClosCarb, unter Berücksichtigung der hier genannten Limitierungen, für die Quantifizierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* in verschiedenen Umweltproben geeignet.

Alles in allem könnten damit die Studien zur Co-Kultivierung auf Synthesegas, sowie die genetische Arbeit mit dem C-Kettenverlängernden, sekundären Gärer *C. kluyveri* nach ihrer Weiterentwicklung und Einsatz in industriellen Produktionsverfahren einen wichtigen Beitrag zur umweltfreundlichen und CO₂-neutralen Produktion von Kraftstoffen und Chemikalien leisten. Dies kann als besonders nachhaltig angesehen werden, da hierbei Substanzen, welche normalerweise die Atmosphäre und Umwelt verschmutzen würden, durch Bakterien in neue Rohmaterialien umgewandelt werden. Die Co-Kultivierung von syngasverwertenden, acetogenen Bakterien mit C-Kettenverlängernden Clostridien, ggf. nach deren gentechnischer Optimierung unter Einsatz genetischer Werkzeuge wie in dieser Arbeit beschrieben, kann hoffentlich künftig einen wichtigen Beitrag zur nachhaltigen fermentativen Herstellung wertvoller Chemikalien auf Basis des Recyclings gasförmiger Kohlenstoffverbindungen leisten.

5 Literaturverzeichnis

- Aistleitner, K., T. Sieper, I. Stürz, R. Jeske, S. Tritscheller, S. Mantel, A. Tscherne, S. Zange, K. Stoecker and R. Wölfel (2020). "NOTIFy (non-toxic lyophilized field)-FISH for the identification of biological agents by Fluorescence *in situ* Hybridization." PLoS One **15**(3): e0230057.
- Alvarez, G., M. González, S. Isabal, V. Blanc and R. León (2013). "Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide." AMB Express **3**(1): 1.
- Amann, R. and B. M. Fuchs (2008). "Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques." Nat Rev Microbiol **6**(5): 339-348.
- Amann, R. I. (1995). *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. Methods Molecular Ecology Manual. A. D. L. Akkerman, J. D. v. Elsas and F. J. d. Bruijn. Dordrecht, The Netherlands: pp. 1-15.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux and D. A. Stahl (1990b). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." Appl Environ Microbiol **56**(6): 1919-1925.
- Amann, R. I., L. Krumholz and D. A. Stahl (1990a). "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology." J Bacteriol **172**(2): 762-770.
- Andersen, L., M. Kilstrup and J. Neuhard (1989). "Pyrimidine, purine and nitrogen control of cytosine deaminase synthesis in *Escherichia coli* K 12. Involvement of the *glnLG* and *purR* genes in the regulation of *codA* expression." Arch Microbiol **152**(2): 115-118.
- Arnaud, M., A. Chastanet and M. Débarbouillé (2004). "New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria." Appl Environ Microbiol **70**(11): 6887-6891.
- Baker, J. P., J. Sáez-Sáez, S. I. Jensen, A. T. Nielsen and N. P. Minton (2022). "A clean *in-frame* knockout system for gene deletion in *Acetobacterium woodii*." J Biotechnol **353**: 9-18.
- Banerjee, A., C. Leang, T. Ueki, K. P. Nevin and D. R. Lovley (2014). "Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii*." Appl Environ Microbiol **80**(8): 2410-2416.
- Barker, H. A. (1937). "The production of caproic and butyric acids by the methane fermentation of ethyl alcohol." Arch Microbiol **8**: 415-421.
- Barker, H. A. (1947). "*Clostridium kluveri*." Antonie Van Leeuwenhoek **12**(1-4): 167-176.
- Barker, H. A., M. D. Kamen and B. T. Bornstein (1945). "The Synthesis of Butyric and Caproic Acids from Ethanol and Acetic Acid by *Clostridium kluveri*." Proc Natl Acad Sci U S A **31**(12): 373-381.
- Barker, H. A. and S. M. Taha (1942). "*Clostridium kluverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol." J Bacteriol **43**(3): 347-363.
- Bäumler, M., V. Burgmaier, F. Herrmann, J. Mentges, M. Schneider, A. Ehrenreich, W. Liebl and D. Weuster-Botz (2023). "Continuous Production of Ethanol, 1-Butanol and 1-Hexanol from CO

Literaturverzeichnis

- with a Synthetic Co-Culture of *Clostridia* Applying a Cascade of Stirred-Tank Bioreactors." Microorganisms **11**(4).
- Bäumler, M., M. Schneider, A. Ehrenreich, W. Liebl and D. Weuster-Botz (2022). "Synthetic co-culture of autotrophic *Clostridium carboxidivorans* and chain elongating *Clostridium kluyveri* monitored by flow cytometry." Microb Biotechnol **15**(5): 1471-1485.
- Beimfohr, C., A. Krause, R. Amann, W. Ludwig and K.-H. Schleifer (1993). "In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci." Syst Appl Microbiol **16**(3): 450-456.
- Bengelsdorf, F. R., M. H. Beck, C. Erz, S. Hoffmeister, M. M. Karl, P. Riegler, S. Wirth, A. Poehlein, D. Weuster-Botz and P. Dürre (2018). "Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO₂+H₂ Fermentation." Adv Appl Microbiol **103**: 143-221.
- Bengelsdorf, F. R., M. Straub and P. Dürre (2013). "Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation." Environ Technol **34**(13-16): 1639-1651.
- Bengert, P. and T. Dandekar (2004). "Riboswitch finder--a tool for identification of riboswitch RNAs." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W154-159.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Bielzer, S. (2019). Herstellung von Butanol, Hexanol und Capronsäure auf Basis CO und CO₂ mittels Fermentation von acetogenen Bakterien zusammen mit *C. kluyveri* und Untersuchung der beteiligten Faktoren, Universität Ulm.
- Bimmer, M., M. Mientus, A. Klingl, A. Ehrenreich and W. Liebl (2022). "The Roles of the Various Cellulose Biosynthesis Operons in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769." Appl Environ Microbiol **88**(7): e0246021.
- Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel (2014). "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." Bioinformatics **30**(15): 2114-2120.
- Bornstein, B. T. and H. A. Barker (1948a). "The Nutrition of *Clostridium kluyveri*." J Bacteriol **55**(2): 223-230.
- Bornstein, B. T. and H. A. Barker (1948b). "The energy metabolism of *Clostridium kluyveri* and the synthesis of fatty acids." J Biol Chem **172**(2): 659-669.
- Bourniquel, A. A. and T. A. Bickle (2002). "Complex restriction enzymes: NTP-driven molecular motors." Biochimie **84**(11): 1047-1059.
- Breault, R. W. (2010). "Gasification processes old and new: a basic review of the major technologies." Energies **3**(2): 216-240.
- Bruder, M. R., M. E. Pyne, M. Moo-Young, D. A. Chung and C. P. Chou (2016a). "Extending CRISPR-Cas9 Technology from Genome Editing to Transcriptional Engineering in the Genus *Clostridium*." Appl Environ Microbiol **82**(20): 6109-6119.
- Burton, R. M. and E. R. Stadtman (1953). "The oxidation of acetaldehyde to acetyl coenzyme A." J Biol Chem **202**(2): 873-890.

- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele and C. T. Wittwer (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-622.
- Cañadas, I. C., D. Groothuis, M. Zygouropoulou, R. Rodrigues and N. P. Minton (2019). "RiboCas: A Universal CRISPR-Based Editing Tool for *Clostridium*." ACS Synth Biol **8**(6): 1379-1390.
- Candry, P., T. Van Daele, K. Denis, Y. Amerlinck, S. J. Andersen, R. Ganigué, J. B. A. Arends, I. Nopens and K. Rabaey (2018). "A novel high-throughput method for kinetic characterisation of anaerobic bioproduction strains, applied to *Clostridium kluyveri*." Sci Rep **8**(1): 9724.
- Cartman, S. T., M. L. Kelly, D. Heeg, J. T. Heap and N. P. Minton (2012). "Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production." Appl Environ Microbiol **78**(13): 4683-4690.
- Cartman, S. T. and N. P. Minton (2010). "A mariner-based transposon system for *in vivo* random mutagenesis of *Clostridium difficile*." Appl Environ Microbiol **76**(4): 1103-1109.
- Charubin, K., R. K. Bennett, A. G. Fast and E. T. Papoutsakis (2018). "Engineering *Clostridium* organisms as microbial cell-factories: challenges & opportunities." Metab Eng **50**: 173-191.
- Charubin, K., S. Modla, J. L. Caplan and E. T. Papoutsakis (2020a). "Interspecies Microbial Fusion and Large-Scale Exchange of Cytoplasmic Proteins and RNA in a Syntrophic *Clostridium* Coculture." mBio **11**(5).
- Charubin, K. and E. T. Papoutsakis (2019). "Direct cell-to-cell exchange of matter in a synthetic *Clostridium* syntrophy enables CO₂ fixation, superior metabolite yields, and an expanded metabolic space." Metab Eng **52**: 9-19.
- Charubin, K., H. Streett and E. T. Papoutsakis (2020b). "Development of Strong Anaerobic Fluorescent Reporters for *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium ljungdahlii* Using HaloTag and SNAP-tag Proteins." Appl Environ Microbiol **86**(20).
- Chekli, Y., C. Peron-Cane, D. Dell'Arciprete, J. F. Allemand, C. Li, J. M. Ghigo, A. Gautier, A. Lebreton, N. Desprat and C. Beloin (2020). "Visualizing the dynamics of exported bacterial proteins with the chemogenetic fluorescent reporter FAST." Sci Rep **10**(1): 15791.
- Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe and J. A. Farrow (1994). "The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations." Int J Syst Bacteriol **44**(4): 812-826.
- Croux, C., N. P. Nguyen, J. Lee, C. Raynaud, F. Saint-Prix, M. Gonzalez-Pajuelo, I. Meynial-Salles and P. Soucaille (2016). "Construction of a restriction-less, marker-less mutant useful for functional genomic and metabolic engineering of the biofuel producer *Clostridium acetobutylicum*." Biotechnol Biofuels **9**: 23.
- Cui, G. Z., W. Hong, J. Zhang, W. L. Li, Y. Feng, Y. J. Liu and Q. Cui (2012). "Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation." J Microbiol Methods **89**(3): 201-208.

- Daniell, J., M. Köpke and S. D. Simpson (2012). "Commercial biomass syngas fermentation." Energies **5**(12): 5372-5417.
- Danielsen, S., M. Kilstrup, K. Barilla, B. Jochimsen and J. Neuhard (1992). "Characterization of the *Escherichia coli codBA* operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase." Mol Microbiol **6**(10): 1335-1344.
- De Feyter, R. and D. W. Gabriel (1991). "Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*." J Bacteriol **173**(20): 6421-6427.
- De Pours, M. V., A. Sathiyagnanam, D. Rana, B. R. Kumar and S. Saravanan (2017). "1-Hexanol as a sustainable biofuel in DI diesel engines and its effect on combustion and emissions under the influence of injection timing and exhaust gas recirculation (EGR)." Applied Thermal Engineering **113**: 1505-1513.
- Dekishima, Y., E. I. Lan, C. R. Shen, K. M. Cho and J. C. Liao (2011). "Extending carbon chain length of 1-butanol pathway for 1-hexanol synthesis from glucose by engineered *Escherichia coli*." J Am Chem Soc **133**(30): 11399-11401.
- DeLong, E. F., G. S. Wickham and N. R. Pace (1989). "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells." Science **243**(4896): 1360-1363.
- Diender, M., A. J. Stams and D. Z. Sousa (2016). "Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas." Biotechnol Biofuels **9**: 82.
- Ding, X., C. Wu, J. Huang, H. Li and R. Zhou (2014). "Eubacterial and archaeal community characteristics in the man-made pit mud revealed by combined PCR-DGGE and FISH analyses." Food research international **62**: 1047-1053.
- Doll, K., A. Rückel, P. Kämpf, M. Wende and D. Weuster-Botz (2018). "Two stirred-tank bioreactors in series enable continuous production of alcohols from carbon monoxide with *Clostridium carboxidivorans*." Bioprocess Biosyst Eng **41**(10): 1403-1416.
- Drepper, T., T. Eggert, F. Circolone, A. Heck, U. Krauss, J. K. Guterl, M. Wendorff, A. Losi, W. Gärtner and K. E. Jaeger (2007). "Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen." Nat Biotechnol **25**(4): 443-445.
- Du, Y., W. Zou, K. Zhang, G. Ye and J. Yang (2020). "Advances and Applications of *Clostridium* Co-culture Systems in Biotechnology." Front Microbiol **11**: 560223.
- Dürre, P. (2014). "Physiology and sporulation in *Clostridium*." Microbiology spectrum **2**(4): 2.4. 10.
- Ehsaan, M., W. Kuit, Y. Zhang, S. T. Cartman, J. T. Heap, K. Winzer and N. P. Minton (2016). "Mutant generation by allelic exchange and genome resequencing of the biobutanol organism *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Biotechnol Biofuels **9**: 4.
- Eid, J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. Dewinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J.

Literaturverzeichnis

- Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korfach and S. Turner (2009). "Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules." Science **323**(5910): 133-138.
- Fang, H. H., H. Zhu and T. Zhang (2006). "Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*." Int J Hydrog Energy **31**(15): 2223-2230.
- Feil, R., J. Charlton, A. P. Bird, J. Walter and W. Reik (1994). "Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing." Nucleic Acids Res **22**(4): 695-696.
- Fernández-Blanco, C., M. C. Veiga and C. Kennes (2022). "Efficient production of n-caproate from syngas by a co-culture of *Clostridium acetivum* and *Clostridium kluyveri*." J Environ Manage **302**(Pt A): 113992.
- Flaiz, M., T. Baur, J. Gaibler, C. Kröly and P. Dürre (2022). "Establishment of Green- and Red-Fluorescent Reporter Proteins Based on the Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tag for Use in Acetogenic and Solventogenic Anaerobes." ACS Synth Biol **11**(2): 953-967.
- Fontaine, L., I. Meynial-Salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux and P. Soucaille (2002). "Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." J Bacteriol **184**(3): 821-830.
- Franje, C. A., S. K. Chang, C. L. Shyu, J. L. Davis, Y. W. Lee, R. J. Lee, C. C. Chang and C. C. Chou (2010). "Differential heat stability of amphenicols characterized by structural degradation, mass spectrometry and antimicrobial activity." J Pharm Biomed Anal **53**(4): 869-877.
- Franks, A. H., H. J. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Jansen, F. Schut and G. W. Welling (1998). "Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes." Appl Environ Microbiol **64**(9): 3336-3345.
- Ganigue, R., P. Sánchez-Paredes, L. Baneras and J. Colprim (2016). "Low fermentation pH is a trigger to alcohol production, but a killer to chain elongation." Frontiers in microbiology **7**: 702.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, 3rd and H. O. Smith (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." Nat Methods **6**(5): 343-345.
- Gildemyn, S., B. Molitor, J. G. Usack, M. Nguyen, K. Rabaey and L. T. Angenent (2017). "Upgrading syngas fermentation effluent using *Clostridium kluyveri* in a continuous fermentation." Biotechnol Biofuels **10**: 83.
- Girbal, L., I. Mortier-Barrière, F. Raynaud, C. Rouanet, C. Croux and P. Soucaille (2003). "Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*." Appl Environ Microbiol **69**(8): 4985-4988.
- Gluscock, C. B. and M. J. Weickert (1998). "Using chromosomal lacIQ1 to control expression of genes on high-copy-number plasmids in *Escherichia coli*." Gene **223**(1-2): 221-231.
- Good, N. E. and S. Izawa (1972). "Hydrogen ion buffers." Methods Enzymol **24**: 53-68.

Literaturverzeichnis

- Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa and R. M. Singh (1966). "Hydrogen ion buffers for biological research." Biochemistry **5**(2): 467-477.
- Gottschalk, G. and H. A. Barker (1966). "Synthesis of glutamate and citrate by *Clostridium kluyveri*. A new type of citrate synthase." Biochemistry **5**(4): 1125-1133.
- Greuter, D., A. Loy, M. Horn and T. Rattei (2016). "probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes and primers: new features 2016." Nucleic Acids Res **44**(D1): D586-589.
- Griffin, D. W. and M. A. Schultz (2012). "Fuel and chemical products from biomass syngas: a comparison of gas fermentation to thermochemical conversion routes." Environmental progress & sustainable energy **31**(2): 219-224.
- Gubellini, F., G. Verdon, N. K. Karpowich, J. D. Luff, G. Boël, N. Gauthier, S. K. Handelman, S. E. Ades and J. F. Hunt (2011). "Physiological response to membrane protein overexpression in *E. coli*." Mol Cell Proteomics **10**(10): M111.007930.
- Gyulev, I. S., B. J. Willson, R. C. Hennessy, P. Krabben, E. R. Jenkinson and G. H. Thomas (2018). "Part by Part: Synthetic Biology Parts Used in Solventogenic Clostridia." ACS Synth Biol **7**(2): 311-327.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Haroon, M. F., C. T. Skennerton, J. A. Steen, N. Lachner, P. Hugenholtz and G. W. Tyson (2013). "In-solution fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence-activated cell sorting for single cell and population genome recovery." Methods Enzymol **531**: 3-19.
- Hartmanis, M. G. and S. Gatenbeck (1984). "Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate." Appl Environ Microbiol **47**(6): 1277-1283.
- Hartmanis, M. G. and T. C. Stadtman (1982). "Isolation of a selenium-containing thiolase from *Clostridium kluyveri*: identification of the selenium moiety as selenomethionine." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(16): 4912-4916.
- Hayat, M. A. (2000). Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. Cambridge, Cambridge University Press.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter and N. P. Minton (2007). "The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*." J Microbiol Methods **70**(3): 452-464.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman and N. P. Minton (2009). "A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids." J Microbiol Methods **78**(1): 79-85.
- Heim, R., D. C. Prasher and R. Y. Tsien (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12501-12504.
- Hogardt, M., K. Trebesius, A. M. Geiger, M. Hornef, J. Rosenecker and J. Heesemann (2000). "Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients." J Clin Microbiol **38**(2): 818-825.

- Hoshino, T., L. S. Yilmaz, D. R. Noguera, H. Daims and M. Wagner (2008). "Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH." Appl Environ Microbiol **74**(16): 5068-5077.
- Hu, L., J. Huang, H. Li, Y. Jin, C. Wu and R. Zhou (2018). "Design, optimization and verification of 16S rRNA oligonucleotide probes of fluorescence *in situ* hybridization for targeting *Clostridium* spp. and *Clostridium kluyveri*." J Microbiol Biotechnol **28**(11): 1823-1833.
- Huang, C. N., W. Liebl and A. Ehrenreich (2018). "Restriction-deficient mutants and marker-less genomic modification for metabolic engineering of the solvent producer *Clostridium saccharobutylicum*." Biotechnol Biofuels **11**: 264.
- Huang, H., C. Chai, N. Li, P. Rowe, N. P. Minton, S. Yang, W. Jiang and Y. Gu (2016). "CRISPR/Cas9-Based Efficient Genome Editing in *Clostridium ljungdahlii*, an Autotrophic Gas-Fermenting Bacterium." ACS Synth Biol **5**(12): 1355-1361.
- Hungate, R. (1969). Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Methods in microbiology, Elsevier. **3**: 117-132.
- Hurst, K. M. and R. S. Lewis (2010). "Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation." Biochem Eng J **48**(2): 159-165.
- Jennert, K. C. B., C. Tardif, D. I. Young and M. Young (2000). "Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319." Microbiology (Reading) **146 Pt 12**: 3071-3080.
- Joseph, R. C., N. M. Kim and N. R. Sandoval (2018). "Recent Developments of the Synthetic Biology Toolkit for *Clostridium*." Front Microbiol **9**: 154.
- Kalyuzhnaya, M. G., R. Zabinsky, S. Bowerman, D. R. Baker, M. E. Lidstrom and L. Chistoserdova (2006). "Fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations." Appl Environ Microbiol **72**(6): 4293-4301.
- Keis, S., R. Shaheen and D. T. Jones (2001). "Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 6): 2095-2103.
- Keller, K. L., K. S. Bender and J. D. Wall (2009). "Development of a markerless genetic exchange system for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and its use in generating a strain with increased transformation efficiency." Appl Environ Microbiol **75**(24): 7682-7691.
- Kenealy, W. R. and D. M. Waselefsky (1985). "Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate." Arch Microbiol **141**: 187-194.
- Khan, M. U. and B. K. Ahring (2019). "Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications - A review." Biomass and Bioenergy **128**: 105325.
- Kletzin, A. and M. W. Adams (1996). "Tungsten in biological systems." FEMS Microbiol Rev **18**(1): 5-63.
- Köpke, M., C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Wollherr, A. Ehrenreich, W. Liebl, G. Gottschalk and P. Dürre (2010). "*Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(29): 13087-13092.

- Kostner, D. (2014). Entwicklung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems für Acetobacteraceae, Technische Universität München.
- Kostner, D., B. Peters, M. Mientus, W. Liebl and A. Ehrenreich (2013). "Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains." Appl Microbiol Biotechnol **97**(18): 8341-8349.
- Kostner, D., M. Rachinger, W. Liebl and A. Ehrenreich (2017). "Markerless deletion of putative alanine dehydrogenase genes in *Bacillus licheniformis* using a *codBA*-based counterselection technique." Microbiology (Reading) **163**(11): 1532-1539.
- Kühnlein, U. and W. Arber (1972). "Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. XV. The role of nucleotide methylation in *in vitro* B-specific modification." J Mol Biol **63**(1): 9-19.
- Landstorfer, R., S. Simon, S. Schober, D. Keim, S. Scherer and K. Neuhaus (2014). "Comparison of strand-specific transcriptomes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 (EHEC) under eleven different environmental conditions including radish sprouts and cattle feces." BMC Genomics **15**: 353.
- Lauer, I., G. Philipps and S. Jennewein (2022). "Metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the production of hexanol and butanol from CO₂ and H₂." Microb Cell Fact **21**(1): 85.
- Lawson, P. A. and F. A. Rainey (2016). "Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species." Int J Syst Evol Microbiol **66**(2): 1009-1016.
- LeBlanc, D. J., L. N. Lee and A. Abu-Al-Jaibat (1992). "Molecular, genetic, and functional analysis of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin." Plasmid **28**(2): 130-145.
- Lemon, B. J. and J. W. Peters (1999). "Binding of exogenously added carbon monoxide at the active site of the iron-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum*." Biochemistry **38**(40): 12969-12973.
- Lesiak, J. M. (2015). Investigation of xylose and arabinose metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and *Clostridium saccharobutylicum* NCP 262, Technische Universität München.
- Lesiak, J. M., W. Liebl and A. Ehrenreich (2014). "Development of an *in vivo* methylation system for the solventogen *Clostridium saccharobutylicum* NCP 262 and analysis of two endonuclease mutants." J Biotechnol **188**: 97-99.
- Lewis, M., G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan and P. Lu (1996). "Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer." Science **271**(5253): 1247-1254.
- Li, C., M. A. Plamont, H. L. Sladitschek, V. Rodrigues, I. Aujard, P. Neveu, T. Le Saux, L. Jullien and A. Gautier (2017). "Dynamic multicolor protein labeling in living cells." Chem Sci **8**(8): 5598-5605.
- Li, F., C. H. Hagemeyer, H. Seedorf, G. Gottschalk and R. K. Thauer (2007). "Re-citrate synthase from *Clostridium kluyveri* is phylogenetically related to homocitrate synthase and isopropylmalate synthase rather than to Si-citrate synthase." J Bacteriol **189**(11): 4299-4304.
- Liebl, W., A. Bayerl, B. Schein, U. Stillner and K. H. Schleifer (1989). "High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells." FEMS Microbiol Lett **53**(3): 299-303.

Literaturverzeichnis

- Liew, F., M. E. Martin, R. C. Tappel, B. D. Heijstra, C. Mihalcea and M. Köpke (2016). "Gas Fermentation-A Flexible Platform for Commercial Scale Production of Low-Carbon-Fuels and Chemicals from Waste and Renewable Feedstocks." Front Microbiol **7**: 694.
- Liou, J. S., D. L. Balkwill, G. R. Drake and R. S. Tanner (2005). "*Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 5): 2085-2091.
- Ljungdahl, L. G. (1986). "The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria." Annu Rev Microbiol **40**: 415-450.
- Ludwig, W. and K. H. Schleifer (1994). "Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis." FEMS Microbiol Rev **15**(2-3): 155-173.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüssmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer (2004). "ARB: a software environment for sequence data." Nucleic Acids Res **32**(4): 1363-1371.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl and I. S. Pretorius (2002). "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 506-577, table of contents.
- Mairhofer, J., T. Scharl, K. Marisch, M. Cserjan-Puschmann and G. Striedner (2013). "Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions." Appl Environ Microbiol **79**(12): 3802-3812.
- Mandal, M. and R. R. Breaker (2004). "Gene regulation by riboswitches." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 451-463.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner and K.-H. Schleifer (1992). "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions." Syst Appl Microbiol **15**(4): 593-600.
- Martinussen, J. and K. Hammer (1994). "Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*." J Bacteriol **176**(21): 6457-6463.
- McClelland, M. and M. Nelson (1988). "The effect of site-specific DNA methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases--a review." Gene **74**(1): 291-304.
- McCoy, E. F., E. B. Fred, W. H. Peterson and E. G. Hastings (1926). "A cultural study of the acetone butyl alcohol organism: One Plate." J Infect Dis **39**(6): 457-483.
- Meisel, A., T. A. Bickle, D. H. Krüger and C. Schroeder (1992). "Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage." Nature **355**(6359): 467-469.
- Mermelstein, L. D. and E. T. Papoutsakis (1993). "In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Environ Microbiol **59**(4): 1077-1081.

Literaturverzeichnis

- Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett and E. T. Papoutsakis (1992). "Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Biotechnology (N Y) **10**(2): 190-195.
- Minton, N. P., M. Ehsaan, C. M. Humphreys, G. T. Little, J. Baker, A. M. Henstra, F. Liew, M. L. Kelly, L. Sheng, K. Schwarz and Y. Zhang (2016). "A roadmap for gene system development in *Clostridium*." Anaerobe **41**: 104-112.
- Molitor, B., K. Kirchner, A. W. Henrich, S. Schmitz and M. A. Rosenbaum (2016b). "Expanding the molecular toolkit for the homoacetogen *Clostridium ljungdahlii*." Sci Rep **6**: 31518.
- Molitor, B., H. Richter, M. E. Martin, R. O. Jensen, A. Juminaga, C. Mihalcea and L. T. Angenent (2016a). "Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases - Turning steel mills into biorefineries." Bioresour Technol **215**: 386-396.
- Mook, A., M. H. Beck, J. P. Baker, N. P. Minton, P. Dürre and F. R. Bengelsdorf (2022). "Autotrophic lactate production from H₂+CO₂ using recombinant and fluorescent FAST-tagged *Acetobacterium woodii* strains." Appl Microbiol Biotechnol **106**(4): 1447-1458.
- Morrison, G. A. (1953). "Anaerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of certain acids." Nature **171**(4360): 937-938.
- Mukherjee, S., S. Das Mandal, N. Gupta, M. Drory-Retwitzer, D. Barash and S. Sengupta (2019). "RiboD: a comprehensive database for prokaryotic riboswitches." Bioinformatics **35**(18): 3541-3543.
- Mukherjee, S. and S. Sengupta (2016). "Riboswitch Scanner: an efficient pHMM-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences." Bioinformatics **32**(5): 776-778.
- Mukund, S. and M. W. Adams (1991). "The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway." J Biol Chem **266**(22): 14208-14216.
- Müller, R. J., I. Kleeberg and W. D. Deckwer (2001). "Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents." J Biotechnol **86**(2): 87-95.
- Nahvi, A., N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown and R. R. Breaker (2002). "Genetic control by a metabolite binding mRNA." Chem Biol **9**(9): 1043.
- Naik, S. N., V. V. Goud, P. K. Rout and A. K. Dalai (2010). "Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review." Renewable and sustainable energy reviews **14**(2): 578-597.
- Neuhard, J. (1983). Utilization of preformed pyrimidine bases and nucleosides. Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms A. Munch-Petersen. London, Academic: pp 95-148.
- Nissen, L. S. and M. Basen (2019). "The emerging role of aldehyde:ferredoxin oxidoreductases in microbially-catalyzed alcohol production." J Biotechnol **306**: 105-117.
- O'Callaghan, D. and A. Charbit (1990). "High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation." Mol Gen Genet **223**(1): 156-158.

Literaturverzeichnis

- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace and D. A. Stahl (1986). "Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach." Annu Rev Microbiol **40**: 337-365.
- Olsen, G. J. and C. R. Woese (1993). "Ribosomal RNA: a key to phylogeny." Faseb j **7**(1): 113-123.
- Otten, J. K., Y. Zou and E. T. Papoutsakis (2022). "The potential of caproate (hexanoate) production using *Clostridium kluyveri* syntrophic cocultures with *Clostridium acetobutylicum* or *Clostridium saccharolyticum*." Front Bioeng Biotechnol **10**: 965614.
- Papoutsakis, E. T. (2015). "Reassessing the progress in the production of advanced biofuels in the current competitive environment and beyond: what are the successes and where progress eludes us and why." Industrial & Engineering Chemistry Research **54**(42): 10170-10182.
- Paredes, C. J., K. V. Alsaker and E. T. Papoutsakis (2005). "A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology." Nat Rev Microbiol **3**(12): 969-978.
- Patro, R., G. Duggal, M. I. Love, R. A. Irizarry and C. Kingsford (2017). "Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression." Nat Methods **14**(4): 417-419.
- Pernthaler, A., J. Pernthaler and R. Amann (2002b). "Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria." Appl Environ Microbiol **68**(6): 3094-3101.
- Pernthaler, A., C. M. Preston, J. Pernthaler, E. F. DeLong and R. Amann (2002). "Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea." Appl Environ Microbiol **68**(2): 661-667.
- Peters, B., A. Junker, K. Brauer, B. Mühlthaler, D. Kostner, M. Mientus, W. Liebl and A. Ehrenreich (2013). "Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*." Appl Microbiol Biotechnol **97**(6): 2521-2530.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Phillips, J. R., H. K. Atiyeh, R. S. Tanner, J. R. Torres, J. Saxena, M. R. Wilkins and R. L. Huhnke (2015). "Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques." Bioresour Technol **190**: 114-121.
- Plamont, M. A., E. Billon-Denis, S. Maurin, C. Gauron, F. M. Pimenta, C. G. Specht, J. Shi, J. Quérard, B. Pan, J. Rossignol, K. Moncoq, N. Morellet, M. Volovitch, E. Lescop, Y. Chen, A. Triller, S. Vrız, T. Le Saux, L. Jullien and A. Gautier (2016). "Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging *in vivo*." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(3): 497-502.
- Poppert, S., A. Essig, B. Stoehr, A. Steingruber, B. Wirths, S. Juretschko, U. Reischl and N. Wellinghausen (2005). "Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence *in situ* hybridization." J Clin Microbiol **43**(7): 3390-3397.
- Postollec, F., H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson and D. Sohier (2011). "Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology." Food Microbiol **28**(5): 848-861.
- Prazmowski, A. (1880). "Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Inaug." Diss. Leipzig.

- Price, C. and T. A. Bickle (1986). "A possible role for DNA restriction in bacterial evolution." Microbiol Sci **3**(10): 296-299.
- Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies and F. O. Glöckner (2007). "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB." Nucleic Acids Res **35**(21): 7188-7196.
- Purdy, D., T. A. O'Keeffe, M. Elmore, M. Herbert, A. McLeod, M. Bokori-Brown, A. Ostrowski and N. P. Minton (2002). "Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier." Mol Microbiol **46**(2): 439-452.
- Pyne, M. E., M. Moo-Young, D. A. Chung and C. P. Chou (2013). "Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of *Clostridium pasteurianum*." Biotechnol Biofuels **6**(1): 50.
- Pyne, M. E., M. Moo-Young, D. A. Chung and C. P. Chou (2014). "Expansion of the genetic toolkit for metabolic engineering of *Clostridium pasteurianum*: chromosomal gene disruption of the endogenous CpaAI restriction enzyme." Biotechnol Biofuels **7**(1): 163.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F. O. Glöckner (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D590-596.
- Rachinger, M., M. Bauch, A. Strittmatter, J. Bongaerts, S. Evers, K. H. Maurer, R. Daniel, W. Liebl, H. Liesegang and A. Ehrenreich (2013). "Size unlimited markerless deletions by a transconjugative plasmid-system in *Bacillus licheniformis*." J Biotechnol **167**(4): 365-369.
- Reddy, M. V., S. V. Mohan and Y. C. Chang (2018). "Medium-chain fatty acids (MCFA) production through anaerobic fermentation using *Clostridium kluyveri*: effect of ethanol and acetate." Appl Biochem Biotechnol **185**(3): 594-605.
- Richter, H., B. Molitor, M. Diender, D. Z. Sousa and L. T. Angenent (2016b). "A Narrow pH Range Supports Butanol, Hexanol, and Octanol Production from Syngas in a Continuous Co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with In-Line Product Extraction." Front Microbiol **7**: 1773.
- Richter, H., B. Molitor, H. Wei, W. Chen, L. Aristilde and L. Angenent (2016a). "Ethanol production in syngas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* is controlled by thermodynamics rather than by enzyme expression." Energy & Environmental Science **9**(7): 2392-2399.
- Roberts, R. J., M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. A. Bickle, J. Bitinaite, R. M. Blumenthal, S. Degtyarev, D. T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, E. S. Gromova, R. I. Gumport, S. E. Halford, S. Hattman, J. Heitman, D. P. Hornby, A. Janulaitis, A. Jeltsch, J. Josephsen, A. Kiss, T. R. Klaenhammer, I. Kobayashi, H. Kong, D. H. Krüger, S. Lacks, M. G. Marinus, M. Miyahara, R. D. Morgan, N. E. Murray, V. Nagaraja, A. Piekarowicz, A. Pingoud, E. Raleigh, D. N. Rao, N. Reich, V. E. Repin, E. U. Selker, P. C. Shaw, D. C. Stein, B. L. Stoddard, W. Szybalski, T. A. Trautner, J. L. Van Etten, J. M. Vitor, G. G. Wilson and S. Y. Xu (2003). "A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes." Nucleic Acids Res **31**(7): 1805-1812.
- Roberts, R. J., T. Vincze, J. Posfai and D. Macelis (2010). "REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D234-236.

Literaturverzeichnis

- Rogozin, I. B., K. S. Makarova, D. A. Natale, A. N. Spiridonov, R. L. Tatusov, Y. I. Wolf, J. Yin and E. V. Koonin (2002). "Congruent evolution of different classes of non-coding DNA in prokaryotic genomes." Nucleic Acids Res **30**(19): 4264-4271.
- Rohde, A., J. A. Hammerl, B. Appel, R. Dieckmann and S. Al Dahouk (2015). "FISHing for bacteria in food - a promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria?" Food Microbiol **46**: 395-407.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig and K. H. Schleifer (1994). "In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides." Microbiology (Reading) **140 (Pt 10)**: 2849-2858.
- Rückel, A., J. Hannemann, C. Maierhofer, A. Fuchs and D. Weuster-Botz (2021). "Studies on Syngas Fermentation With *Clostridium carboxidivorans* in Stirred-Tank Reactors With Defined Gas Impurities." Front Microbiol **12**: 655390.
- Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne, F. Quinn and C. Mabilat (1996). "Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species." Int J Syst Bacteriol **46**(3): 669-674.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Sato, S., T. Fujiki and K. Matsumoto (2013). "Construction of a stable plasmid vector for industrial production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by a recombinant *Cupriavidus necator* H16 strain." J Biosci Bioeng **116**(6): 677-681.
- Schiel-Bengelsdorf, B. and P. Dürre (2012). "Pathway engineering and synthetic biology using acetogens." FEBS Lett **586**(15): 2191-2198.
- Schneider, M., M. Bäuml, N. M. Lee, D. Weuster-Botz, A. Ehrenreich and W. Liebl (2021). "Monitoring co-cultures of *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium kluyveri* by fluorescence in situ hybridization with specific 23S rRNA oligonucleotide probes." Syst Appl Microbiol **44**(6): 126271.
- Schoberth, S. and G. Gottschalk (1969). "Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*." Arch Mikrobiol **65**(4): 318-328.
- Schwartz, B. S., M. R. Warren, F. A. Barkley and L. Landis (1959). "Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistinmethanesulfonate." Antibiot Annu **7**: 41-60.
- Seedorf, H., W. F. Fricke, B. Veith, H. Brüggemann, H. Liesegang, A. Strittmatter, M. Miethke, W. Buckel, J. Hinderberger, F. Li, C. Hagemeyer, R. K. Thauer and G. Gottschalk (2008). "The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2128-2133.
- Setty, Y., A. E. Mayo, M. G. Surette and U. Alon (2003). "Detailed map of a cis-regulatory input function." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7702-7707.
- Shaw, W. V. (1967). "The enzymatic acetylation of chloramphenicol by extracts of R factor-resistant *Escherichia coli*." J Biol Chem **242**(4): 687-693.
- Smith, H. O. and D. Nathans (1973). "Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes." J Mol Biol **81**(3): 419-423.

Literaturverzeichnis

- Söhling, B. and G. Gottschalk (1993). "Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*." Eur J Biochem **212**(1): 121-127.
- Söhling, B. and G. Gottschalk (1996). "Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*." J Bacteriol **178**(3): 871-880.
- Spirito, C. M., H. Richter, K. Rabaey, A. J. Stams and L. T. Angenent (2014). "Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste." Curr Opin Biotechnol **27**: 115-122.
- Stern, J. R. (1955). "Enzymes of acetoacetate formation and breakdown." Meth Enzymol **1**: 573-585.
- Stim-Herndon, K. P., D. J. Petersen and G. N. Bennett (1995). "Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Gene **154**(1): 81-85.
- Stoecker, K., C. Dorninger, H. Daims and M. Wagner (2010). "Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility." Appl Environ Microbiol **76**(3): 922-926.
- Strätz, M., U. Sauer, A. Kuhn and P. Dürre (1994). "Plasmid Transfer into the Homoacetogen *Acetobacterium woodii* by Electroporation and Conjugation." Appl Environ Microbiol **60**(3): 1033-1037.
- Streett, H. E., K. M. Kalis and E. T. Papoutsakis (2019). "A Strongly Fluorescing Anaerobic Reporter and Protein-Tagging System for *Clostridium* Organisms Based on the Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tag Protein (FAST)." Appl Environ Microbiol **85**(14).
- Suri, B., V. Nagaraja and T. A. Bickle (1984). "Bacterial DNA modification." Curr Top Microbiol Immunol **108**: 1-9.
- Tabor, S. and C. C. Richardson (1985). "A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(4): 1074-1078.
- Tanner, R. S. (2007). "Cultivation of bacteria and fungi." Man Environ Microbiol: 69-78.
- Taylor, S., M. Wakem, G. Dijkman, M. Alsarraj and M. Nguyen (2010). "A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines." Methods **50**(4): S1-5.
- Thauer, R. K., K. Jungermann, H. Henninger, J. Wenning and K. Decker (1968). "The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*." Eur J Biochem **4**(2): 173-180.
- Tindall, B. J., R. Rosselló-Móra, H. J. Busse, W. Ludwig and P. Kämpfer (2010). "Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes." Int J Syst Evol Microbiol **60**(Pt 1): 249-266.
- Tomlinson, N. and H. A. Barker (1954). "Carbon dioxide and acetate utilization by *Clostridium kluyveri*. I. Influence of nutritional conditions on utilization patterns." J Biol Chem **209**(2): 585-595.
- Topp, S., C. M. Reynoso, J. C. Seeliger, I. S. Goldlust, S. K. Desai, D. Murat, A. Shen, A. W. Puri, A. Komeili, C. R. Bertozzi, J. R. Scott and J. P. Gallivan (2010). "Synthetic riboswitches that induce gene expression in diverse bacterial species." Appl Environ Microbiol **76**(23): 7881-7884.

- Tracy, B. P., S. M. Gaida and E. T. Papoutsakis (2010). "Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes." Curr Opin Biotechnol **21**(1): 85-99.
- Tracy, B. P., S. W. Jones, A. G. Fast, D. C. Indurthi and E. T. Papoutsakis (2012). "Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications." Curr Opin Biotechnol **23**(3): 364-381.
- Traub, W. H. and B. Leonhard (1995). "Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents." J Antimicrob Chemother **35**(1): 149-154.
- Tsai, M. M., Y. H. Fu and R. C. Deonier (1990). "Intrinsic bends and integration host factor binding at F plasmid oriT." J Bacteriol **172**(8): 4603-4609.
- Tummala, S. B., N. E. Welker and E. T. Papoutsakis (1999). "Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3793-3799.
- Ukpong, M. N., H. K. Atiyeh, M. J. De Lorme, K. Liu, X. Zhu, R. S. Tanner, M. R. Wilkins and B. S. Stevenson (2012). "Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor." Biotechnol Bioeng **109**(11): 2720-2728.
- Wagner, S., L. Baars, A. J. Ytterberg, A. Klussmeier, C. S. Wagner, O. Nord, P. A. Nygren, K. J. van Wijk and J. W. de Gier (2007). "Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*." Mol Cell Proteomics **6**(9): 1527-1550.
- Walter, J., M. Noyer-Weidner and T. A. Trautner (1990). "The amino acid sequence of the CCGG recognizing DNA methyltransferase M.BsuFI: implications for the analysis of sequence recognition by cytosine DNA methyltransferases." Embo j **9**(4): 1007-1013.
- Wang, J., Y. Su, F. Jia and H. Jin (2013). "Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis." Chem Cent J **7**(1): 62.
- Wasels, F., J. Jean-Marie, F. Collas, A. M. López-Contreras and N. Lopes Ferreira (2017). "A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*." J Microbiol Methods **140**: 5-11.
- Weimer, P. J. and D. M. Stevenson (2012). "Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen." Appl Microbiol Biotechnol **94**(2): 461-466.
- Whitehead, P. R. and N. L. Brown (1985). "A simple and rapid method for screening bacteria for type II restriction endonucleases: enzymes in *Aphanothece halophytica*." Arch Microbiol **141**(1): 70-74.
- Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph and E. T. Papoutsakis (1988). "Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents." Appl Environ Microbiol **54**(11): 2717-2722.
- Willetts, N. S. (1972). "Location of the origin of transfer of the sex factor F." J Bacteriol **112**(2): 773-778.
- Wilson, G. G. (1991). "Organization of restriction-modification systems." Nucleic Acids Res **19**(10): 2539-2566.

Literaturverzeichnis

- Wilson, G. G. and N. E. Murray (1991). "Restriction and modification systems." Annu Rev Genet **25**: 585-627.
- Winkler, H. H. and D. O. Wood (1988). "Codon usage in selected AT-rich bacteria." Biochimie **70**(8): 977-986.
- Winkler, W., A. Nahvi and R. R. Breaker (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." Nature **419**(6910): 952-956.
- Wirth, S. and P. Dürre (2021). "Investigation of putative genes for the production of medium-chained acids and alcohols in autotrophic acetogenic bacteria." Metab Eng **66**: 296-307.
- Wolff, R. A., G. W. Urben, S. M. O'Herrin and W. R. Kenealy (1993). "Dehydrogenases involved in the conversion of succinate to 4-hydroxybutanoate by *Clostridium kluveri*." Appl Environ Microbiol **59**(6): 1876-1882.
- Wood, H. G. (1991). "Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy." Faseb j **5**(2): 156-163.
- Wright, W. W. and H. Welch (1959). "Chemical, biological and clinical observations on colistin." Antibiot Annu **7**: 61-74.
- Wyszomirski, K. H., U. Curth, J. Alves, P. Mackeldanz, E. Möncke-Buchner, M. Schutkowski, D. H. Krüger and M. Reuter (2012). "Type III restriction endonuclease EcoP15I is a heterotrimeric complex containing one Res subunit with several DNA-binding regions and ATPase activity." Nucleic Acids Res **40**(8): 3610-3622.
- Yang, G., D. Jia, L. Jin, Y. Jiang, Y. Wang, W. Jiang and Y. Gu (2017). "Rapid Generation of Universal Synthetic Promoters for Controlled Gene Expression in Both Gas-Fermenting and Saccharolytic *Clostridium* Species." ACS Synth Biol **6**(9): 1672-1678.
- Yang, X., M. Xu and S. T. Yang (2016). "Restriction modification system analysis and development of in vivo methylation for the transformation of *Clostridium cellulovorans*." Appl Microbiol Biotechnol **100**(5): 2289-2299.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-119.
- Yilmaz, S., M. F. Haroon, B. A. Rabkin, G. W. Tyson and P. Hugenholtz (2010). "Fixation-free fluorescence in situ hybridization for targeted enrichment of microbial populations." Isme j **4**(10): 1352-1356.
- Zahl, D., A. Wagner, M. Tscherner and G. Koraimann (2007). "GroEL plays a central role in stress-induced negative regulation of bacterial conjugation by promoting proteolytic degradation of the activator protein TraJ." J Bacteriol **189**(16): 5885-5894.
- Zhang, X., B. Tu, L. R. Dai, P. A. Lawson, Z. Z. Zheng, L. Y. Liu, Y. Deng, H. Zhang and L. Cheng (2018). "*Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new *Hungateiclostridiaceae* fam. nov." Int J Syst Evol Microbiol **68**(10): 3197-3211.
- Zhang, Y., U. Werling and W. Edlmann (2012). "SLICE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method." Nucleic Acids Res **40**(8): e55.

Literaturverzeichnis

- Zhang, Y., U. Werling and W. Edelmann (2014). "Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) cloning method." Methods Mol Biol **1116**: 235-244.
- Zverlov, V. V., D. E. Köck and W. H. Schwarz (2014). The role of cellulose-hydrolyzing bacteria in the production of biogas from plant biomass. Microorganisms in biorefineries, Springer: 335-361.

6 Anhang

6.1 Primersequenzen

Tabelle 6.1. Oligonukleotidsequenzen der Primer zur Konstruktion von potenziellen Methylierungsplasmiden für *C. kluyveri*

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
CKL2314_S_pJL2_fw	AAAAGGGTCAGGCGCCTTATCCATAATTTCTCACCAGAAC	SLiCE Primer <i>C. kluyveri</i> Typ II Methyltransferase <i>CKL_2314</i> mit Überhang für pJL2 (675 bp)
CKL2314_S_pJL2_rev	TACTGCGAGGAGACAAAAGATTTTGAAATACGATAAGTTAGTTGAACC	
pJL2_S_CKL2314_fw	GGTTCAACTAACTTATCGTATTTCAAATCTTTTGTCTCCTCGCAGTA	SLiCE Primer pJL2 Backbone mit Überhang für Gen <i>CKL_2314</i> (2.964 bp)
pJL2_S_CKL2314_rev	GTTCTGGTGAGAAATTATGGATAAGGCGCCTGACCCTTTT	
CKL2332_S_pJL2_fw2	AAAAGGGTCAGGCGCCTATTTTTCTAGGGTTTTACAAG	SLiCE Primer <i>C. kluyveri</i> Typ II Methyltransferase <i>CKL_2332</i> mit Überhang für pJL2 (3.566 bp)
CKL2332_S_pJL2_rev	TACTGCGAGGAGACAAAAGATTATGAATAAGAATGTATAAAAATTTTGC	
pJL2_S_CKL2332_fw	GCAAAATTTTTAATACATTCTTATTCATAATCTTTTGTCTCCTCGCAGTA	SLiCE Primer pJL2 Backbone mit Überhang für Gen <i>CKL_2332</i> (2.967 bp)
pJL2_S_CKL2332rev	CTTGTGAAAACCCTAGAAAAATAAGGCGCCTGACCCTTTT	
CKL2938_S_pJL2_fw	TACTGCGAGGAGACAAAAGATTTTGC GTTATTCTCAA AACTATG	SLiCE Primer <i>C. kluyveri</i> Typ II Methyltransferase <i>CKL_2938</i> mit Überhang für pJL2 (1.874 bp)
CKL2938_S_pJL2_rev	AAAAGGGTCAGGCGCCTCATTCCCACACCACACTTTG	
pJL2_S_CKL2938_fw	CAAAGTGTGGTGTGGGAATGAGGCGCCTGACCCTTTT	SLiCE Primer pJL2 Backbone mit Überhang für Gen <i>CKL_2938</i> (2.960 bp)
pJL2_S_CKL2938_rev	CATAGTTTTGAGGAATAACACGCAAAATCTTTTGTCTCCTCGCAGTA	
CKL3239_S_pJL2_fw	TACTGCGAGGAGACAAAAGATTATGATTAAGGATATTATGAATGCCAA	SLiCE Primer <i>C. kluyveri</i> Typ III Methyltransferase-Gen <i>CKL_3239</i> mit Überhang für pJL2 (2.011 bp)
CKL3239_S_pJL2_rev	AAAGGGTCAGGCGCCTCAATAACGGATATCGAAGTTGATAC	
pJL2_S_CKL3239_fw	TTGGCATTCAATATCCTTAATCATAATCTTTTGTCTCCTCGCAGTA	SLiCE Primer pJL2 Backbone mit Überhang für Gen <i>CKL_3239</i> (2.966 bp)
pJL2_S_CKL3239_rev	GTATCAACTTCGATATCCGTTATTGAGGCGCCTGACCCTTT	

Anhang

Tabelle 6.1. Oligonukleotidsequenzen der Primer zur Konstruktion von potenziellen Methylierungsplasmiden für *C. kluyveri* (Fortsetzung)

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
CKL2671_S_pJL2_fw	AAAAAGGGTCAGGCGCCTTATAAAGCTATAGTTTTTATT TTTCAA	SLiCE Primer <i>C. kluyveri</i> Typ II Methyltransferase-Gen <i>CKL_2671</i> mit Überhang für pJL2 (1.291 bp)
CKL2671_S_pJL2_rev	ATACTGCGAGGAGACAAAAGATTATGCGTGGTGGAAATC G	
pJL2_S_CKL2671_fw	CGATTTCCACCACGCATAATCTTTTGTCTCCTCGCAGTAT	SLiCE Primer pJL2 Backbone mit Überhang für Gen <i>CKL_2671</i> (2.960 bp)
pJL2_S_CKL2671_rev	TTGAAAAATAAAAACTATAGCTTTATAAGGCGCCTGACC CTTTTT	
pJL2_Check_Fw	TCGGCACGTAAGAGGTTTC	Kontrollprimer für Methyltransferase in pJL2
pJL2_Check_Rev	CCGGCGTAATACGACTCAC	
pCKL2671_S_Lac_fw	CATTAATTGCGTTGCGCTCACGCCGGATGGATATGGTGTT C	SLiCE Primer pCKL2671 Backbone mit Überhang für Lac Promotor (4.110 bp)
pCKL2671_S_Lac_rev	CAATTTACACAGGAAACAGCTATGCGTGGTGGAAATCG AC	
Lac_S_pCKL2671_fw	GAACACCATATCCATCCGGCGTGAGCGCAACGCAATTAA TG	SLiCE Primer Lac-Promotor aus pUC19 mit Überhang für pCKL2671 Backbone (165 bp)
Lac_S_pCKL2671_rev	GTCGATTTCCACCACGCATAGCTGTTT CCTGTGTGAAATTG	
pCKL2671_Check_fw	CACGCTGTGAGTAAGTTTC	Kontrollprimer für Lac Promotor in pCKL2671-Lac (755 bp)
pCKL2671_Check_rev	CACCATGAGGCTTCTCAC	

Tabelle 6.2. Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion von Thiolase-Expressionsplasmiden auf Basis von pMTL-Vektoren

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
CacThl_XhoI_fw	TTTTTCTCGAGCTAGCACTTTTCTAGCAATATT	Primer Insertion <i>C. acetobutylicum</i> Thiolase in pMTL82151 über <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> (1.351 bp)
CacThl_BamHI_rv	TTTTTGGATCCTAACTTTGTGTTTTTTTAACAAAA	
CsaThl_BamHI_fw	TTTTTGGATCCTGGTTGGTTACATAATAAGTCTAAA	Primer Insertion <i>C. saccharobutylicum</i> Thiolase in pMTL82151 über <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> (1.389 bp)
CsaThl_XhoI_rv	TTTTTCTCGAGTTAACTCTTCAACTACAAGTG	

Anhang

Tabelle 6.3. Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion von *codBA* Basis-Plasmiden

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
pHE1_S_pCB102_fw	TGGATTATAAGCGGCCGGGTCGAAGTGGGCAAGTTG	SLiCE Primer pHE1-C2
pHE1_S_pCB102_rev	AAAATAATGGCGGCGCGGCACTCCCGACTTAATAACTTC	Backbone mit Überhang für pCB102 (6.907 bp)
pCB102_S_pHE1_fw	GAAGTTATTAAGTCGGGAGTGCCGCGCCGCCATTATTTT	SLiCE Primer pCB102 aus pMTL83151 mit Überhang für pHE1 (1.665 bp)
pCB102_S_pHE1_rev	CAACTTGCCCACTTCGACCCGGCCGCTTATAATCCA	
pMS1_Check_pCB102_fw	GATATTTATGTGGATGGGGAAGAG	Sequenzier-Primer für Ori Tausch in pHE1-C2
pMS1_Check_pCB102_rev	CCATCTAAGTTCCTCTCAAATTC	
pMS1_S_upp_fw	TGAAATGAAAAATAGGAGGAATATATATGGATAACAAG GAAACAAATG	SLiCE Primer pMS1_fdx Backbone mit Überhang für upp Promotor (8.322 bp)
pMS1_S_upp_rev	ATCTATCCTTCTTTGGTGTCTGGGAGCTCGAATTCTAG	
Upp_S_pMS1_fw	CTAGAATTCGAGCTCCAGACACCAAAGAAGGATAGAT	SLiCE Primer upp Promotor <i>C. ljungdahlii</i> mit Überhang für pMS1_fdx (222 bp)
Upp_S_pMS1_rev	CATTTGTTTCCTTGTTATCCATATATATTCCTCTATTTTTC ATTTCA	
CodBA_Seq	CCGGAAGCGAGAAGAATC	Sequenzier-Primer <i>codBA</i> Promotor-Region in pMS1
pMS1_Ori_Fsel_fw	TTTTTTGGCCGGCCGGTTCGAAGTGGGCAAGTT	Primer pMS1_upp
pMS1_Ori_AscI_rv	TTTTTTGGCGCGCCGCACTCCCGACTTAATAACTTC	Backbone für Ori Tausch mit AscI und Fsel (6.862 bp)
pMS2_Check_pCD6_fw	AAGATAAGTTTCGGCAAGTG	Kontrollprimer für Ori im pMS2_upp
pMS2_Check_pCD6_rv	ATCGCTCTAATGAACAAAGATA	

Anhang

Tabelle 6.4. Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion von Deletionsplasmiden für das Typ-II RM-System in *C. kluveri*

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
pMS1_S_2671_fw2	CTGAACTACATCCGATAGACTGACGCGATGGATATGTTC	Gibson Primer pMS1_upp
pMS1_S_2671_rev2	GTCAGGTAGTTGGGGGTATACATGACCCAGTCACGTAG	Backbone mit Überhang für Flanken CKL_2669-2671, Variante 1 (7.678 bp)
2671_UF_fw_2	CTACGTGACTGGGTCATGTATACCCCCAACTACCTGAC	Gibson Primer obere Flanke CKL_2669-2671, Variante 1, Überhang für pMS1_upp (1.067 bp)
2671_UF_rev	GTATAATATTAAGATAAAAAGGTGATTGCAATTATCACCTC GCCTTAGTAC	
2671_LF_fw	GTACTAAGGCGAGGTGATAATTGCAATCACCTTTTATCTT AATATTATAC	Gibson Primer untere Flanke CKL_2669-2671, Variante 1, Überhang für pMS1_upp (1.064 bp)
2671_LF_rev_2	GAACATATCCATCGCGTCAGTCTATCGGATGTAGTTCAG	
S8_ColE1_fw	GGAAAAACGCCAGCAACG	Gibson Primer Flanken
S9_oriT_rv	AATCCTGTATATCGTGCG	Insertion in pMS1_upp, Variante 1
pMS1_upp_ Flanken_fw	GTTATTAAGTCGGGAGTGC	Gibson Primer pMS1_upp / pMS2_upp Variante 2, ohne Überhang (8.446 / 9.229 bp)
pMS1_upp_ Flanken_rv	TGCCGAAACTTATCTTACAC	
CKL2670_UF_fw	GTGTAAGATAAGTTTCGGCACAAGGGAGTCTGACATAGG	Gibson Primer obere Flanke CKL_2670 für pMS1_upp / pMS2_upp Variante 2 mit Überhang (885 bp)
CKL2670_UF_rv	TATTAGTCTTTTGTATAACTTTTCCCCATCTAC	
CKL2670_LF_fw	TGGGGGAAAAGTTATAGCAAAGACTAATACTAGCAA	Gibson Primer untere Flanke CKL_2670 für pMS1_upp / pMS2_upp Variante 2 mit Überhang (879 bp)
CKL2670_LF_rv	GCACTCCCGACTTAATAACTTTATTGGCTGGATTTCCTTG	
2671_UF_fw_JR	GTGTAAGATAAGTTTCGGCATATACCCCCAACTACCTGAC	Gibson Primer obere Flanke CKL_2669-2671 für pMS1_upp / pMS2_upp Variante 2 mit Überhang (1.069 bp)
2671_LF_rev_JR	GCACTCCCGACTTAATAACAGTCTATCGGATGTAGTTCAG	Gibson Primer untere Flanke CKL_2669-2671 für pMS1_upp / pMS2_upp Variante 2 mit Überhang (1.065 bp)

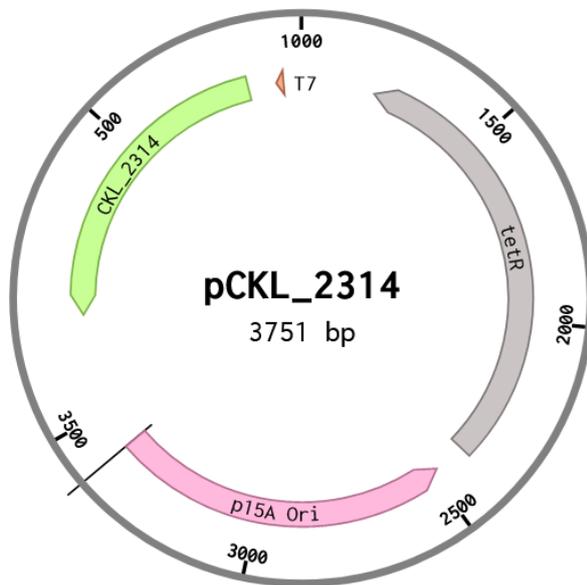
Anhang

Tabelle 6.5. Oligonukleotidsequenzen von Primern für qRT-PCR Messungen und weitere Anwendungen

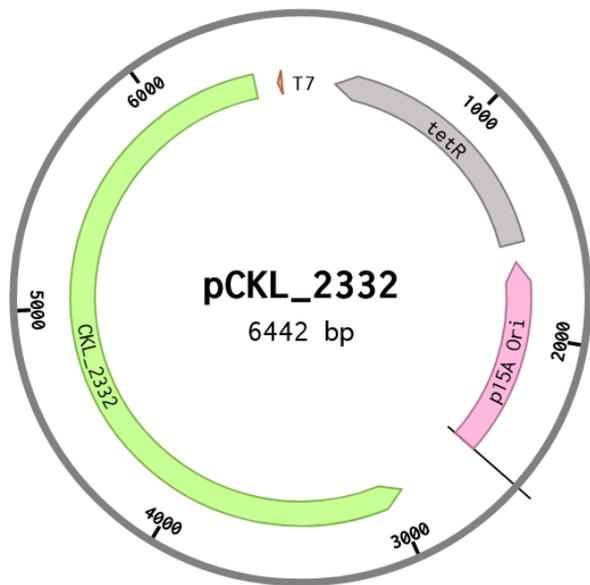
Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
CK_GyrA1_fw	AGGCTATAGGAAATGTGCAAGA	qPCR Primer Referenzgen
CK_GyrA1_rv	TCCTGAGCCATTCTAACAAGAG	DNA Gyrase Untereinheit A (CKL_0007) <i>C. kluyveri</i> (102 bp)
Cac_Thl_fw	ACAGATGAGCACCCCTAGATTTG	qPCR Primer Zielgen
Cac_Thl_rv	AGTACTGCTGCACAGTCATTTA	Thiolase (CA_RS14790) <i>C. acetobutylicum</i> (125 bp)
616Valt	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Primer zur Amplifizierung
100K	GGTTACCTTGTTACGACTT	der bakteriellen 16S rRNA Region (ca. 1,5 kb)
catP_fw	TTTGAGAGGGAACCTTAGATGG	Kontrollprimer für die
catP_rv	ACTATTTATCAATTCCTGCAATTCG	Antibiotika-Resistenz <i>catP</i> in pMTL-Plasmiden (638 bp)

6.2 Plasmidkarten

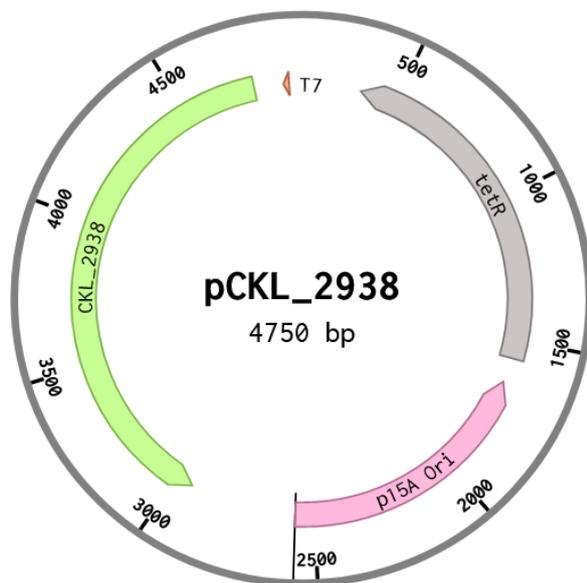
A



B



C



D

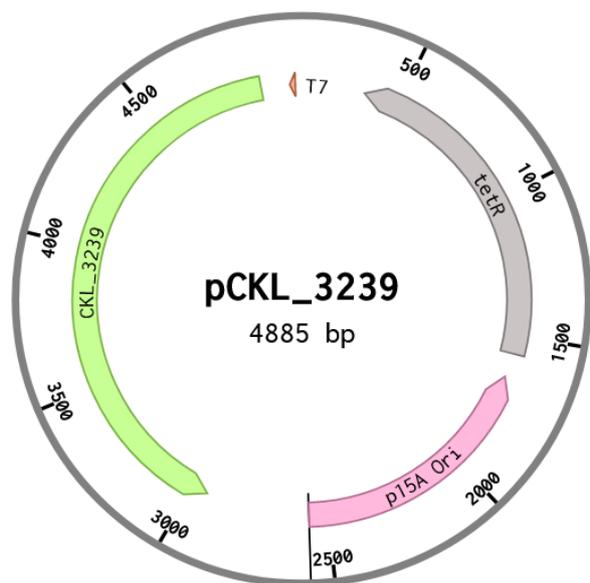


Abbildung 6.1. Plasmidkarten von vier potenziellen *C. kluuyveri* Methylierungsplasmiden auf Basis von pJL2.

Enthalten sind jeweils verschiedene potenzielle MTase-Gene aus dem Genom von *C. kluuyveri*. (A) *CKL_2314*, (B) *CKL_2332*, (C) *CKL_2938* und (D) *CKL_3239*. Erstellt mit Benchling (03/2023).

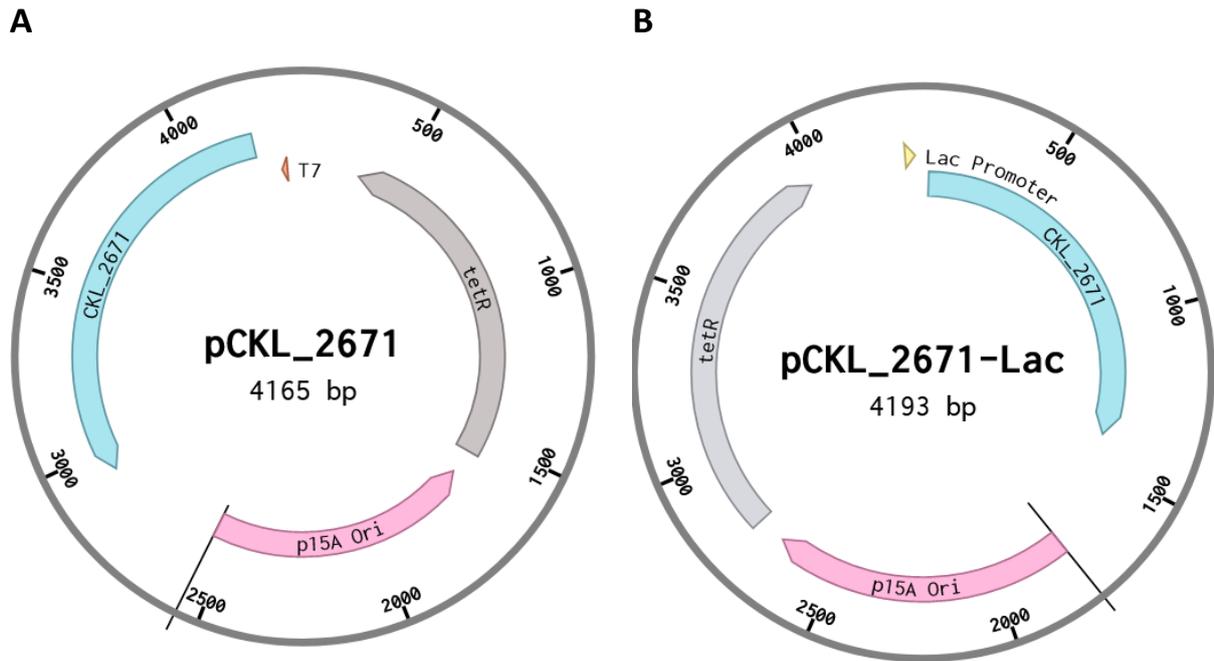


Abbildung 6.2. Plasmidkarten der potenziellen *C. kluyveri* Methylierungsplasmide pCKL_2671 und pCKL_2671-Lac.

Beide Plasmide wurden auf Basis von pJL2 konstruiert. (A) mit ursprünglichen Promotor P_{T7} vor dem MTase-Gen. (B) mit Promotor P_{lac} aus pUC19. Erstellt mit Benchling (03/2023).

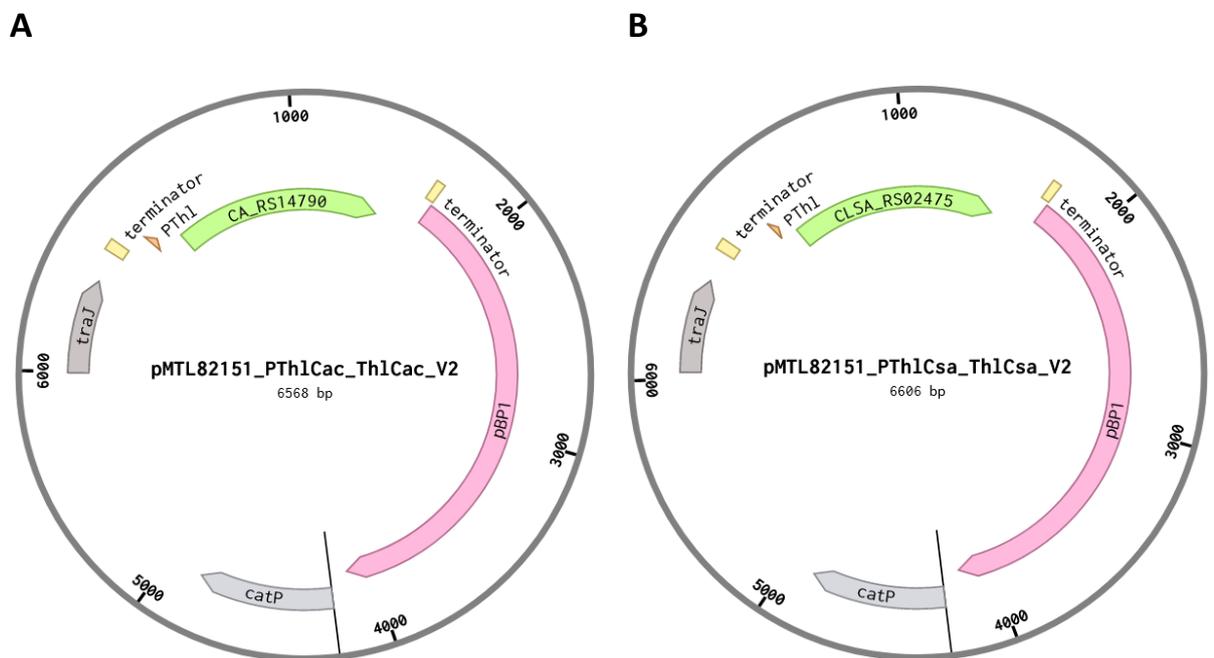


Abbildung 6.3. Plasmidkarten der Thiolase-Expressionsplasmide pMTL82151_P_{Thl,Cac}_Thl_{Cac} und pMTL82151_P_{Thl,Csa}_Thl_{Csa} für *C. kluyveri*.

Hierzu wurden die Thiolase-Gene mit ihren nativen Promotoren aus (A) *C. acetobutylicum* (CA_RS14790) bzw. (B) *C. saccharobutylicum* (CLSA_RS02475) in die MCS von pMTL82151 ligiert. Erstellt mit Benchling (03/2023).

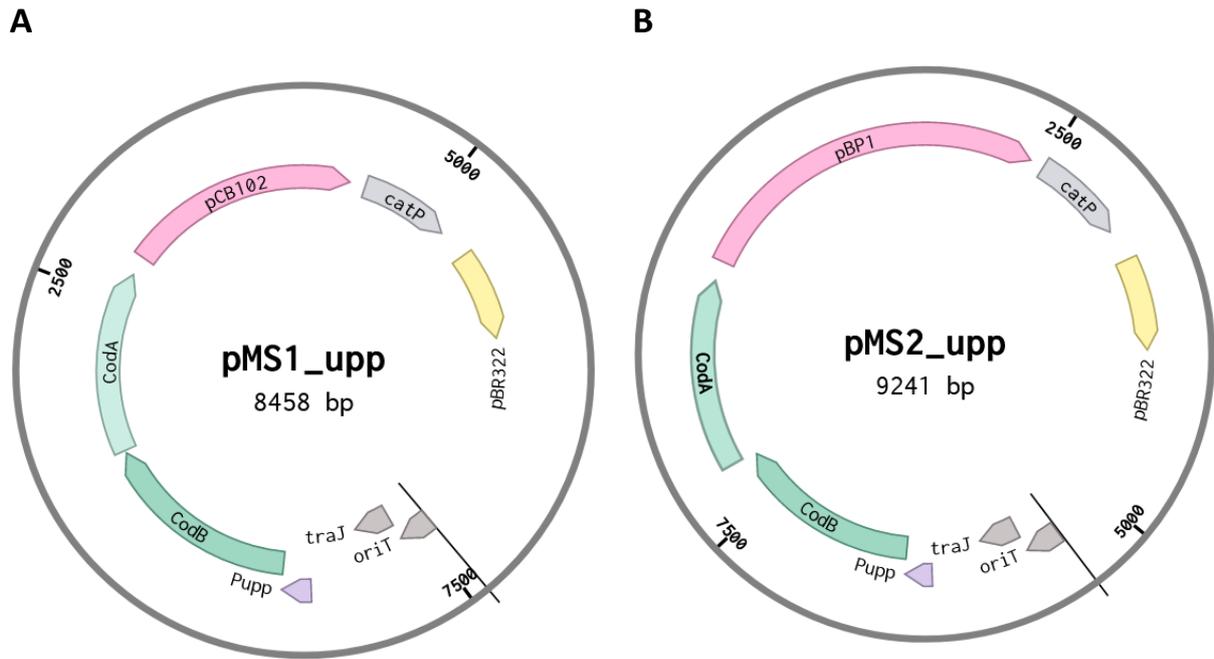


Abbildung 6.4. Plasmidkarten der Empty Shuttleplasmide pMS1_upp und pMS2_upp für *C. kluveri*.

Beide Plasmide gehen auf das Empty Suicideplasmid pChN für *C. saccharobutylicum* zurück und tragen vor dem *codBA*-Gen aus *C. ljungdahlii* ein Genfragment mit der potenziellen Promotorregion des *upp*-Gens aus *C. ljungdahlii*. (A) pMS1_upp mit dem Gram-positiven Ori CB102 aus pMTL83151. (B) pMS2_upp mit dem Gram-positiven Ori BP1 aus pMTL82151. Erstellt mit Benchling (03/2023).

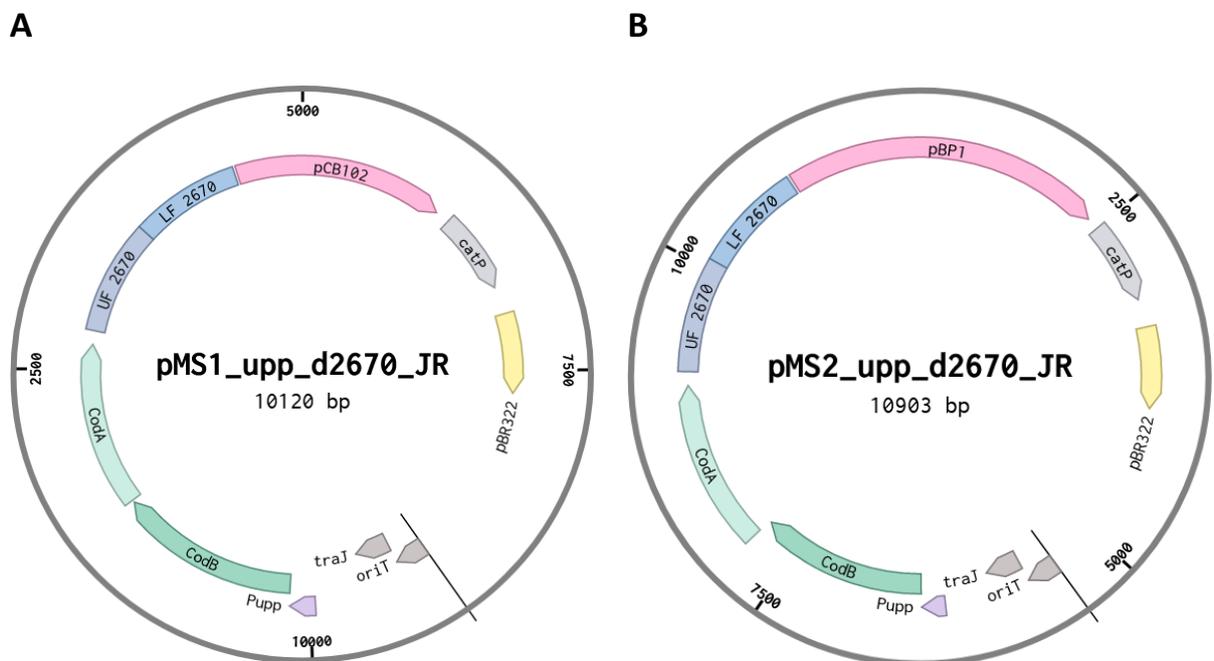


Abbildung 6.5. Plasmidkarten der *codBA*-Shuttleplasmide zur Deletion des putativen Typ-II RM-System REase-Gens *CKL_2670* in *C. kluveri* („Δ2670“).

(A) Flanken in pMS1_upp mit Gram-positivem Ori CB102. (B) Flanken in pMS2_upp mit Gram-positivem Ori BP1. Erstellt mit Benchling (03/2023).

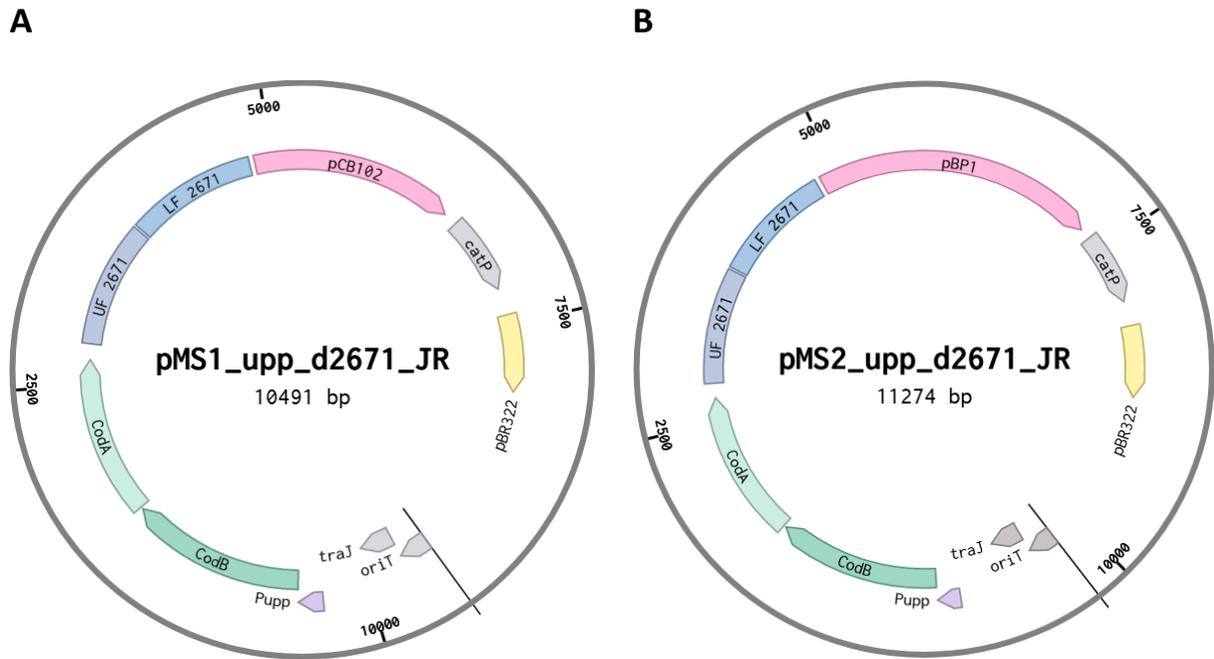


Abbildung 6.6. Plasmidkarten der *codBA*-Shuttleplasmide zur vollständigen Deletion des putativen Typ-II RM-Systems *CKL_2669-2671* in *C. kluuyveri* („ $\Delta 2671$ “).

(A) Flanken in pMS1_upp mit Gram-positivem Ori CB102. (B) Flanken in pMS2_upp mit Gram-positivem Ori BP1. Erstellt mit Benchling (03/2023).



Abbildung 6.7. Plasmidkarte des *codBA*-Shuttleplasmids pMS1_upp_Δ2671 zur vollständigen Deletion des putativen Typ-II RM-Systems *CKL_2669-2671* in *C. kluuyveri*.

Anders als bei den zusätzlich mit JR gekennzeichneten Deletionsplasmiden wurden die homologen Flanken nicht zwischen *codBA*-Gen und Gram-positivem Ori, sondern zwischen Ori BR322 und *oriT/traJ* eingefügt. Plasmid konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht in *C. kluuyveri* transkonjugiert werden. Erstellt mit Benchling (03/2023).

6.3 Potenzielle RM-System-Gene im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T

Tabelle 6.6. Über REBASE im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T identifizierte, potenzielle RM-Systemgene (Stand: 02/2021)

Locus Tag	Enzym	Potenzagarielle Funktion (REBASE)	Sequenz
CKL_2669	C.CkIORF2671P	R gene transcriptional control protein	-
CKL_2670	CkIORF2671P	Type II restriction enzyme probably	CCGG
CKL_2671	M.CkIORF2671P	Type II cytosine-5 DNA methyltransferase	CCGG
CKL_3238	C.CkIORF3239P	R gene transcriptional control protein	-
CKL_3239	M.CkIORF3239P	Type III N6-adenine DNA methyltransferase (M) subunit	-
CKL_3240	CkIORF3239P	Type III restriction (R) subunit	-
CKL_2595	S.CkIORF2595P	Type I specificity (S) subunit, no corresponding M gene	-
CKL_2596	CkIORF2595P	Type I restriction (R) subunit, no corresponding M gene	-
CKL_2332	CkIORF2332P	Type IIG restriction enzyme/N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_2694	CkIORF2694P	Type IIG restriction enzyme/N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_1889	M.CkIORF1889P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_1987	M.CkIORF1987P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_2314	M.CkIORF2314P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	GATC
CKL_2649	M.CkIORF2649P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_2938	M.CkIORF2938P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	ACNNNNNCTCC
CKL_3158	M.CkIORF3158P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_3897	M.CkIORF3897P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_4008	M.CkIORF4008P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	TGGCCA
CKL_4048	M.CkIORF4048P	Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-
CKL_3292	M1.CkIORF3292P	Type IIS cytosine-5 DNA methyltransferase	-
CKL_3294	M2.CkIORF3292P	Type IIS N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase	-

6.4 Potenzielle Thiolase-Gene im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T

Tabelle 6.7. Potenzielle Thiolase-Gene im Genom von *C. kluyveri* DSM 555^T mit der über Softberry vorhergesagten, putativen Promotorsequenz

Locus	Genebank	Protein-ID	UniProt	Gen	Protein	Promotor (Softberry)
CKL_3696	<i>thlA1</i>	EDK35681	A5N315	1182 bp	393 aa	<u>TTGTAATGATAATTAGTTAAAAT</u>
CKL_3697	<i>thlA2</i>	EDK35682	A5N316	1176 bp	391 aa	<u>TTGATAAAAAATTAATTAATTAGTATAAT</u>
CKL_3698	<i>thlA3</i>	EDK35683	A5N317	1176 bp	391 aa	<u>TGACAACGTTATGATTACTTAGTATAAT</u>

6.5 Transkriptomanalyse

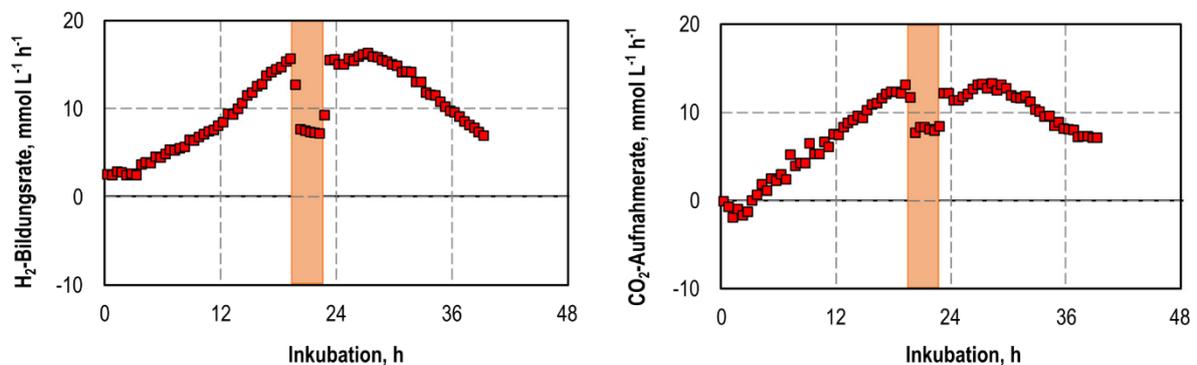


Abbildung 6.8 H₂-Bildungsrate und CO₂-Aufnahmerate einer Monokultur von *C. kluyveri* in einem Batchprozess mit temporärer CO-Begasung mit einem CO-Partialdruck von $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100$ mbar über 3 h (schattierte Fläche) während der exponentiellen Wachstumsphase in einem Rührkessel-Bioreaktor ($V = 1$ L, $T = 37$ °C, $P/V = 11,7$ W/L, pH 6,0, $F_{\text{gas}} = 0,08$ vvm mit 20% CO₂, $c_{\text{SO}} = 6$ g/L Acetat bzw. 15 g/L Ethanol). Prozessdaten erhoben und ausgewertet von Miriam Bäuml, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM School of Engineering and Design, Garching, Deutschland). Abbildung modifiziert nach Miriam Bäuml. Daten und Abbildung nicht publiziert

Anhang

Tabelle 6.8. Read-Counts einiger Gene aus der Transkriptomanalyse zur Untersuchung der CO-Sensitivität von *C. kluyveri*. Für Reaktor 1 (=CO-Batchprozess) wurde zeitweise für 3 h mit 100 mbar CO begast. Reaktor 2 (=Kontroll-Batchprozess) wurde als Referenz ohne CO gefahren. Beide Prozesse wurden nacheinander in demselben Reaktor durchgeführt und jeweils zu identischen Zeitpunkten beprobt. Die Extrahierte RNA wurde mittels Illumina NovaSeq analysiert.

Locus	Gen	Reaktor 1: CO-Batchprozess				Reaktor 2: Kontroll-Batchprozess			
		19,5 h	20,2 h	22,5 h	23,5 h	19,5 h	20,2 h	22,5 h	23,5 h
CKL_0841	[FeFe] Hydrogenase 2	624	7.781	4.661	335	1.155	1.077	770	1.926
CKL_2257	Fe-only hydrogenase 1	9.510	26.797	28.491	5.995	13.144	9.586	7.732	12.834
CKL_0605	<i>HydE</i>	2.523	2.339	2.161	2.829	3.487	2.851	2.368	2.299
CKL_2330	<i>HydF</i>	2.493	995	992	2.559	3.183	2.563	1.655	1.959
CKL_3829	<i>HydG</i>	1.230	1.832	1.465	1.720	1.740	1.468	1.225	1.293
CKL_0428	2Fe-2S Ferredoxin	137	104	64	119	166	105	96	74
CKL_3060	Ferredoxin	42	23	32	53	53	37	908	728
CKL_3758	Ferredoxin	37	24	18	39	45	57	18	28
CKL_3790	Ferredoxin	4.465	4.432	1.375	1.074	3.251	2.999	1.773	1.941
CKL_3696	<i>ThIA1</i>	709.033	929.632	807.313	695.095	1.048.333	834.193	751.312	868.521
CKL_3697	<i>ThIA2</i>	64.796	187.590	245.712	138.395	123.551	129.563	134.163	147.863
CKL_3698	<i>ThIA3</i>	116.825	187.918	131.816	59.682	179.809	144.716	91.483	109.818
CKL_0454	<i>Crt1</i>	145.595	309.012	205.865	108.027	225.686	203.278	159.363	191.755
CKL_0455	<i>Bcd</i>	472.656	794.183	571.688	307.371	696.134	564.087	407.415	480.412
CKL_0456	<i>EtfB1</i>	308.447	512.167	364.889	234.303	517.613	431.263	302.827	354.728
CKL_0457	<i>EtfA1</i>	495.997	792.469	550.207	332.993	726.049	599.085	425.110	499.771
CKL_0458	<i>Hbd1</i>	448.173	696.059	492.163	286.687	666.193	518.245	368.883	432.278
CKL_2527	<i>Crt2</i>	66	55	17	125	80	88	62	74
CKL_3516	<i>EtfA2</i>	767	524	432	951	1.219	1.186	872	899
CKL_3517	<i>EtfB2</i>	1.748	928	643	1.569	2.952	2.247	1.396	1.839
CKL_2795	<i>Hbd2</i>	1.527	1.139	1.636	1.451	1.962	1.542	1.104	1.232
CKL_3595	<i>Cat3</i>	115.771	160.027	98.650	66.672	175.514	142.477	94.908	114.733

Anhang

Tabelle 6.8. Read-Counts einiger Gene aus der Transkriptomanalyse zur Untersuchung der CO-Sensitivität von *C. kluyveri*. Für Reaktor 1 (=CO-Batchprozess) wurde zeitweise für 3 h mit 100 mbar CO begast. Reaktor 2 (=Kontroll-Batchprozess) wurde als Referenz ohne CO gefahren. Beide Prozesse wurden nacheinander in demselben Reaktor durchgeführt und jeweils zu identischen Zeitpunkten beprobt. Die Extrahierte RNA wurde mittels Illumina NovaSeq analysiert.

Locus	Gen	Reaktor 1: CO-Batchprozess				Reaktor 2: Kontroll-Batchprozess			
		19,5 h	20,2 h	22,5 h	23,5 h	19,5 h	20,2 h	22,5 h	23,5 h
CKL_1075	<i>Adh1</i>	153.818	429.083	287.614	93.684	282.634	221.467	135.865	188.480
CKL_1077	<i>Adh2</i>	111.369	280.208	177.185	49.520	194.515	154.478	83.058	125.535
CKL_1078	<i>Adh3</i>	137.517	300.044	193.920	62.962	249.901	190.316	102.327	150.207
CKL_1074	<i>Ald1</i>	147.057	434.997	311.082	87.040	265.933	217.964	133.944	188.201
CKL_1076	<i>Ald2</i>	110.789	294.415	209.839	50.607	197.657	161.050	87.754	133.558
CKL_1390	<i>Pta</i>	81.358	95.150	46.616	61.017	140.013	109.563	98.942	101.836
CKL_1391	<i>AckA</i>	49.163	33.347	29.871	39.736	66.297	49.699	40.500	41.397
CKL_1264	<i>RnfC</i>	4.770	5.577	4.157	4.325	7.604	6.087	5.006	5.240
CKL_1265	<i>RnfD</i>	2.436	3.011	2.551	2.099	3.591	3.009	2.446	2.629
CKL_1266	<i>RnfG</i>	620	710	474	669	1.070	1.032	799	770
CKL_1267	<i>RnfE</i>	1.146	1.021	785	970	1.586	1.293	976	1.095
CKL_1268	<i>RnfA</i>	695	583	490	911	1.577	1.083	805	876
CKL_1269	<i>RnfB</i>	3.742	3.266	2.071	2.805	5.140	3.893	3.134	3.308
CKL_3687	<i>AtpC</i>	5.664	3.710	3.762	6.134	8.887	7.339	6.242	5.842
CKL_3688	<i>AtpD</i>	14.147	9.515	8.386	15.345	22.940	17.969	15.876	16.253
CKL_3689	<i>AtpG</i>	5.246	3.882	4.350	6.837	9.759	8.463	6.808	6.558
CKL_3690	<i>AtpA</i>	10.431	8.730	9.047	11.593	17.131	14.486	12.656	12.736
CKL_3691	<i>AtpH</i>	638	533	785	1.758	2.948	2.589	1.613	1.436
CKL_3692	<i>AtpF</i>	2.367	1.940	1.770	2.825	3.826	3.421	2.836	2.877
CKL_3693	<i>AtpE</i>	584	345	272	511	774	564	601	573
CKL_3694	<i>AtpB</i>	6.048	4.238	4.832	6.332	9.185	7.035	5.961	6.029
CKL_3695	<i>AtpI</i>	457	325	294	1.277	2.809	2.032	1.156	740
CKL_0006	<i>GyrB1</i>	9.154	5.706	6.373	13.390	13.706	11.740	9.360	9.502
CKL_0007	<i>GyrA1</i>	13.597	8.265	9.776	19.928	21.564	17.134	14.485	14.677

6.6 Chemikalien und Geräte

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien standardmäßig über folgende Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Fluka von Honeywell (Charlotte, USA), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Lucigen (Wisconsin, USA), Macherey-Nagel (Dürren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Ipswich, UK), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), Thermo Fischer (Waltham, USA) und VWR (Radnor, Deutschland). Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 6.9 zusammengefasst.

Tabelle 6.9. Angaben zu den verwendeten Geräten

Gerät	Hersteller
Anaerobes Arbeiten	
Oxoid AnaeroJar 2,5 L Töpfe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Oxoid AnaeroGen 2,5 L Beutel	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vinyl Anaerobic Chamber	Coy Laboratory Products (Michigan, USA)
Sensor CAM-12	Coy Laboratory Products (Michigan, USA)
Hungate-Röhrchen und Serumfläschchen	Glasgerätebau Ochs (Bovenden, Deutschland)
Butylstopfen	Glasgerätebau Ochs (Bovenden, Deutschland)
Agarose-Gelelektrophorese	
Gelkammer	Bethesda Research Laboratories (Rockville, USA)
Power Pac 1000	Bio-Rad (München, Deutschland)
Consort EV231 power supply	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HPLC	
Finnigan Surveyor Plus System	Thermo Scientific (Waltham, USA)
HPX-87H-Säule	Bio-Rad (München, Deutschland)
Micro-Guard Cation H Cartridge Säule	Bio-Rad (München, Deutschland)
Mikroskope	
Axio Imager M1 (Fluoreszenz)	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Axio Skope A1 (Durchlicht)	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mixing Block MB-102	Hangzhou Bioer Technology (Zhejiang, China)
pH/Conductivity Meter 902	Berrytec® GmbH (Harthausen, Deutschland)

Anhang

Tabelle 6.9 Angaben zu den verwendeten Geräten (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Photometer	
Spectrophotometer 7310 (OD)	Jennway (Staffordshire, UK)
BioSpectrometer (DNA)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
NanoDrop ND-1000 (DNA, RNA)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
SPECTROstar ^{Nano} (OD, Bradford)	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Densitometer DEN-1B (OD)	BioSan (Riga, Lettland)
Sterilbank HSP15 HeraSafe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
System für Reinstwasser (MQ H₂O)	
Claris pure water Cartridge System	Filter Pure Systems, inc. (Florida, USA)
PURELAB flex (ELGA LabWater)	Verolina Water (Celle, Deutschland)
Thermocycler	
Biometra Trio (PCR)	Analytik Jena GmbH (Jena, Deutschland)
Biometra TAdvanced (PCR)	Analytik Jena GmbH (Jena, Deutschland)
FlexCycler (PCR)	Analytik Jena GmbH (Jena, Deutschland)
Primus 96 Thermal Cycler (PCR, ZFE)	MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)
BioRad [®] CFX96 [™] Real-Time PCR Detection System (qRT-PCR)	Bio-Rad (München, Deutschland)
UV-Kammer Alphalmager MINI	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Waagen	
1204 MP	Sartorius AG (Göttingen, Germany)
Navigator [™]	Ohaus Europe GmbH (Greifensee, Germany)
Entris 2201-1S	Sartorius AG (Göttingen, Germany)
Precisa 125 A SCS	Precisa Gravimetrics AG (Dietikon, Switzerland)
Wasserbad MultiTemp III	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Zellaufschluss	
FastPrep-24 [™]	MP Biomedicals (Irvine, USA)
Mikro-Dismembrator U	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen	
Biofuge pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Tischzentrifuge PCR Tubes	Benchmark Scientific (Sayreville, USA)
Mikro 200R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Universal 320R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	n	Nano (10 ⁻⁹)
μ	Micro (10 ⁻⁶)	NGS	Next Generation Sequencing
5-FC	5-Fluorocytosin	NRT	Ohne Reverse Transkriptase
5-FU	5-Fluorouracil	nt	Nukleotid(e)
C _T	Schwellenwert-Zyklus	NTC	Ohne Template
Col	Colistin	Ori	Replikationsursprung
bp	Basenpaar(e)	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
cDNA	Komplementäre DNA	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphat	PFA	Para-Formaldehyd
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	qRT	Echtzeit Reverse Transkription
Em	Erythromycin	RBO	Reverse-β-Oxidation
FA	Formamid	REase	Restriktionsendonuklease
FC	Durchflusszytometrie	RNA	Ribonukleinsäure
f.c.	Finale Konzentration	RNaseq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
FD	Fast Digest	RM	Restriktion(s)-Modifikation(s)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	rpm	Umdrehungen pro Minute
g	Gramm	rRNA	Ribosomale RNA
gDNA	Genomische DNA	RT	Raumtemperatur
h	Stunde(n)	SOB	„Super Optimal Broth“ Nährmedium
HF	High Fidelity	SOC	SOB mit 20 mM Glukose
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	Sp	Spectinomycin
k	Kilo (10 ³)	STR	Rührkessel-Reaktor
kb	Kilo-Basenpaare	T _A	Annealing-Temperatur
L	Liter	T _M	Schmelz-Temperatur
LB	Lysogenie Bouillon	TAE	Tris-Acetat-EDTA
M	Molar	TE	Tris-EDTA
m	Milli (10 ⁻³)	Tet	Tetracyclin
MCS	Mehrfach-Klonierungsstelle	Tm	Thiamphenicol
MES	2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure	V	Volt
MHK	Minimale Hemmkonzentration	v/v	Volumen pro Volumen
min	Minute	w/v	Gewicht pro Volumen
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure	ZFE	Zellfreier Extrakt
MQ H ₂ O	Ultrareines Wasser		
mRNA	Messenger RNA		
MTase	Methyltransferase		

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1. Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Tabelle 2.2. Verwendete Clostridien Stämme.....	16
Tabelle 2.3. Plasmide für <i>in vivo</i> Methylierung	17
Tabelle 2.4. Standardplasmide dieser Arbeit	17
Tabelle 2.5. Thiolase-Expressionsplasmide für <i>C. kluyveri</i>	18
Tabelle 2.6. <i>codBA</i> Basis- und Deletionsplasmide für <i>C. kluyveri</i>	18
Tabelle 2.7. Information zu den Genomen dieser Arbeit.....	19
Tabelle 2.8. Wichtige Gene dieser Arbeit.....	19
Tabelle 2.9. In dieser Arbeit verwendete, kommerzielle Kits	20
Tabelle 2.10. Kommerzielle Enzyme und Polymerasen	20
Tabelle 2.11. Kommerzielle Puffer und sonstige Reagenzien	21
Tabelle 2.12. Zusammensetzung von Puffern dieser Arbeit	22
Tabelle 2.13. Technische Gase für das anaerobe Arbeiten	22
Tabelle 2.14. Zusammensetzung der Medien für <i>E. coli</i> , bezogen auf 1 L.....	23
Tabelle 2.15. DSMZ-52 Medium für <i>C. kluyveri</i> , modifiziert	24
Tabelle 2.16. Tanner Medium, modifiziert (Tanner 2007) für <i>C. kluyveri</i> (=TM 4040).....	25
Tabelle 2.17. Hurst Medium, modifiziert (Hurst & Lewis 2010) für <i>C. kluyveri</i>	26
Tabelle 2.18. Zusammensetzung der Selen-Wolfram-, Spurenelement- und Vitamin-Lösungen pro 1 L für das DSMZ-52 Medium.....	28
Tabelle 2.19. Zusammensetzung der Mineralien-, Spurenelement- und Vitaminlösung pro 1 L für das Tanner bzw. Hurst Medium	29
Tabelle 2.20. Verwendete Antibiotika Stocklösungen	30
Tabelle 2.21. Master-Mix für einen Reaktionsansatz (links) und Thermocycler-Programm (rechts) für die präparative PCR mit der S7 oder Q5 DNA Polymerase.....	38
Tabelle 2.22. Master-Mix für einen Reaktionsansatz (links) und Thermocycler-Programm (rechts) für eine analytische PCR mit der Phire Hot Start II DNA Polymerase	39
Tabelle 2.23. Vergleich der Gibson Assembly Klonierung mit dem NEBuilder bzw. der SLiCE Methode.....	41
Tabelle 2.24. Reaktionsansätze für Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation	42
Tabelle 2.25. Zusammensetzung des anaeroben Lyse-Puffers für den zellfreien Extrakt	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.26. Reaktionsansatz für das Restriktionsendonuklease Aktivitäts-Assay	46
Tabelle 2.27. FISH-Gensonden dieser Arbeit	48
Tabelle 2.28. Zusammensetzung des FISH-Hybridisierungspuffers (2 mL) mit 0-50% (v/v) Formamid	51
Tabelle 2.29. Zusammensetzung des FISH-Waschpuffers (50 mL) in Abhängigkeit von der im Hybridisierungspuffer verwendeten Formamid Konzentration	51
Tabelle 2.30. Temperaturprofil der qRT-PCR	55
Tabelle 3.1. Ergebnis der Online Probe-Match Analyse für die <i>C. carboxidivorans</i> Gensonde ClosCarb auf SILVA TestProbe 3.0 gegen die SILVA LSU r138.1 REFNR-Sammlung.	63
Tabelle 3.2. Bestimmte Werte für die Minimale Hemmkonzentration von vier Antibiotika bezüglich <i>C. kluyveri</i> in TM 4040 Medium mit 0,05% (w/v) Hefeextrakt.....	76
Tabelle 3.3. Koloniezahlen nach der Transkonjugation von <i>E. coli</i> -Clostridium Shuttle-Plasmiden mit vier unterschiedlichen Gram-Positiven Replikationsursprüngen in <i>C. kluyveri</i>	86
Tabelle 3.4. Read-Count Werte der [FeFe] Hydrogenase-Gene aus der Transkriptomanalyse zur Untersuchung der CO-Sensitivität von <i>C. kluyveri</i>	95
Tabelle 6.1. Oligonukleotidsequenzen der Primer zur Konstruktion von potenziellen Methylierungsplasmiden für <i>C. kluyveri</i>	148
Tabelle 6.2. Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion von Thiolase-Expressionsplasmiden auf Basis von pMTL-Vektoren	149
Tabelle 6.3. Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion von <i>codBA</i> Basis-Plasmiden	150
Tabelle 6.4. Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion von Deletionsplasmiden für das Typ-II RM-System in <i>C. kluyveri</i>	151
Tabelle 6.5. Oligonukleotidsequenzen von Primern für qRT-PCR Messungen und weitere Anwendungen.....	152
Tabelle 6.6. Über REBASE im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T identifizierte, potenzielle RM-Systemgene (Stand: 02/2021)	157
Tabelle 6.7. Potenzielle Thiolase-Gene im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T mit der über Softberry vorhergesagten, putativen Promotorsequenz	158
Tabelle 6.8. Read-Counts einiger Gene aus der Transkriptomanalyse zur Untersuchung der CO-Sensitivität von <i>C. kluyveri</i>	159
Tabelle 6.9. Angaben zu den verwendeten Geräten.....	161

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Schematische Darstellung des Ethanol-Acetat Stoffwechsels von <i>C. kluyveri</i>	11
Abbildung 1.2. Konzept der autotrophen Co-Kultur von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. kluyveri</i> auf Syngas zur Produktion von mittelkettigen Alkoholen aus CO.....	14
Abbildung 3.1. Veranschaulichung von den Sequenzunterschieden der 23S rRNA Oligonukleotidsonden ClosKluy für <i>C. kluyveri</i> (grün) und ClosCarb für <i>C. carboxidivorans</i> (rot).	61
Abbildung 3.2. Ausschnitt des phylogenetischen Orientierungs-Baums zum Design von neuen FISH-Gensonden für <i>C. kluyveri</i> und <i>C. carboxidivorans</i>	62
Abbildung 3.3. Schrittweise Formamid (FA)-Reihe für die mit AF488 markierten Sonden ClosKluy (grün) und die mit Cy3 markierten Sonden ClosCarb (orange).....	64
Abbildung 3.4. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung verschiedener, PFA-fixierter Referenz-Bakterienstämme nach ihrer Hybridisierung mit den Oligonukleotidsonden EUB338 I, ClosKluy oder ClosCarb.	66
Abbildung 3.5. Gleichzeitige Hybridisierung von sechs verschiedenen, PFA-fixierten <i>C. kluyveri</i> Isolaten mit den Sonden ClosKluy und ClosCarb.....	67
Abbildung 3.6. Künstliches Gemisch aus Zellen von <i>C. carboxidivorans</i> DSM 15243 ^T und <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T nach gleichzeitiger Hybridisierung mit ClosKluy und ClosCarb.	68
Abbildung 3.7. Batch-Glukose Mono- und Co-Kulturen von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T und <i>C. carboxidivorans</i> DSM 15243 ^T	69
Abbildung 3.8. Proben aus einer heterotrophen Glukose-Batch Co-Kultur mit <i>C. carboxidivorans</i> DSM 15243 ^T und <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T nach einer Inkubationszeit von 20 h bei 37 °C.....	70
Abbildung 3.9. FISH-markierte Proben aus einem Gasfermentationsprozess mit <i>C. carboxidivorans</i> DSM 15243 ^T und <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T in einem vollständig kontrollierten Rührkessel-Bioreaktor mit kontinuierlicher Gaszufuhr.	71
Abbildung 3.10. Wachstum von <i>C. kluyveri</i> in 50 mL Serumfläschchen mit verschiedenen Puffersystemen oder Substraten.....	72
Abbildung 3.11. Wachstum von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T auf der Oberfläche des TM 4040 Agars.	74
Abbildung 3.12. Minimale Hemmkonzentration (MHK) von vier Antibiotika mit <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	76
Abbildung 3.13. Lage und Anordnung potenzieller Restriktions-/Modifikationssystem-assoziiertes Gene im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	78
Abbildung 3.14. Schema der Genloci der drei potenziell vollständigen Restriktions-/Modifikationssysteme im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	79
Abbildung 3.15. Schematische Darstellung der Konstruktion von potenziellen Methylierungsplasmiden für <i>C. kluyveri</i> auf Basis von pJL2 (Lesiak <i>et al.</i> 2014).	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.16. Aktivitäts-Assay mit drei potenziellen Methylierungsplasmiden für <i>C. kluyveri</i>	82
Abbildung 3.17. Kontroll-PCR mit der gDNA aus sechs unabhängigen Klonen zum Nachweis einer erfolgreichen Plasmidtranskonjugation in <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	86
Abbildung 3.18. Schematische Darstellung der Anordnung der drei Thiolase-Gene <i>thlA1-A3</i> im Genom von <i>C. kluyveri</i> DSM 555 ^T	87
Abbildung 3.19. Aufbau des „Multiple cloning site“ (MCS) Moduls aus der modularen Plasmidserie „pMTL8000“ nach Heap <i>et al.</i> 2009 mit den Enzym-Schnittstellen <i>SbfI</i> und <i>AsclI</i>	88
Abbildung 3.20. Phänotypische Charakterisierung des <i>C. kluyveri</i> Transkonjuganten CK_Ra9 mit einem Plasmid zur Expression des Thiolase-Gens aus <i>C. acetobutylicum</i>	90
Abbildung 6.1. Plasmidkarten von vier potenziellen <i>C. kluyveri</i> Methylierungsplasmiden auf Basis von pJL2. .	153
Abbildung 6.2. Plasmidkarten der potenziellen <i>C. kluyveri</i> Methylierungsplasmide pCKL_2671 und pCKL_2671-Lac.	154
Abbildung 6.3. Plasmidkarten der Thiolase-Expressionsplasmide pMTL82151_P ^{Thl,Cac} _Thl _{Cac} und pMTL82151_P ^{Thl,Csa} _Thl _{Csa} für <i>C. kluyveri</i>	154
Abbildung 6.4. Plasmidkarten der Empty Shuttleplasmide pMS1_upp und pMS2_upp für <i>C. kluyveri</i>	155
Abbildung 6.5. Plasmidkarten der <i>codBA</i> -Shuttleplasmide zur Deletion des putativen Typ-II RM-System REase-Gens <i>CKL_2670</i> in <i>C. kluyveri</i> („Δ2670“).	155
Abbildung 6.6. Plasmidkarten der <i>codBA</i> -Shuttleplasmide zur vollständigen Deletion des putativen Typ-II RM-Systems <i>CKL_2669-2671</i> in <i>C. kluyveri</i> („Δ2671“).	156
Abbildung 6.7. Plasmidkarte des <i>codBA</i> -Shuttleplasmids pMS1_upp_Δ2671 zur vollständigen Deletion des putativen Typ-II RM-Systems <i>CKL_2669-2671</i> in <i>C. kluyveri</i>	156
Abbildung 6.8 H ₂ -Bildungsrate und CO ₂ -Aufnahmerate einer Monokultur von <i>C. kluyveri</i> in einem Batchprozess mit temporärer CO-Begasung mit einem CO-Partialdruck von p _{co,in} = 100 mbar über 3 h (schattierte Fläche).....	158

Veröffentlichungen

Publikationen in Fachzeitschriften

Schneider M, Bäumler M, Lee NM, Weuster-Botz D, Ehrenreich A, Liebl W (2021): Monitoring co-cultures of *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium kluyveri* by fluorescence *in situ* hybridization with specific 23S rRNA oligonucleotide probes. *System Appl Microbiol* 44: 126271; doi: 10.1016/j.syapm.2021.126271.

Bäumler M, Schneider M, Ehrenreich A, Liebl W, Weuster-Botz D (2022): Synthetic co-culture of autotrophic *Clostridium carboxidivorans* with chain elongating *Clostridium kluyveri* monitored by flow cytometry. *Microb Biotechnol* 15: 1471–1485; doi: 10.1111/1751-7915.13941.

Bäumler M, Burgmaier V, Herrmann F, Mentges J, Schneider M, Ehrenreich A, Liebl W, Weuster-Botz D (2023): Continuous production of ethanol, 1-butanol and 1-hexanol from CO with a synthetic co-culture of *Clostridia* applying a cascade of stirred-tank bioreactors. *Microorganisms* 11: 1003; doi: 10.3390/microorganisms11041003.

Konferenzbeiträge

Bäumler M & Schneider M (2021): Fluorescence *in situ* hybridization combined with flow cytometry for monitoring of clostridial co-cultures during syngas fermentation. 6th European Congress on Applied Biotechnology, 17-21 September 2021, virtual conference.

Schneider M, Bäumler M, Lee NM, Weuster-Botz D, Liebl W, Ehrenreich A (2022): Fluorescence *in situ* hybridization for the monitoring of syngas fermenting clostridium co-cultures. Annual Meeting 2022 of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 21-23 February 2022, virtual conference.

Bäumler M, Burgmaier V, Herrmann F, Mentges J, Schneider M, Ehrenreich A, Liebl W, Weuster-Botz D (2022): Autotrophic alcohol production with a synthetic co-culture of *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium kluyveri*. (Bio)Process Engineering - a Key to Sustainable Development, 12-15 September 2022, Aachen, Germany.

Schneider M, Liebl W, Ehrenreich A (2022): Overcoming restriction barriers in the secondary fermenter *Clostridium kluyveri*. 16th International Conference on the Genetics, Physiology, and Synthetic Biology of Solvent- and Acid-Forming Clostridia (Clostridium XVI), 14-17 September 2022, Toulouse, France.

Danksagung

Zu allererst möchte ich hiermit meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Chance zur Durchführung meiner Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie, sowie für das Interesse an meinem Forschungsergebnissen bedanken.

Ein weiterer großer Dank geht an Dr. Armin Ehrenreich für die fachliche Betreuung meines Projekts SynCoClos, Feedback und Diskussion zu meinen Forschungsergebnissen und der Dissertation, sowie für die kompetente Auswertung meiner Transkriptomdaten.

Danke auch an Prof. Dr. Michael Schloter und Dr. Sonja Vanderhaeghen für die Übernahme des Amtes als Zweitprüfer bzw. Mentorin für meine Doktorarbeit.

Zudem erwähne ich an dieser Stelle gerne auch die gute Zusammenarbeit und die anregenden, fachlichen Diskussionen mit Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz und Dr. Miriam Bäumler vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik im Rahmen des DFG-Projekts SynCoClos. Natuschka M. Lee sowie Prof. Klaus Neuhaus möchte ich zudem für die Unterstützung beim Design der FISH-Oligonukleotidsonden bzw. für die Durchführung des RNASeq danke sagen.

Daneben ist es mir ein großes Anliegen, allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie noch einmal für die tolle gemeinsame Zeit Danke zu sagen! Ohne euren Zusammenhalt wäre vieles in den letzten Jahren mit Sicherheit nicht möglich gewesen. Gerne Danke ich an die zahlreichen und oft auch mal nicht-wissenschaftlichen Diskurse und die angenehme Arbeitsatmosphäre mit euch zurück: Aline, Andi, Holger, Lisa, Luciana, Martin, Melli, Nataliia, Nils und Sonja.

Zudem möchte ich mich recht herzlich bei Helga, Sibylle, Maria und Konny bedanken. Ohne euer unermüdliches Engagement und eure Hilfsbereitschaft hätte ich in den vergangenen Jahren sicherlich mehr Zeit mit verzweifelterm Suchen und Bestellen verbracht als mit meiner eigentlichen Forschung! Danke auch an Sepp für die kompetente Hilfe beim Gasequipment und bei technischen Problemen.

Auch meine Studenten Lisa, Marc, Jenny und Karina möchte ich nochmals für das Interesse, sowie die Mitarbeit an meinem Forschungsprojekt danke sagen.

Und zu guter Letzt gilt der wichtigste Dank meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere für Geduld, Verständnis, Rückhalt und Unterstützung in den vergangenen Jahren. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

