

Funktionelle Genomanalyse des Purinverwerters *Clostridium acidurici 9a*

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsgrundprogramm

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Katrin Hartwich

aus Achim

Göttingen, 2012

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Rolf Daniel, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie und
Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. em. Dr. Gerhard Gottschalk, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie
und Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: **Prof. Dr. Rolf Daniel**, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie
Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Korreferent: **Prof. em. Dr. Gerhard Gottschalk**, Abteilung für Genomische und Angewandte
Mikrobiologie und Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie
und Genetik

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Burkhard Morgenstern, Abteilung für Bioinformatik, Institut für Mikrobiologie und
Genetik

PD Dr. Michael Hoppert, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie
und Genetik

PD Dr. Boris Görke, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und
Genetik

PD Dr. Stefan Irniger, Abteilung für Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für
Mikrobiologie und Genetik

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2012

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	9
1.1 Das Genus <i>Clostridium</i>	9
1.2 <i>C. acidurici</i> 9a als Vertreter der purinolytischen Clostridien.....	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Organismen und Plasmide.....	15
2.2 Kultivierung von Bakterien	16
2.2.1 Nährmedien für <i>E. coli</i>	16
2.2.2 Nährmedien für <i>C. acidurici</i> 9a.....	17
2.2.3 Medienzusätze	19
2.2.4 Zellanzucht	20
2.2.5 Verfolgung des Bakterienwachstums durch Messung der optischen Dichte.....	20
2.2.6 Lagerung von Bakterienkulturen und Reinheitskontrollen	20
2.3 Isolierung von Nukleinsäuren	21
2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. acidurici</i> 9a.....	21
2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA	22
2.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>C. acidurici</i> 9a.....	22
2.3.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>C. acidurici</i> 9a.....	23
2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	23
2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen	23
2.4.2 Fällung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren	24
2.4.3 Auftrennung von Nukleinsäuren	24
2.4.3.1 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	24
2.4.3.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA	26

2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
2.4.5 Größenbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
2.4.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	28
2.4.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	28
2.4.8 Scheren von DNA.....	28
2.4.9 Reverse Transkription (RT-PCR).....	29
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.5.1 Standard-PCR.....	30
2.5.2 Vektorette-PCR (Riley et al, 1990).....	31
2.5.3 Multiplex-PCR (Tettelin et al, 1999).....	32
2.6 Enzymatische Modifikation von DNA.....	33
2.6.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	33
2.6.2 Dephosphorylierung.....	34
2.6.3 Erstellen von glatten Enden (<i>blunt ends</i>).....	34
2.6.4 Erstellen von 3'-Adenosinüberhängen.....	35
2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	35
2.7.1 TOPO®-Klonierung (Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt).....	36
2.7.2 pGEM®-T Easy-Klonierung (Fa. Promega, Madison, USA).....	37
2.8 DNA-Transfer in <i>E. coli</i> und <i>C. acidurici</i> 9a.....	37
2.8.1 Transformation von DNA in <i>E.coli</i> durch Elektroporation.....	38
2.8.2 DNA-Transfer in <i>C. acidurici</i> 9a durch Elektroporation.....	39
2.8.3 DNA-Transfer in <i>C. acidurici</i> 9a durch Konjugation.....	40
2.9 Sequenzierung und Annotation des Genoms von <i>C. acidurici</i> 9a.....	41
2.9.1 454-Pyrosequenzierung.....	41
2.9.2 Sequenzanalyse nach (Sanger et al, 1977).....	42
2.9.3 Lückenschluss.....	43
2.9.4 Qualitätsverbesserung.....	44
2.9.5 Annotation des Genoms.....	45
2.9.5.1 Vorhersage potentieller ORFs.....	45
2.9.5.2 Automatische Annotation.....	45
2.9.5.3 Manuelle Annotation.....	46
2.10 Genomsequenz-Analysen.....	46
2.11 <i>real-time</i> qPCR.....	49
2.11.1 Standard <i>real-time</i> qPCR.....	49

2.11.2 Bestimmung der Plasmid-Kopienanzahl (<i>Plasmid Copy Number</i> - PCN)	51
2.12 Bestimmung der Toleranz gegenüber Metallen	52
2.13 Geräte und Chemikalien	53
3. Experimente und Ergebnisse.....	55
3.1 Die Sequenzierung des Genoms von <i>C. acidurici</i> 9a	55
3.1.1 Sequenzierung, Lückenschluss und Annotation	55
3.1.2 Allgemeine Eigenschaften des Genoms	57
3.1.3 Vergleichende Analysen zu anderen Vertretern der Clostridien	61
3.1.3.1 Phylogenetische Analysen	61
3.1.3.2 Genomvergleiche mittels globalem Alignment und bestem bidirektionalen BLAST-Treffer	67
3.1.4 Identifizierung von Fremdgenen und hypervariablen Regionen	70
3.2 Nähere Betrachtung des Plasmids pCuri3 aus <i>C. acidurici</i> 9a	73
3.2.1 Bestimmung der Anzahl an Plasmidkopien	76
3.2.2 Transkriptionsanalyse von Plasmid-lokalisierten Genen durch RT-PCR	77
3.3 Substratverwertung und Energiehaushalt	78
3.3.1 Abbau von Purinen	79
3.3.2 Abbau von Glycin als Zwischenprodukt der Purinverwertung	82
3.3.3 Untersuchung von Glycin als Substrat	85
3.3.3.1 Wachstumsversuche in Glycin-haltigem Medium	85
3.3.3.2 Transkriptionsanalyse von Genen des Glycin-Abbaus durch RT-PCR	88
3.3.4 Zucker als Substrat	90
3.3.4.1 Wachstumsversuche mit verschiedenen Hexosen und Pentosen	90
3.3.4.2 Transkriptionsanalysen von Genen der Glykolyse durch RT-PCR	92
3.3.5 Energiehaushalt und -konservierung	93
3.3.6 Intermediärmetabolismus	97
3.4 Genom-basierte Untersuchungen zu Resistenzen	98
3.4.1 Resistenz gegen Antibiotika und ähnliche antimikrobielle Substanzen	99
3.4.2 Resistenz gegenüber Metallen	104
3.4.2.1 Wachstumsversuche mit CuCl ₂ und ZnCl ₂	106
3.4.2.2 Untersuchung des <i>cop</i> -Operons durch RT-PCR und <i>real-time</i> qPCR	108
3.5 Untersuchungen zur genetischen Zugänglichkeit	112
3.5.1 Transformation von <i>C. acidurici</i> 9a durch Elektroporation	113
3.5.2 Konjugation von <i>C. acidurici</i> 9a mit <i>E.coli</i> S17-1	114

4. Diskussion	117
4.1 Das Genom von <i>C. acidurici</i> 9a	117
4.1.1 Allgemeine Eigenschaften des Genoms	117
4.1.2 Fremdgene und <i>genomic islands</i> in <i>C. acidurici</i> 9a	120
4.2 Das kryptische Plasmid pCuri3	122
4.3 Glycin als Intermediat und Substrat	125
4.4 Energiekonservierung durch Rnf-Komplex und Elektronenbifurkation	130
4.5 Resistenzmechanismen in <i>C. acidurici</i> 9a	133
4.5.1 Antibiotika-Resistenzen	133
4.5.2 Metall-Resistenzen	135
4.5.2.1 Das <i>cop</i> -Operon von <i>C. acidurici</i> 9a und seine Wirkungsweise	136
4.6 Genetische Zugänglichkeit und DNA-Transfer in <i>C. acidurici</i> 9a	141
4.7 Ausblick	147
5. Zusammenfassung	150
6. Literaturverzeichnis	153
7. Anhang	172
A.I. Verwendete Oligonukleotide	172
A.II. Einteilung clostridialer Gene in COG-Kategorien	174
A.III. Für die vergleichenden Analysen verwendete Organismen	175
A.IV. Bestimmung der Orthologen zu <i>C. acidurici</i> 9a	177
A.V. Gene des <i>core</i> -Genoms	179
A.VI. Potentielle Fremdgene im Genom von <i>C. acidurici</i> 9a	184
A.VII. Vergleich clostridialer Plasmide	188
A.VIII. Bestimmung der Oligonukleotid-Effizienzen zur PCN-Berechnung	190
A.IX. Na ⁺ -bindende Motive in der Aminosäuresequenz von F ₁ F ₀ -ATPasen	192
A.X. Bestimmung des Wachstums von <i>C. acidurici</i> 9a in Gegenwart von Antibiotika	193
A.XI. Bestimmung der Oligonukleotid-Effizienzen zur <i>real-time</i> -Analyse des <i>cop</i> -Operons	195
A.XII. Schmelzkurven der Oligonukleotidpaare zur <i>real-time</i> -Analyse des <i>cop</i> -Operons	200
Abbildungsverzeichnis	201
Tabellenverzeichnis	204

Abkürzungsverzeichnis

¹⁴	Radioaktive Isotopen
A	Ampere/Adenin
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	bis auf angegebenes Volumen auffüllen
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ala	Alanin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
BiBaG	<i>Bidirectional BLAST for identification of Bacterial pan and core Genomes</i>
bidest.	bidestilliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff (<i>carbon</i>)/Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr (<i>circa</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDS	kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CoA	Koenzym A (<i>coenzyme A</i>)
COG	Cluster orthologer Gruppen (<i>cluster of orthologous groups</i>)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Ct	Theoretische Größe des Anfangs vom exponentiellen Wachstum einer Kurve, Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle threshold</i>)
DEPC	Diethylpyrcarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
Ø	Durchschnitt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E	Effizienz
<i>et al.</i>	und weitere (<i>et alii</i>)
F	Farad
Fa.	Firma
FAD ⁺	oxidiertes Flavinadenindinukleotid
FADH	reduziertes Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
Gap	<i>Genome assembly program</i>
GS	Genomsequenzierer (<i>genome sequencer</i>)
G	Guanin
h	Stunde (<i>hour</i>)
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
l	Liter
Lys	Lysin
λ	Wellenlänge (Lambda)
k	Kilo- (10 ³)
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaar(e)
LB	Luria Bertani Medium
log	Logarithmus
m	Milli- (10 ⁻³)/Meter
M	Molar (mol/l)
Mb	Megabasenpaar(e)
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)

MIC	Minimale inhibitorische Konzentration (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
min	Minute (<i>minute</i>)
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
n	Nano- (10^{-9})
NAD ⁺	oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
Ω	Einheit des elektrischen Widerstandes (Ohm)
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
<i>oriR</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
<i>oriT</i>	Transferursprung (<i>origin of transfer</i>)
P	Phosphat
P _i	Anorganisches Phosphat
PCN	Anzahl der Plasmidkopien (<i>plasmid copy number</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PTFE	Polytetrafluorethylen
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R	Änderung der Transkriptionsrate
RM	Restriktions-Modifikation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde (<i>second</i>)
SMP	Saccharose- MgCl ₂ -Natriumphosphat-Puffer
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose (<i>salt-optimized + carbon</i>)
sp.	Spezies
Str ^r	Streptomycin-Resistenz

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
THF	Tetrahydrofolat
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
Zeo ^r	Zeomycin-Resistenz

1. Einleitung

1.1 Das Genus *Clostridium*

Das Genus *Clostridium* beschreibt eine Gruppe sehr heterologer Organismen innerhalb der Firmicutes mit einer Gram-positive Zellwand, einer stäbchenförmigen Gestalt und der Fähigkeit zur Bildung von Endosporen (Dürre, 2005). Daneben ist allen Vertretern lediglich ein obligat anaerober Energiestoffwechsel und die Unfähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion gemein (Gottschalk & Bahl, 1981). Anhand dessen ist es nicht verwunderlich, dass dieses Genus mit über 120 Spezies zu einem der größten innerhalb der anaeroben sporenbildenden Genera zählt (Brüggemann & Gottschalk, 2008). Im Allgemeinen werden mit dem Namen *Clostridium* meist nur lebensbedrohliche Vergiftungskrankheiten wie Botulismus (verursacht durch *C. botulinum*) oder Tetanus (verursacht durch *C. tetani*) assoziiert (Hatheway, 1990). Auch die durch *C. perfringens* hervorgerufenen Lebensmittelvergiftungen oder das schnelle Verderben von Fleisch trotz ununterbrochener Kühlkette durch *C. estertheticum* (Collins et al, 1992) sind weithin bekannt. Solche pathogene Vertreter stellen allerdings nur etwa ein Viertel der dem Genus zugeordneten Spezies dar. Der Großteil ist für den Menschen vollkommen ungefährlich und oft sogar nützlich. Viele saccharolytische Clostridien konvertieren ihre Substrate in von uns nutzbare Endprodukte wie *C. beijerinckii* oder *C. acetobutylicum*, welche unter anderem die Lösungsmittel Butanol und Aceton produzieren (Nölling et al, 2001). In den letzten drei Jahren wurden viele Untersuchungen zu aktuellen Gesellschaftsproblemen unternommen, die verschiedene Clostridien als mögliche Problemlöser in Betracht ziehen. Die Vertreter *C. thermocellum* und *C. ljungdahlii* wurden z.B. als mögliche Kandidaten zur Produktion von Bioethanol untersucht (Das et al, 2012; He et al, 2011; Köpke et al, 2010), der in Zeiten der Ressourcenknappheit immer wichtiger als alternative Treibstoffquelle wird. Während im Falle von *C. thermocellum* lignocellulosehaltige Abfallprodukte wie Getreidestroh als Substrat verwendet werden können, ist *C. ljungdahlii* in der Lage, Ethanol aus C1-Quellen wie dem äußerst kostengünstigen Synthesegas herzustellen. In eine ähnliche Richtung gehen die Versuche von Chou et al. (Chou et

al, 2011), die *C. beijerinckii* und *C. butyricum* in einer Co-Kultur mit *Bacillus thermoamylovorans* einsetzen, um effizient große Mengen an Wasserstoff als alternative Energiequelle aus Hefe-Abfallprodukten zu synthetisieren. Auch in der Medizin wurden Untersuchungen mit nützlichen *Clostridium*-Stämmen durchgeführt. Apathogene Stämme von *Clostridium* sp. könnten z.B. in der Behandlung von Krebs behilflich sein, da diese zum Teil selektiv Krebszellen erkennen, in Tumore eindringen und sogar in der Lage sind, darin zu replizieren (Forbes, 2010; Mengesha et al, 2007; Patyar et al, 2010). Durch diese Fähigkeit könnten die Stämme dazu benutzt werden, um therapeutische Proteine und Substanzen direkt in das Innere des Tumors zu transportieren, damit sie dort vor Ort ihre Wirkung entfalten können. Neben biotechnologischen und medizinischen Interessen steht natürlich auch nach wie vor die Aufklärung grundlegender Stoffwechselfvorgänge im Vordergrund, welche wiederum für die Biotechnologie oder Medizin nutzbar gemacht werden können. Die Sequenzierung und Annotation der bakteriellen Genome bieten dabei effiziente Methoden, um Stoffwechselwege zu rekonstruieren und Eigenschaften eines Organismus zu untersuchen, und somit die Grundlage für weitere Experimente zu bilden. *C. acetobutylicum* ATCC 824 stellte 2001 das erste *Clostridium* dar, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Nölling et al, 2001). Seither schreiten die Entwicklung neuer Sequenzierungstechnologien und die damit verbundene Sequenzierung neuer Genome immer schneller voran. In der GOLD Genomdatenbank (Genomes Online Database, <http://www.genomesonline.org/>) sind zu diesem Zeitpunkt 134 Genome der Gattung *Clostridium* als vollständig sequenziert bzw. permanenter *draft* (Rohsequenzierung ohne Lückenschluss) gelistet und 370 weitere entweder im Sequenzierungsprozess oder zur Sequenzierung vorgemerkt (Stand 16.10.2012).

1.2 *C. acidurici* 9a als Vertreter der purinolytischen Clostridien

Trotz der großen Anzahl an bereits sequenzierten Clostridien-Genomen, ist bis jetzt noch kein Genom eines obligat purinolytischen *Clostridium*s darunter zu finden, obwohl Purine neben den Aminosäuren zu den ersten biologisch bedeutsamen Verbindungen gehören, die abiotisch nach der Entstehung der Erde gebildet werden konnten (Ferris et al, 1978). Als essentieller Bestandteil der DNA und durch die Beteiligung an Biosynthese-Vorgängen nehmen Purine bzw. Purinkörper eine zentrale Rolle in allen bekannten Lebewesen ein. Bedingt durch die wichtige Bedeutung

findet ein großer Umsatz durch biologische Systeme statt, wodurch eine große Menge an Purinkörpern in den Ausscheidungsprodukten diverser Lebewesen zu finden sind. Neben dem Menschen, der etwa 0,4 g Harnsäure pro Tag ausscheidet (Bromberg et al, 1957; Dürre, 1981) zählen vor allem Vögel und Land-Reptilien zu den Hauptproduzenten von Purinen, sowie tote Lebewesen, in denen Purine als organischer Bestandteil in großen Mengen vorkommen. Die Fäkalien von Vögeln enthalten dabei etwa 3 mmol Harnsäure pro 100 g, was eine ausreichende Konzentration zum Wachstum purinolytischer Organismen darstellt (Andreesen, 2005). Umso bedeutender wird die sowohl aerobe als anaerobe Mineralisierung dieser Purin-Verbindungen durch Mikroorganismen (Dürre, 1981). Beiderseits (aerob wie auch anaerob) entwickelten sich Spezialisten, die nur Purine zum Wachstum nutzen können, wobei viele den anaeroben Clostridien zuzuordnen sind (Vogels & Van der Drift, 1976). Zu diesen Clostridien gehören die drei Spezies *C. acidurici*, *C. purinilyticum* und *C. cylindrosporum*. Anreicherungen aus Hühner-Kot speziell für Sporenbildner führte stets zur Isolation von Stämmen, die einer dieser drei Spezies zugeordnet werden konnten. Sie sind in der Lage Purine wie Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin und Guanin als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu nutzen, unterscheiden sich jedoch teilweise in ihrem Purin-Spektrum, bzw. Vorliebe für bestimmte Purine (Dürre & Andreesen, 1983). *C. purinilyticum* ist z.B. im Gegensatz zu den anderen beiden Purinverwertern auch in der Lage Adenin zu fermentieren (Dürre et al, 1981), welches aufgrund seiner toxischen Wirkung auf viele Organismen und der Notwendigkeit einer stringenten Regulation des Katabolismus eher selten als Substrat verwendet wird (Henderson, 1980). Der Abbau von Purinen in diesen drei purinolytischen Organismen sowie die weiterführende Verwertung von Glycin als Zwischenprodukt bzw. Co-Substrat von Purinen war bereits Gegenstand vieler Untersuchungen (Andreesen, 1994a; Andreesen, 1994b; Dürre et al, 1981; Dürre & Andreesen, 1982a; Dürre & Andreesen, 1982b; Dürre & Andreesen, 1983), wobei besonders *C. acidurici* oft als Modellorganismus im Vordergrund stand (Barker & Beck, 1941; Barker & Beck, 1942; Barker & Peterson, 1944; Barker et al, 1940; Beck & Sagers, 1956; Beck et al, 1957; Chen, 1975). Er wurde 1909 von Liebert entdeckt und zunächst aufgrund seiner äußerlichen Ähnlichkeit zu Organismen der Gattung *Bacillus* „*Bacillus acidi-urici*“ genannt (Barker & Beck, 1942). Dieser Stamm konnte aus Gartenerde in einem Medium, welches Harnsäure und K_2HPO_4 gelöst in Leitungswasser enthielt, isoliert werden. Liebert entdeckte dabei ein aktiv bewegliches, sporenbildendes und stäbchenförmiges Bakterium (**Abb. 1**), das in der Lage war, die Harnsäure aus dem Medium zu Acetat, CO_2 und Ammoniak zu konvertieren.

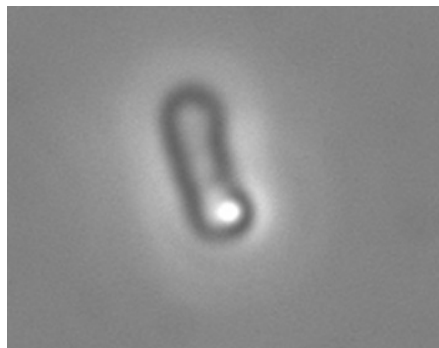
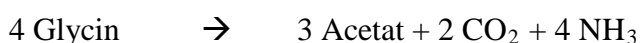


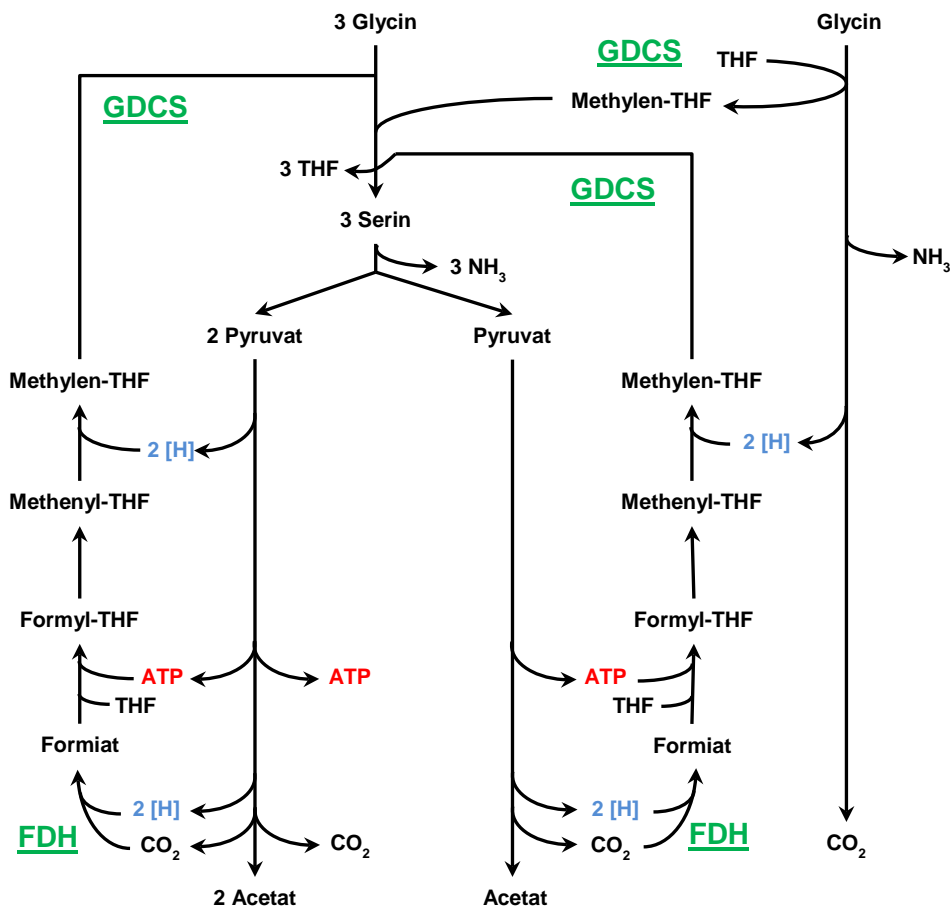
Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *C. acidurici* 9a.

Die Zelle wurde nach 18 h Wachstum in Harnsäuremedium mit einem Objektiv mit 100x Vergrößerung und Phasenkontrastfilter 3 aufgenommen. Als heller Fleck deutlich zu erkennen ist die endständige Endospore.

Etwa 30 Jahre später begann Barker an Harnsäurefermentierenden Anaeroben zu arbeiten und entdeckte Lieberts „*Bacillus*“ wieder und klassifizierte ihn neu als *Clostridium acidurici*. Der Typstamm 9a wurde schließlich 1941 beschrieben (Barker & Beck, 1941). Seit 1980 ist das Bakterium offiziell als *C. acidurici* (Skerman et al, 1980) bzw. seit 1986 mit dem korrigierten Namen *C. acidurici* (Cato et al, 1986) gelistet. *C. acidurici* kann aus nahezu allen Arten von Böden isoliert werden, aber auch aus den Fäkalien von Vögeln (Barker & Beck, 1942), was wiederum seine Rolle in der Mineralisierung von Harnsäure in der Umwelt widerspiegelt. Es ist sogar davon auszugehen, dass Vögel eher das natürliche Habitat dieses Organismus darstellen als der Boden, da er ein Temperaturoptimum bei etwa 42 °C aufweist (Andreesen, 2005), welches der gegenüber Säugetieren erhöhten Körpertemperatur von Vögeln entspricht. *C. acidurici* ist in der Lage neben Harnsäure auch die Purine Xanthin, Hypoxanthin und Guanin zu fermentieren, jedoch nicht Substrate wie Zucker oder komplexe stickstoffhaltige Verbindungen wie Trypton (Barker & Beck, 1941; Barker & Beck, 1942; Barker & Peterson, 1944). Die Aufnahme von Aminosäuren ist nicht notwendig, da diese *de novo* synthetisiert werden können. Prinzipiell sind in purinolytischen Bakterien zwei Wege bekannt, um Acetat aus Purinen zu synthetisieren: (i) Der Glycin-Serin-Pyruvat-Weg, in welchem das aus den Purinen gebildete Zwischenprodukt Glycin mit Hilfe des Glycin-Decarboxylase/-Synthase-Systems und der Formiat-Dehydrogenase zu Serin und anschließend über Pyruvat und Acetyl-Phosphat zu Acetat konvertiert wird (Waber & Wood, 1979) und (ii) der energetisch günstigere Weg der Glycin-Reduktase (Dürre & Andreesen, 1983). In einer internen Stickland-Reaktion wird Glycin durch das Glycin-Decarboxylase/-Synthase-System oxidiert bzw. mit Hilfe des Selen-abhängigen Enzyms Glycin-Reduktase direkt zu Acetat reduziert (Andreesen, 1994b). Ein direkter Vergleich beider Wege ist in **Abbildung 2** am Beispiel von *C. purinilyticum* dargestellt. Beiden Wegen liegt folgende Umsatzgleichung zugrunde:



A



B

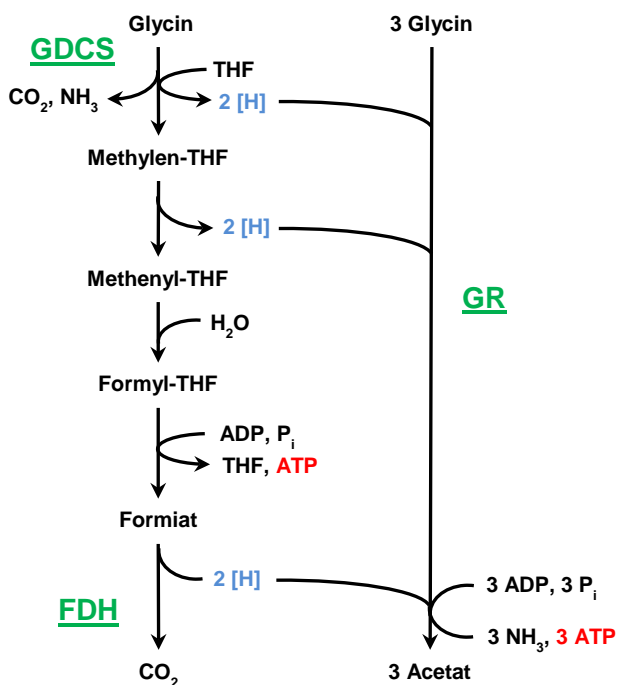


Abb. 2: Schematische Darstellung des Glycine-Serin-Pyruvat-Systems im Vergleich zum Glycine-Reduktase-System in *C. purinilyticum*.

(A) Das Glycine-Serin-Pyruvat-System zum anaeroben Abbau von 4 Glycine. In der Energiebilanz wird am Ende 1 ATP gebildet. (B) Abbau von Glycine mit Hilfe des Glycine-Reduktase-Systems. Bei diesem energetisch günstigeren Weg werden in einer internen Stickland-Reaktion durch den Abbau von 4 Glycine 4 ATP gewonnen. Wichtige Enzyme sind in Grün dargestellt, Reduktionsäquivalente in Blau und das gewonnene ATP in Rot. Die Abbildungen wurde modifiziert nach Dürre (Dürre, 1981).

GDCS = Glycine-Decarboxylase/-Synthase
 GR = Glycine-Reduktase
 FDH = Formiat-Dehydrogenase
 THF = Trehydrofolsäure
 2 [H] = Reduktionsäquivalente

Der Unterschied zwischen beiden Wegen liegt in der Gewinnung von ATP. Während beim Glycin-Serin-Pyruvat-Weg lediglich 1 ATP gebildet wird, liegt der Energiegewinn beim Glycin-Reduktase-Weg bei 4 ATP (Stadtman, 1978). Obwohl in *C. acidurici* keine merkliche Aktivität der Glycin-Reduktase ermittelt werden konnte, was mit der hohen Instabilität dieses Enzyms erklärt wurde, nahm man bisher immer an, dass alle drei purinolytischen Clostridien über das Glycin-Reduktase-System verfügen und den Glycin-Serin-Pyruvat-Weg eher als eine Art Notversorgung gebrauchen, damit der Organismus in der Lage ist, im Falle von Selenmangel zu überleben (Dürre & Andreesen, 1983).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Da genomweite Studien eines purinolytischen *Clostridium*s bisher noch nicht veröffentlicht wurden, bestand das hauptsächliche Ziel dieser Arbeit in der vollständigen Sequenzierung und Annotation des Genoms des Purinverwerfers *C. acidurici* 9a. Basierend auf Vergleichen zu anderen Clostridien-Genomen sollte anhand der Annotation des Genoms der Stoffwechsel dieses Organismus rekonstruiert und ein Überblick über die wichtigsten metabolischen Fähigkeiten gegeben werden. Dies bot gleichzeitig eine gute Möglichkeit zur Überprüfung solcher Unstimmigkeiten wie die bereits erwähnte Nutzung des Glycin-Reduktase-Systems. Durch weitere Genom-basierte experimentelle Ansätze sollten einige der gefundenen Eigenschaften und metabolischen Fähigkeiten verifiziert werden. Dazu zählte die Bestimmung der Sensitivität von *C. acidurici* 9a gegenüber verschiedener antimikrobieller Substanzen wie Antibiotika und Metalle durch Wachstumsversuche. Im Falle der Metalle, insbesondere Kupfer, sollte auch der Mechanismus der Detoxifizierung genauer untersucht werden. Desweiteren sollten durch genomweite Vergleiche die Ähnlichkeiten und verwandtschaftlichen Verhältnisse von *C. acidurici* 9a zu weiteren ausgewählten Vertretern der Clostridien bestimmt werden. Dies beinhaltete sowohl die Untersuchung von Orthologen in allen Vergleichsorganismen, als auch die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen unter Zuhilfenahme verschiedener Methoden. Ein weiteres Ziel in der späten Phase dieser Arbeit bestand darin, erste Voruntersuchungen zur genetischen Zugänglichkeit von *C. acidurici* 9a zu unternehmen. Da diese eine notwendige Voraussetzung für viele weiterführende Untersuchungen in einem Organismus darstellt, sollten geeignete Protokolle für den DNA-Transfer getestet und gegebenenfalls etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Bakterienstämme, die im Rahmen der Experimente in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in **Tabelle 1** zusammengefasst, verwendete Plasmide in **Tabelle 2**.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>Clostridium acidurici</i> 9a, DSM 604	Typstamm	Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> One Shot® TOP10 Electrocomp™	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen™ (Fa. Life Technologies, Darmstadt)
<i>Escherichia coli</i> ElectroMAX DH10B™	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ - <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen™ (Fa. Life Technologies, Darmstadt)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	SmR, TpR, mod ⁺ , res ⁻ , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , (RP4-2Tet::Mu-Kan::Tn7)	(SIMON ET AL, 1983)

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pCR®-XL-TOPO®	Kan ^r , Zeo ^r , <i>lacZα</i>	Invitrogen™ (Fa. Life Technologies, Darmstadt)
pCR™4-TOPO® TA	Amp ^r , Kan ^r , <i>lacZα</i>	Invitrogen™ (Fa. Life Technologies, Darmstadt)
pGEM®-T Easy	Amp ^r , <i>lacZ</i>	Fa. Promega (Madison, USA)
pKV12	Kan ^r , Tet ^r	(BERTRAM ET AL, 1991; STRÄTZ ET AL, 1994)

2.2 Kultivierung von Bakterien

Falls nicht anders im Text erwähnt, wurden alle Medien für die Kultivierung von *E. coli* und *C. acidurici* 9a bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 min in einem Autoklaven sterilisiert. Zur Herstellung von festen Medien wurden dem Flüssigmedium 1,5% (w/v) Agar zugesetzt. Lösungen, die hitzeempfindliche Stoffe enthielten wie Zucker, Aminosäuren und Antibiotika, wurden in der Regel sterilfiltriert und dem Medium direkt vor Gebrauch (Flüssigmedium) oder nach Abkühlen auf ca. 55°C (Festmedium) steril hinzugefügt. Im Falle der Medien für *C. acidurici* 9a geschah dies unter Sauerstoffausschluss in einem Anaerobenzelt.

2.2.1 Nährmedien für *E. coli*

Standardmäßig wurden Kulturen von *E. coli* in Luria-Bertani-(LB)-Medium angezogen. Medienzusätze und die eingesetzten Konzentrationen sind **Tabelle 3** zu entnehmen. Für Transformationen (siehe **2.8.1**) wurde SOC-Medium zur Zellregeneration verwendet. Für Konjugationsversuche (siehe **2.8.3**) wurde ein modifiziertes LB_{mod}-Medium mit niedrigerer Salzkonzentration eingesetzt. Die Konstruktion von Plasmidgenbanken erforderte ein 2-fach konzentriertes LB-Medium.

LB-Medium		SOC-Medium	
Trypton	10 g	Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g	NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml	KCl	2,5 mM
		MgCl ₂	10 mM
		MgSO ₄	10 mM
		H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

2xLB-Medium		LB_{mod}-Medium	
Trypton	20 g	Trypton	10 g
Hefeextrakt	10 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	20 g	NaCl	5 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

2.2.2 Nährmedien für *C. acidurici* 9a

Für die anaerobe Anzucht von *C. acidurici* 9a wurde ein nach Dürre et al. modifiziertes Medium verwendet (Dürre et al, 1981). Als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle diente im Allgemeinen Harnsäure, dessen Konzentration je nach Versuch variieren konnte (**Tab. 3**).

Harnsäure-Medium		
KOH (Plätzchen)	0,67 g	12 mM
K ₂ HPO ₄ (aerob, 523 mg/ml H ₂ O _{bidest})	1,3 ml	4 mM
Harnsäure	2 g	12 mM
Hefeextrakt	1 g	-
MgSO ₄ x 7H ₂ O (aerob, 50 mg/ml H ₂ O _{bidest})	0,7 ml	1,4 x 10 ⁻¹ mM
FeSO ₄ x 7H ₂ O (aerob, 2,5 mg/ml H ₂ O _{bidest})	0,7 ml	6,3 x 10 ⁻³ mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O (aerob, 6 mg/ml H ₂ O _{bidest})	0,7 ml	2,9 x 10 ⁻² mM
MnSO ₄ x H ₂ O (aerob, 16,9 mg/l H ₂ O _{bidest})	1 ml	10 ⁻⁴ mM
Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O (aerob, 26,3 mg/l H ₂ O _{bidest})	1 ml	10 ⁻⁴ mM
Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O (aerob, 32,9 mg/l H ₂ O _{bidest})	1 ml	10 ⁻⁴ mM
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O (aerob, 24,2 mg/l H ₂ O _{bidest})	1 ml	10 ⁻⁴ mM
Resazurin (aerob; 1 mg/ml H ₂ O _{bidest})	1 ml	4,4 x 10 ⁻³ mM
KHCO ₃ (anaerob; 0,33 g/ml H ₂ O _{bidest})	6 ml	20 mM
Thioglykolsäure (99%)	2 ml	29,2 mM
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml	
pH 7,3 – 7,6		

Für Wachstumsversuche mit alternativen Kohlenstoff- und Energiequellen wurde die Harnsäure im Medium durch die entsprechenden Substrate wie Zucker oder Aminosäuren ersetzt. Als Stickstoffquelle diente in diesen Versuchen 2,3 mM Ammoniumsulfat (Dürre, 1981; Dürre et al, 1981). Eine Übersicht über die getesteten Kohlenstoff- und Energiequellen und deren eingesetzten Konzentrationen ist in **Tabelle 3** gegeben.

Tab. 3: Getestete Kohlenstoff- und Energiequellen

Quelle	Endkonzentration
Glukose	30, 100 mM
Fruktose	30, 100 mM
Galaktose	30, 100 mM
Sukrose	30, 100 mM
Ribose	30, 100 mM
Ribulose	30, 100 mM
Glycin/Harnsäure	100/12, 10, 5, 3 mM
Harnsäure	12, 10, 5, 3 mM

Zur Herstellung des Mediums wurde zunächst nur das KOH in ca. 880 ml Wasser gelöst. Dann wurde die Harnsäure hinzugegeben und alles in einem Glasbecher über einem Bunsenbrenner erhitzt, da Harnsäure sich erst durch Erhitzen in einem alkalischen Milieu löst. Die Lösung wurde 25 min lang gekocht, damit schon ein Großteil des gelösten Sauerstoffs entweichen konnte. Kurz vor Ende der Zeit wurden das Resazurin und der Hefeextrakt hinzugegeben. Anschließend wurde alles in eine Schottflasche mit einem Deckel aus Polytetrafluorethylen (PTFE) umgefüllt. Alle restlichen Zutaten bis auf KHCO_3 und die Thioglykolsäure wurden zügig hinzugefügt und die Flasche verschlossen. Sofort danach wurde das Medium unter Begasung mit N_2 in einem Eisbad abgekühlt. Nach derselben Methode wurde ebenfalls eine 1 l-Flasche mit reinem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ behandelt. Unter einem Anaerobenzelt wurden dem Medium anschließend KHCO_3 und Thioglykolsäure hinzugefügt und mit dem begasten Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH wurde mit 5 N KOH eingestellt. Das Abfüllen in Anaeroben-Kulturflaschen oder Hungate-Röhrchen mit Butylgummistopfen erfolgte ebenfalls unter Sauerstoffausschluss im Anaerobenzelt. Das Medium wurde dann in den luftdicht verschlossenen Flaschen autoklaviert.

2.2.3 Medienzusätze

Für viele Versuche waren Zusätze in den Medien erforderlich. Diese und die verwendeten Konzentrationen sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tab. 4: Verwendete Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration¹
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	20, 50, 100 , 150 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	20, 50 , 100, 150 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in 96% Ethanol	5, 10, 30 , 50 µg/ml
Erythromycin	5 mg/ml in 96% Ethanol	5, 10, 50 , 100 µg/ml
Thiamphenicol	20 mg/ml in DMF	2, 5, 15 , 30 µg/ml
Spectinomycin	150 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	20, 50, 100 , 200 µg/ml
Tetracyclin-HCl	5 mg/ml in 70% Ethanol	5, 10, 20 , 30 µg/ml
Clarithromycin	10 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	2, 5, 10 , 20 µg/ml
Gentamicin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	10, 20, 50 , 100 µg/ml
Vancomycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	5, 10, 20 , 40 µg/ml
Bacitracin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	10, 30 , 50, 100 µg/ml
Acriflavin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	50, 150, 250 , 350 µg/ml
4-Azaleucin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	30, 50, 100 , 200 µg/ml
Polymyxin B	20 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	20 µg/ml
IPTG	240 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	240 µg/ml
X-Gal	80 mg/ml in DMF	80 µg/ml

¹ Fett markierte Werte stellen die vom Hersteller empfohlenen Arbeitskonzentrationen dar

Die vom Hersteller empfohlenen Arbeitskonzentrationen sind in fett markiert und wurden in der Regel für die meisten Experimente eingesetzt, abgesehen von Antibiotikatests, wo zum Testen mehrere Konzentrationen erforderlich waren. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.2.4 Zellanzucht

E. coli-Stämme wurden in der Regel aerob im oben genannten LB-Medium bei 37°C, bzw. 30°C und 225 rpm auf einem Rundschtüttler angezogen. Inokuliert wurde entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder mit einer OD_{600nm} (Optische Dichte photometrisch gemessen bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm) von 0,1 aus Flüssigmedium heraus in Rundkolben oder Reagenzröhrchen mit Aluminiumkappe.

Da die Anzucht von *C. acidurici* 9a strikt anaerob erfolgen musste, wurden Inokulationen unter dem Anaerobenzelt durchgeführt. Diese wurden entweder mit gefriergetrocknetem Zellmaterial von der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt oder durch 10%iges Überimpfen aus einer flüssigen Kultur. Dies entsprach in etwa einer OD_{600nm} von 0,1. Bei größeren Volumina fand die Inkubation in anaeroben Serumflaschen, verschlossen mit Latexsepten, unbewegt bei 37°C statt. Für kleinere Volumina bis 10 ml wurde nach der Methode von Hungate (Hungate, 1969) in Hungate-Röhrchen mit Butylsepten inkubiert.

2.2.5 Verfolgung des Bakterienwachstums durch Messung der optischen Dichte

Zur Bestimmung des Bakterienwachstums wurde die optische Dichte als Absorptionswert bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm (OD_{600nm}) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Die Messung erfolgte direkt im Hungate- oder Reagenzröhrchen mit einem WPA CO8000 Biowave Cell Density Meter (Fa. Biochrom, Cambridge, UK).

2.2.6 Lagerung von Bakterienkulturen und Reinheitskontrollen

E. coli-Kulturen wurden für eine kurzfristige Haltung auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend für maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurde 1 ml einer ü.N.-Flüssigkultur mit 500 µl einer 87%igen Glycerinlösung (w/v) versetzt und bei -80 °C eingefroren. Reinheitskontrollen erfolgten durch

regelmäßige Verdünnungsausstriche auf entsprechende Agarplatten und Überprüfung der Zellmorphologie mit einem Phasenkontrastmikroskop BX41 (Fa. Olympus, Hamburg).

Da *C. acidurici* 9a nicht verlässlich auf Agarplatten wuchs und die Vereinzelnung einer Kolonie so nicht möglich war, wurde nach jeder Anzucht in Flüssigmedium die Kultur mikroskopisch auf eine einheitliche Zellform überprüft. Gleichzeitig wurde zweimal wöchentlich in frisches Flüssigmedium überimpft. Die Kulturen blieben dabei zur Inkubation bei Raumtemperatur stehen. Durch das Eingießen von 1 ml Bakteriensuspension mit auf 46 °C abgekühltem Agar in Hungate-Röhrchen konnte die Kultur über 2-3 Monate hinweg bei 4 °C gelagert werden. Die Reaktivierung erfolgte durch die anaerobe Überschichtung mit neuem Medium gefolgt von einer Bebrütung bei 37 °C. Zur längerfristigen Lagerung wurden 5 ml-Kulturen in Harnsäure-Medium über 5 Tage hinweg bei 37 °C inkubiert und regelmäßig auf Sporenbildung hin mikroskopisch untersucht. Waren genügend Sporen vorhanden, wurden die restlichen Zellen und Sporen zentrifugiert, in 200 µl Medium resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Suspensionen für 15 min bei 80 °C erhitzt, um eventuell noch vitale Zellen abzutöten. Die Suspensionen konnten dann bei -20 °C über mehrere Monate hinweg gelagert werden. Die Reaktivierung der Sporen erfolgte durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min und anschließender Inokulation in frisches Harnsäure-Medium. Inkubiert wurde bei 37 °C.

2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus *C. acidurici* 9a

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *C. acidurici* 9a wurde das „MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit“ von der Firma Epicentre (Madison, USA) verwendet. Die einzelnen Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Statt in TE-Puffer wurde die aufgereinigte DNA zum Schluss jedoch in 10 mM Tris-Puffer pH 7,5 gelöst, da TE-Puffer Substanzen enthält, die sich bei Folgeversuchen störend auswirken könnten.

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen erfolgte mit dem „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Bei Plasmid-Isolierungen im großen Maßstab, wie etwa bei der Erstellung von *shotgun*-Genbanken (siehe **2.9.3**), wurde nicht mehr manuell präpariert, sondern maschinell unter Zuhilfenahme eines BioRobot 8000 der Firma Qiagen (Hilden). Das dabei verwendete „QIAprep® 96 TurboRobot Kit“ wurde ebenfalls von Qiagen bezogen. Sogenannte *flat-bottom*-Blöcke mit 96 Reaktionsmulden wurden mit 2 ml 2x LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum befüllt und mit je einem gepickten Klon pro Mulde inokuliert. Die Anzucht erfolgte wie in **2.2.4** beschrieben, jedoch mit einer erhöhten Drehzahl des Rundschüttlers von 335 rpm. Die Präparation der Plasmide wurde anschließend nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. acidurici* 9a

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. acidurici* 9a fand ein modifiziertes Protokoll des „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) Anwendung. Zu 200 µl des im Kit enthaltenen P1-Puffers wurden 50 µl Lysozym (20 mg/ml) gegeben und gemischt. Das Zellpellet einer 10 ml ü.N.-Kultur von *C. acidurici* 9a wurde in diesem Gemisch resuspendiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte, beginnend mit der Zugabe des Puffers P2, wurden wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

2.3.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. acidurici* 9a

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. acidurici* 9a erfolgte mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kit“ von Qiagen (Hilden) aus Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen. Die Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Verdau der Rest-DNA mit der „Ambion® TURBO DNA-free“ DNase (Ambion, Fa. Life Technologies, Grand Island, USA), ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Soweit sie hitzestabil waren, wurden Geräte und Lösungen bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min im Autoklaven sterilisiert. Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden sterilfiltriert. Hitzelabile Geräte wurden mit 70%igem (v/v) Ethanol benetzt oder abgeflammt.

Für Arbeiten mit der sehr empfindlichen RNA mussten einige gesonderte Vorkehrungen getroffen werden. Für alle Vorgänge, bei denen H₂O benötigt wurde, wie das Ansetzen von Puffern etc., wurde das H₂O_{bidest} vor dem Autoklavieren mit 0,1% Diethylpyrcarbonat (DEPC) versetzt, 12 h bei 40 °C rührend inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert. Dieses diente der Inaktivierung von RNasen durch kovalente Modifikation (Fedorcsák & Ehrenberg, 1966). Durch das Autoklavieren zersetzte sich das DEPC anschließend zu CO₂ und Ethanol (Kumar & Lindberg, 1972). Alle hitzestabilen Geräte, Materialien und Lösungen wurden für Arbeiten mit RNA doppelt autoklaviert. Hitzelabile Geräte wurden erst mit 3% (v/v) H₂O₂ ausgespült und anschließend mit DEPC-H₂O_{bidest}.

2.4.2 Fällung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren

Falls nötig, wurden Nukleinsäure-haltige Lösungen zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung mit Ethanol gefällt. 2-3 Vol. 96%iger (v/v) Ethanol wurden mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) versetzt und mit der Nukleinsäure-Lösung vermischt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte dann bei -20 °C über Nacht oder bei -80 °C für mindestens 30 min. Anschließend wurde bei 13.000 rpm und 4 °C 30 min lang zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen und erneut bei 13.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls vorsichtig abgenommen und das Pellet für mind. 10 min unter der Sterilbank luftgetrocknet. Anschließend wurde es in sterilem H₂O_{bidest} oder Tris-Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Für eine Fällung mit Isopropanol statt Ethanol wurden 0,7 Vol. Isopropanol hinzugegeben und wie bereits oben beschrieben weiter verfahren. Bei dieser Methode war keine Inkubation erforderlich. Unempfindlichere Nukleinsäure-Lösungen wie aufgereinigte PCR-Produkte, wurden mit Hilfe eines „Concentrator 5301“ (Fa. Eppendorf, Hamburg) für 5-15 min bei 30-60 °C aufkonzentriert.

2.4.3 Auftrennung von Nukleinsäuren

2.4.3.1 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die analytische Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese wurden Elektrophoresekammern von der Fa. G&P Kunststofftechnik (Kassel) verwendet. Standardmäßig betrug der Anteil an Agarose 0,8% und wurde in 1x TAE-Puffer (Sambrook et al, 1989) gelöst. Für kleinere aufzutrennende Fragmente betrug der Anteil 1,5% oder sogar 3%. Die gelöste Agarose wurde in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Flüssigkeit vollständig klar erschien und keine Partikel mehr sichtbar waren. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen und der entsprechende Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Anschließend wurde das vollständig erkaltete Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 0,4 Vol. Ladepuffer versetzt, der einerseits zum Beschweren der Proben

diente und andererseits zum Verfolgen der Proben-Lauffront. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung wurden zusätzlich 4 μl Größenstandard (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen (siehe 2.4.5). Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 V und einer Stromstärke von 400 mA für 45 min bis 2 h. Anschließend wurde das Gel in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 10-15 min inkubiert, 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ entfärbt und die Banden mittels eines UV-Transilluminators (AlphaImager® HP, Alpha Innotech, Kasendorf) bei einer Wellenlänge von $\lambda=302$ nm visualisiert und fotografiert.

Für präparative Gelelektrophorese galten dieselben Bedingungen wie für die analytische. Allerdings wurde der Teil mit dem Größenstandard vom Rest des Gels nach der Auftrennung entfernt und alleine im Ethidiumbromid-Färbebad inkubiert, um Schäden an der Probe durch das Ethidiumbromid zu vermeiden. Anschließend wurde auf dem Gelstück mit dem Größenstandard unter UV-Licht der Bereich von Interesse mit dem Skalpell markiert. Die Gelstücke wurden danach wieder zusammengeführt und die Proben anhand der Markierungen am Größenstandard ausgeschnitten. Mittels Gel-Extraktion (siehe 2.4.7) konnte die DNA anschließend aus den Gelstücken extrahiert werden. Der verbliebene Rest des Gels wurde ebenfalls mit Ethidiumbromid gefärbt, um die Abtrennung zu überprüfen.

50x TAE-Puffer

Tris	242 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,2 g
Essigsäure (konzentriert)	57 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	<i>ad</i> 1000 ml
pH 8,5	

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,125 g
Xylencyanol	0,125 g
Ficoll 400	7,5 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	<i>ad</i> 50 ml

Ethidiumbromid-Färbebad

Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	70 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	<i>ad</i> 700 ml

2.4.3.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, da RNA als einzelsträngiges Molekül in der Lage ist durch intramolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen auszubilden, welche die Auftrennung verfälschen würden. Denaturierende Gele wurden nur zu Analysezwecken verwendet. Hierzu enthielt das 1%ige Agarosegel zusätzlich 3% Formaldehyd. Die Agarose wurde in 1x MOPS-Puffer gelöst und das Gel wie bei der nativen Gelelektrophorese gegossen. Das erkaltete Gel wurde mit 1x MOPS-Puffer überschichtet und vor dem Auftragen der Proben ein Vorlauf von 10 min bei 100 V eingestellt. Zur Probenvorbereitung wurden 2 µl RNA-Marker mit 2 µl Ladepuffer versetzt (beides Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Die so präparierten Proben wurden für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis für 5 min abgekühlt. Zusammen mit einem RNA-Größenstandard (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) wurden sie auf das Gel aufgetragen und bei 70 V und 400 mA für 2-2,5 h aufgetrennt. Da der verwendete Laufpuffer bereits Ethidiumbromid enthielt, war ein Anfärben des Gels nach der Auftrennung nicht notwendig. Die Detektion der RNA im Gel erfolgte wie bei nativen Gelen mittels eines UV-Transilluminators (AlphaImager® HP, Alpha Innotech, Kasendorf) bei einer Wellenlänge von $\lambda=302$ nm.

10x MOPS-Puffer

MOPS	46,2 g
Natriumacetat	4,1 g
EDTA	2,9 g
DEPC-H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 1000 ml
pH 7,0	

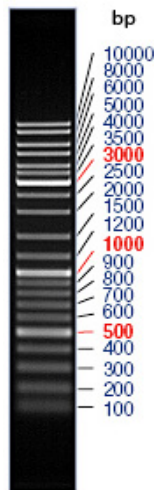
2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationen von DNA und RNA in Lösungen wurden mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop® 1000, Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm

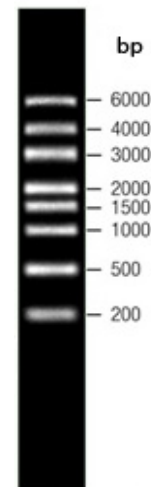
bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder Tris-Pufferlösung, abhängig davon, worin die Nukleinsäuren gelöst waren. Bei einer $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 wurde bei doppelsträngiger DNA eine Konzentration von $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ angenommen und bei RNA von $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Die Reinheit der DNA konnte mit der Absorption bei $\lambda=230 \text{ nm}$ und $\lambda=280 \text{ nm}$ abgeschätzt werden. Reine DNA würde einen Wert von 1,8 im Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}}$ und 2,2 im Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ aufweisen (Sambrook & Russell, 2001). Kontaminationen wie Proteine hätten eine erhöhte Absorption bei $\lambda=280 \text{ nm}$ zur Folge, während Polysaccharide in eine erhöhte Absorption bei $\lambda=230 \text{ nm}$ resultieren.

2.4.5 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Größe linearer DNA- oder RNA-Fragmente wurde annähernd durch direkten Vergleich mit parallel zur Probe elektrophoretisch aufgetrennten Molekülen definierter Größe bestimmt. Zum Einsatz kamen dabei folgende Größenstandards (Marker):



GeneRuler™ DNA Ladder Mix



RiboRuler™ High Range RNA Ladder

2.4.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte wurden standardmäßig mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt, um Nukleotide, Puffer und Enzymreste zu entfernen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Aus der präparativen Gel-Elektrophorese gewonnene DNA-Fragmente wie PCR-Produkte oder geschnittene Plasmide (siehe 2.4.3.1) wurden mit Hilfe des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.8 Scheren von DNA

Für die Herstellung von sogenannten *shotgun*-Genbanken (siehe **2.9.3**) zum Lückenschluss von schwierigen und großen Genombereichen musste die DNA in Fragmente geschert werden. Hierbei kam ein Nebulizer (Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt) zum Einsatz. 2-5 µg DNA wurden mit 5 Vol. Scher-Puffer (TE mit 10% Glycerol, pH 8,0) in einem mindestens 600 µl umfassenden Ansatz versetzt und in das Nebulizer-Gefäß überführt. Dieses Gefäß wurde mit einem Schlauch an ein Druckluftsystem angeschlossen und die DNA so bei einem Druck von 3 bar für 10-30 sec geschert. Die Länge des Vorgangs richtete sich dabei nach der gewünschten Durchschnittsgröße der Fragmente. In der Regel reichten 15 sec für Fragmente im Bereich von 1-3 kb. Anschließend musste die DNA von Pufferresten befreit werden und wurde mit dem „MinElute® PCR Purification Kit“ (Fa. QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und der Ansatz auf insgesamt 40 µl reduziert. Danach wurde die aufgereinigte und gescherte DNA mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.3.1) aufgetrennt und die entsprechenden Bereiche aus dem Gel extrahiert (siehe **2.4.7**).

2.4.9 Reverse Transkription (RT-PCR)

Zum Nachweis von Transkripten wurde aus *C. acidurici* 9a isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und das zu untersuchende DNA-Fragment anschließend mittels PCR amplifiziert (siehe 2.5.1). Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 0,1-5 µg DNA-freie Gesamt-RNA eingesetzt. Als Kontrollen dienten nicht umgeschriebene RNA und chromosomale DNA von *C. acidurici* 9a.

Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese

Gesamt-RNA	x µl
<i>Random hexamer primer</i>	1 µl
Nuklease-freies H ₂ O _{bidest}	ad 12 µl
5x Reaktions-Puffer	4 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
RevertAid™ H minus Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

Dabei war es wichtig, dass die einzelnen Komponenten in der oben aufgeführten Reihenfolge nacheinander hinzugefügt wurden. Nach der reversen Transkription wurden die Ansätze mit Nuklease-freiem Wasser auf 50 µl verdünnt und jeweils 1 µl in einer semiquantitativen PCR eingesetzt (siehe 2.5.1).

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.5.1 Standard-PCR

Je nach Verwendungszweck kamen zur Amplifikation von PCR-Produkten verschiedene Polymerasen zum Einsatz. Standardmäßig wurde die „BIO-X-ACT™ Short DNA-Polymerase“ (Fa. Bioline, Luckenwalde) benutzt. Schwierige und große Produkte wurden mit der „Phusion™ Hot Start High-Fidelity Polymerase“ (Fa. Finnzymes, Vantaa, Finnland) amplifiziert, welche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt (*proofreading*) und glatte Enden (*blunt ends*) am PCR-Produkt produziert. PCR-Ansätze wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers erstellt. Ein Standard-PCR-Ansatz für die beiden Polymerasen ist in **Tabelle 5** beschrieben.

Tab. 5: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	BIO-X-ACT™ Short DNA-Polymerase	Phusion™ Hot Start High-Fidelity Polymerase
Oligonukleotid 1 (5 pmol/μl)	4 μl	4 μl
Oligonukleotid 2 (5 pmol/μl)	4 μl	4 μl
Puffer	5 μl	10 μl
<i>template</i> -DNA (100 ng/μl)	1 μl	1 μl
dNTP's (10 mM)	5 μl	1 μl
MgCl ₂ (50 mM)	3 μl	-
Polymerase	2 U	1 U
H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 50 μl	<i>ad</i> 50 μl

Die PCR-Reaktionen wurden in einem „Primus advanced HT4X High-Throughput-Viererblocksystm“ (Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen) oder einem „Primus 96 plus Thermal Cycler“ (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Folgende Programme fanden dabei Anwendung:

BIO-X-ACT™ Short DNA-Polymerase:	2 min, 98 °C	Denaturierung
	30x { 20 sec, 96 °C	Denaturierung
	20 sec, 50-64 °C	<i>Annealing</i>
	1-12 min, 68 °C	Extension
	10 min, 72 °C	Extension
Phusion™ Hot Start High-Fidelity Polymerase:	2 min, 98 °C	Denaturierung
	30x { 20 sec, 96 °C	Denaturierung
	20 sec, 50-64 °C	<i>Annealing</i>
	1-12 min, 68 °C	Extension
	10 min, 72 °C	Extension

Die Extensionszeit richtete sich nach der Größe der zu erwartenden PCR-Produkte, wobei standardmäßig mit ca. 1 min für 1 kb gerechnet wurde. Oligonukleotide (*primer*) wurden direkt in dem Sequenzbearbeitungs-Programm Gap4 innerhalb des Staden-Packages (Staden et al, 2000) oder dem *web*-basierten Programm Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) abgeleitet. Die jeweiligen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden vom Programm automatisch berechnet und in der PCR-Reaktion als entsprechende *annealing*-Temperaturen eingesetzt. Waren diese für die *forward* bzw. *reverse primer* unterschiedlich, so wurde der niedrigere Wert verwendet. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide findet sich im Anhang (**A.I., Tab. 13**) Für eine semiquantitative PCR mit cDNA (siehe **2.4.9**) wurde die Zyklenzahl auf 20 Zyklen reduziert, so dass die Amplifikation vor Beginn des exponentiellen Bereichs lag und somit eine Abschätzung von Unterschieden in der Transkriptionsstärke der amplifizierten DNA-Bereiche möglich war.

2.5.2 Vektorette-PCR (Riley et al, 1990)

Nach der Rohsequenzierung des Genoms von *C. acidurici* 9a wurde zur Identifikation unbekannter Genomabschnitte und damit der Anordnung von *contigs*, also einem Set von überlappenden DNA-Stücken (*reads*), in ihre richtige Reihenfolge die Vektorette-PCR nach Riley et al. verwendet (Riley et al, 1990). Dabei wurden 5 µg genomische DNA von *C. acidurici*

9a mit den Restriktionsenzymen *Cla*I bzw. *Pvu*II (Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main) in einem Gesamtvolumen von 20 µl vollständig geschnitten. Die entstandenen Fragmente wiesen eine Größe von etwa 3.000 bis 9.000 bp auf. Danach wurde die sogenannte *bubble*-DNA durch eine Inkubation der Oligonukleotide ABPFW und ABPRV (**A.I., Tab. 13**) für 10 min bei 65 °C in einem Endvolumen von 84 µl hergestellt. Bei dieser Einheit handelt es sich um ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit bekannter Sequenz, wovon aber nur die Anfänge und Enden komplementär sind, so dass sich in der Mitte eine Blase bildet. Zur Stabilisierung der endständigen Doppelstrangbildung der *bubble*-DNA wurden anschließend 6 µl MgCl₂ (25 mM) hinzugegeben und der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine Lagerung war über einen längeren Zeitraum bei -20 °C möglich. ABPFW und ABPRV waren so entworfen worden, dass sie Überhänge der jeweils verwendeten Restriktionsenzyme aufwiesen, damit die Ligation and die DNA-Fragmente erfolgreich stattfinden konnte. Die *bubble*-DNA wurde mit dem gesamten Volumen der geschnittenen DNA-Fragmente über Nacht bei 16 °C ligiert. Das Endvolumen betrug 50 µl (1x Reaktionspuffer, 5% PEG-4000, 2 U T4-DNA-Ligase, 3 µl *bubble* DNA, 20 µl DNA-Fragmente). Diese Ligationsansätze konnten direkt als *template* für eine PCR-Reaktion eingesetzt werden (siehe **Tab. 5**). Hierfür wurden als Oligonukleotide für die Amplifikation jeweils ein spezifischer aus den bereits bekannten Endbereichen der *contigs* verwendet und das Oligonukleotid UVkneu (**A.I., Tab. 13**), welches zum *mismatch*-Bereich der *bubble*-DNA komplementär ist. Letzteres bindet an den im ersten Zyklus entstehenden Strang und erst im zweiten Zyklus kann eine vollständige Amplifizierung des Produktes zwischen den beiden Oligonukleotiden stattfinden. Dadurch wird eine unerwünschte Amplifikation von DNA-Bereichen zwischen zwei *bubble*-Einheiten vermieden.

2.5.3 Multiplex-PCR (Tettelin et al, 1999)

Als weitere Methode zur Bestimmung der *contig*-Reihenfolge wurde die Multiplex-PCR eingesetzt. Bei dieser handelt es sich um eine Variante der PCR, welche eine simultane Amplifizierung mehrerer Produkte von Interesse ermöglichte, in dem in einer Reaktion nicht nur ein Oligonukleotid-Paar eingesetzt wurde, sondern bis zu vier in einem sogenannten *pool*. Ein Paar bestand dabei jeweils aus Oligonukleotiden, die passend zu zwei Enden eines *contigs*

entworfen worden waren. Mit je zwei *pools* von Oligonukleotid-Paaren wurden PCR-Reaktionen in einem Endvolumen von 25 µl wie in 2.5.1 beschrieben angesetzt mit einer Endkonzentration von 1 µM je *primer*-Paar, so dass lediglich die Menge an Wasser angepasst werden musste. Die Reaktionen wurden nach einem Schema angesetzt, in welchem jeder *pool* im Endeffekt mit jedem anderen einmal in einer Reaktion kombiniert wurde, so dass ein PCR-Produkt nur entstehen konnte, wenn zwei *pools* zweier zusammengehöriger *contigs* kombiniert worden waren. Ein Großteil an Kombinationsmöglichkeiten der *contigs* konnte so von vornherein ausgeschlossen werden. Anschließend mussten bei einem positiven PCR-Produkt PCR-Reaktionen mit den Einzel-Oligonukleotiden der *pools* angesetzt werden, um die genauen *primer*-Paarungen in Erfahrung zu bringen.

2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsverdaue dienten sowohl analytischen als auch präparativen Zwecken. Bei analytischen Restriktionen wurden etwa 1-2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt, da diese meist einer Längenüberprüfung von *Inserts* in einem klonierten Plasmid diene. Der Verdau erfolgte dann für 2-3 h bei 37 °C oder der vom Hersteller des Enzyms angegebenen optimalen Temperatur. Für präparative Zwecke wurden dagegen bis zu 20 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Diese Restriktionsansätze dienten hauptsächlich dem vollständigen Verdau von Plasmiden, PCR-Produkten oder genomischer DNA für spätere Klonierungsschritte. Daher wurden sie bei 37 °C (oder empfohlener Temperatur) über Nacht durchgeführt, damit die Vollständigkeit der Restriktion gewährleistet war. Standardmäßig wurde die Reaktion in einem vom Hersteller des Enzyms mitgelieferten Puffersystem mit 3-5 U Enzym pro µg DNA durchgeführt. Sollte mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten werden, wurde ein Puffersystem gewählt, in dem beide Enzyme gute Aktivitäten zeigten. War dies nicht möglich, wurde nacheinander verdaut, wobei mit derjenigen Restriktionsendonuklease mit dem Puffersystem mit der niedrigeren Ionenstärke begonnen wurde und für den folgenden zweiten Verdau dann eine Anpassung der Ionenstärken vorgenommen. Inaktivierungen von

Restriktionsenzymen erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Restriktion wurde mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.6.2 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung von restriktionsverdauten Vektoren diente der Vermeidung einer Religation. Dazu wurden die 5'-Phosphat-Gruppen der linearen DNA-Fragmente mit 5 U der alkalinen Phosphatase FastAPTM (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) pro μg DNA entfernt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10 min. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend bei 75 °C für 5 min.

Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung

DNA	x μl
10x FastAP TM -Puffer	10 μl
FastAP TM Phosphatase (1U/ μl)	x μl
H ₂ O _{bidest}	ad 100 μl

2.6.3 Erstellen von glatten Enden (*blunt ends*)

Zur Glättung von Überhängen an DNA-Fragmenten wurden diese mit 1-2 U/ μg DNA einer T4-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt. Durch seine 3'-Exonuklease-Aktivität schneidet dieses Enzym 3'-Überhänge ab und füllt in Kombination mit dNTPs 5'-Überhänge auf (Sambrook & Russell, 2001). Wie auch schon die Dephosphorylierung fand diese Methode besonders im Bereich der Klonierung zur Anpassung der Enden von gescherter DNA Anwendung. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt (siehe **2.4.6**) und in H₂O_{bidest} eluiert.

Reaktionsansatz zur Erzeugung von glatten Enden

DNA	x μ l
5x T4-DNA-Polymerase-Puffer	10 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	5 μ l
T4-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	x μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 50 μ l

2.6.4 Erstellen von 3'-Adenosinüberhängen

Bei Klonierungen mit den „TOPO® Cloning® Kits“ (Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt) wurden an den 3'-Enden der zu klonierenden DNA-Fragmente Adenosinüberhänge benötigt (siehe 2.7.1). Falls diese nicht bereits vorhanden waren, wurden sie mit Hilfe von 1 U/ μ g DNA einer *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) erzeugt. Die Inkubation erfolgte bei 72 °C für 25 min. Anschließend wurde die DNA wie in 2.4.6 beschrieben aufgereinigt und in H₂O_{bidest} eluiert.

Reaktionsansatz zur Erzeugung von 3'-Adenosinüberhängen

DNA mit glatten Enden	x μ l
10x <i>Taq</i> -(NH ₄)SO ₄ -Puffer ohne MgCl ₂	7 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	6 μ l
dATP (2 mM)	6 μ l
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	x μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 70 μ l

2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Klonierungen fanden ausschließlich mit Kits und damit industriell gefertigten Klonierungsvektoren verschiedener Firmen statt. Sie dienten hauptsächlich dem Lückenschluss

an schwierigen und großen Bereichen bei der Genom-Sequenzierung, wo mit *primer walking* keine Erfolge erzielt werden konnten.

2.7.1 TOPO®-Klonierung (Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt)

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten mit Größen von bis zu 4 kb wurde das „TOPO® TA Cloning® Kit“ (Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Größere Fragmente bis 10 kb wurden mit dem „TOPO® XL Cloning® Kit“ (ebenfalls Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt) kloniert. Die in **2.6.4** erstellten 3'-Adenosinüberhänge an DNA-Fragmenten wurden sich in diesem Verfahren zunutze gemacht, indem sich diese an die 3'-Thymidinüberhänge des pCR™4-TOPO® TA- oder pCR®-XL-TOPO®-Vektors anlagerten. Bei einer TOPO® TA-Klonierung wurde der Ligationsansatz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde er entweder direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe **2.8.1**) oder konnte bis zu 3 Tage bei -20 °C aufbewahrt werden.

TOPO® TA-Reaktionsansatz

DNA	4 µl
<i>Salt solution</i> (1:4 verdünnt)	1 µl
Vektor pCR™4-TOPO® TA	1 µl

Für eine TOPO® XL-Klonierung wurde nur 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1µl 6x TOPO® *cloning stop*-Lösung. Auch hier wurde entweder direkt in kompetente *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (siehe **2.8.1**) oder der Ansatz für 2 Tage bei -20 °C gelagert.

Inserts in Vektoren der TOPO®-Reihe konnten mit den Oligonukleotiden M13for und M13rev (**A.I., Tab. 13**) sequenziert werden.

TOPO® XL-Reaktionsansatz

DNA	4 µl
Vektor pCR®-XL-TOPO®	1 µl

2.7.2 pGEM®-T Easy-Klonierung (Fa. Promega, Madison, USA)

Für Klonierungen von DNA-Fragmenten mit einer Größe von bis zu 5 kb wurde alternativ zum „TOPO® TA Cloning® Kit“ mit dem „pGEM®-T Easy Vector System“ (Fa. Promega, Madison, USA) gearbeitet. Auch hier mussten DNA-Fragmente mit 3'-Adenosinüberhängen benutzt werden, die sich an die 3'-Thymidinüberhänge des pGEM®-T Easy-Vektor anlagern konnten. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h oder bei 4 °C über Nacht, wenn die maximale Anzahl an Klonen benötigt wurde. Der Ansatz wurde direkt in kompetente *E.coli* DH10B-Zellen transformiert (siehe 2.8.1) oder bei -20 °C für ein paar Tage gelagert. *Inserts* konnten in diesem Vektor mit den Oligonukleotiden M13for und M13rev sequenziert werden.

pGEM®-T Easy -Reaktionsansatz

DNA	3 µl
<i>Rapid ligation</i> -Puffer	5 µl
pGEM®-T Easy-Vektor	1 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

2.8 DNA-Transfer in *E. coli* und *C. acidurici* 9a

DNA-Transfer in *E.coli* diene im Allgemeinen ausschließlich der Vermehrung von Plasmid-DNA und ihrer anschließenden Analyse. DNA-Transfer in *C. acidurici* 9a diene zunächst nur der Erprobung verschiedener Methoden, diesen Organismus genetisch zugänglich zu machen, um eventuell spätere Experimente anschließen zu können. Hierfür wurde zum Testen das Plasmid pKV12 verwendet.

2.8.1 Transformation von DNA in *E.coli* durch Elektroporation

Für die Transformation von TOPO®-Klonierungsansätzen in *E.coli* wurden ausschließlich elektrokompente „One Shot® TOP10 Electrocomp™“ Zellen verwendet und für die Transformation von pGEM®-T Easy-Klonierungsansätze nur „ElectroMAX DH10B™“ Zellen (beide Invitrogen™, Fa. Life Technologies, Darmstadt). Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert und kurz vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Bei der Elektroporation von TOP10-Zellen wurden 50 µl aufgetaute Zellsuspension mit 2 µl Klonierungsansatz versetzt, bei DH10B-Zellen 20 µl Zellsuspension mit 1 µl Klonierungsansatz. Die Klonierungsansätze wurden zuvor auf einer Nitrocellulosemembran (Fa. Millipore, Billerica, USA) durch Dialyse entsalzt, da Salze sich bei der Elektroporation störend auswirken könnten. Der Elektroporationsansatz wurde vorsichtig durchmischt und in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette (Fa. Peqlab, Erlangen) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Elektroporiert wurde mit einem GenePulser™ II (Fa. Bio-Rad, München) bei einer Spannung von 2,0 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Die Reaktionszeit sollte 4-5 sec betragen. Zur Regeneration wurden die Zellen nach der Elektroporation in 1 ml SOC-Medium aufgenommen (siehe 2.2.1) und 1 h bei 37 °C im Rundschüttler inkubiert. Anschließend wurden 50-200 µl auf LB-Selektivagarplatten mit entsprechenden Antibiotika ü.N. bei 37 °C inkubiert. Diese Platten enthielten zusätzlich 0,1 µl/ml IPTG und 0,5 µl/ml X-Gal, so dass eine anschließende Blau-Weiß-Selektion positiver Klone möglich war. Diese Methode beruht darauf, dass die *multiple cloning site*, in der die Fremd-DNA eingebracht wird, in den meisten kommerziellen Klonierungsvektoren in der C-terminalen kodierenden Sequenz des β-Galaktosidase-Markergens *lacZ* liegt (<http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/BlauWeiss.pdf>). Dieser sogenannte α-Donor ist in der Lage, die C-terminal deletierte β-Galaktosidase auf dem Genom des Transformationsstammes zu komplementieren. Bei Vektoren ohne *insert* wird also durch die Zugabe von IPTG die Transkription des *lacZ*-Gens induziert und eine vollständig funktionsfähige β-Galaktosidase exprimiert, die unter der Freisetzung eines blauen Farbstoffes das Indikatorsubstrat X-Gal spalten kann. Wird die kodierende Sequenz des *lacZ*-Gens auf dem Vektor von einem insert unterbrochen, kann die Transkription nicht stattfinden und X-Gal nicht gespalten werden, so

dass Kolonien auf den Platten mit einem erfolgreich klonierten *insert* weiß bleiben, während Kolonien ohne *insert* blau erscheinen.

2.8.2 DNA-Transfer in *C. acidurici* 9a durch Elektroporation

Die Elektroporation von *C. acidurici* 9a wurde nach einem modifizierten Protokoll zur Elektroporation von *Clostridium ljungdahlii* der Arbeitsgruppe Peter Dürre, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Ulm durchgeführt (Köpke et al, 2010).

50 ml einer anaeroben *C. acidurici* 9a-Kultur in Harnsäure-Medium wurden über 2-3 Tage täglich überimpft, um eine intakte Zellenpopulation zu erhalten. Anschließend wurden 200 ml frisches Medium mit einer OD_{600nm} von 0,1 inokuliert. Gleichzeitig wurde 40 mM DL-Threonin hinzugefügt, um die Zellwände zu schwächen. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 wachsen gelassen und anschließend 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Kulturgefäße möglichst ohne Erschütterung in das Anaerobenzelt eingeschleust und der Überstand unter anaeroben Bedingungen vorsichtig entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit 25 ml eiskaltem SMP-Puffer (270 mM Saccharose, 7 mM Natriumphosphat, 1 mM MgCl₂, pH 7,4) gewaschen und jeweils wieder 10 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet anaerob in 0,6 ml kaltem SMP-Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls unter anaeroben Bedingungen. 1 µg Plasmid wurde in einer auf Eis gekühlten Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,4 mm vorgelegt, mit dem Zellgemisch versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Elektroporiert wurde anschließend mit einem GenePulser II (Fa. Bio-Rad, München) und einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Sofort danach wurden die Zellen in ein Hungate-Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Harnsäure-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde aus dieser Kultur einmal 20%ig und einmal 10%ig in Hungates mit frischem Medium inokuliert, damit das Zellwachstum besser bestimmt werden konnte. Sobald Zellwachstum wieder sichtbar wurde (ca. 2-3 Stunden), wurde 10%ig in selektives Harnsäure-Medium mit Antibiotikum überführt und weiter bei 37 °C inkubiert.

2.8.3 DNA-Transfer in *C. acidurici* 9a durch Konjugation

Die Konjugation erfolgte zwischen *C. acidurici* 9a als Akzeptorstamm und *E. coli* S17-1 (Simon et al, 1983) als Donorstamm, welcher bereits das Plasmid pKV12 in sich trug. Dieser Stamm besitzt Chromosom-integriert bereits alle Gene, die für die Ausbildung der Konjugation notwendig sind. Es wurden verschiedene Protokolle getestet und modifiziert (Bertram et al, 1991; Rachinger, 2010; Strätz et al, 1994).

Für das modifizierte Protokoll nach Rachinger (2010) wurden jeweils 10 ml des Donor- und Akzeptorstamms in ihrem entsprechenden Grundmedium in Hungate-Röhrchen über Nacht angezogen, wobei das Medium des Donorstamms bereits Kanamycin enthielt, da dies eine Selektivität gegenüber den Plasmid-tragenden Zellen verschaffte. Da *E. coli* in der Lage ist auch anaerob zu wachsen, wurde dieser Organismus gleich auf diese Weise angezogen, da alle Schritte, in die später beide Stämme involviert waren ebenfalls unter strikt anaeroben Bedingungen stattfanden. Am nächsten Tag wurde der Akzeptorstamm in 10 ml frisches Harnsäuremedium überführt und der Donorstamm in LB_{mod}-Medium, jeweils mit einer OD_{600nm} von 0,1. Der Donorstamm wurde bis zu einer OD_{600nm} 1,2 wachsen gelassen, der Akzeptorstamm bis 0,5. Dies entsprach etwa jeweils der exponentiellen Phase beider Stämme. Beide wurden anschließend bei 3200 rpm für 10 min zentrifugiert und mit ihrem jeweiligen Medium einmal gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Pellet des Akzeptorstammes wurde in 1 ml Harnsäuremedium resuspendiert, auf das Pellet des Donorstammes getropft und dieses dann resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 3200 rpm für 10 min wurde der Überstand vollständig abgenommen und das vermischte Akzeptor-/Donor-Pellet in 200 µl Harnsäure-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension bei 30 °C für maximal 15-16 h inkubiert. Die Selektion gegen *E. coli* und Plasmid-freie *C. acidurici* 9a-Zellen erfolgte mittels Überführung in 10 ml Harnsäure-Medium supplementiert mit Polymyxin B und Kanamycin und einer anschließenden Inkubation bei 30 °C. Variationen dieser Methode erfolgten einerseits durch die Nutzung von Harnsäure-reduziertem Medium für die Konjugation mit 3 mM Harnsäure, als Erleichterung für den Donorstamm, und andererseits durch die Verwendung von sterilen Papierfiltern für den Konjugationsvorgang (Bertram et al, 1991; Strätz et al, 1994). Hierfür wurden Donor- und Akzeptorstamm nach dem Wachstum zentrifugiert, einmal mit dem jeweiligen Medium gewaschen, wieder pelletiert und in 50-100 µl entsprechendem Medium resuspendiert. Unter anaeroben Bedingungen wurde erst der Donorstamm in die Mitte des Filters

getropft und anschließend der Akzeptorstamm auf die gleiche Stelle darüber. Nach einer anaeroben Inkubation des Filters für 24 h bei 37 °C wurde der Filter in 5 ml Harnsäure-Medium mit Polymyxin B und Kanamycin zur Selektion überführt und bei 37 °C inkubiert. Alternativ wurde Tetracyclin statt Kanamycin als Selektionsmittel für positive Transkonjuganden verwendet.

2.9 Sequenzierung und Annotation des Genoms von *C. acidurici* 9a

Eine der Grundlagen dieser Arbeit stellte die Sequenzierung von *C. acidurici* 9a dar. Einerseits wurde sie für die Rohsequenzierung des Genoms in Form der 454 GS FLX Titanium Pyrosequenzierungstechnologie eingesetzt, andererseits zum Verifizieren von PCR-Produkten und Klonierungsexperimenten mittels der Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger et al, 1977; Sanger et al, 1992). Diese beiden Methoden wie auch der anschließende Lückenschluss und die Annotation des Genoms sollen im Folgenden nur kurz beschrieben werden.

2.9.1 454-Pyrosequenzierung

Die Rohsequenzierung des Genoms von *C. acidurici* 9a erfolgte mittels 454 GS FLX XLR Pyrosequenzierung (Margulies et al, 2005) mit dem „Genome Sequencer FLX“ (Fa. Roche, Mannheim). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Sequenzierung durch basenweise Strangsynthese durch die Detektion der Freisetzung von Pyrophosphat und Generierung von Photonen bei der Inkorporation von Nukleotiden (Margulies et al, 2005). Dabei wird einzelsträngige zu sequenzierende DNA mit Sequenzier-*primern* hybridisiert und mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase (chemilumineszent) und Apyrase und den Substraten Adenosin-5'-Phosphosulfat und Luziferin inkubiert. Nacheinander werden Lösungen mit je einem der vier dNTPs hinzugegeben, was den nächsten Schritt initiiert. Die DNA-Polymerase kann nur die richtigen komplementären dNTPs in den neu synthetisierten Strang einbauen, wobei Pyrophosphat in einem stöchiometrischen Verhältnis frei wird. In der Gegenwart von Adenosin-5'-Phosphosulfat wird das Pyrophosphat mit Hilfe der ATP-

Sulfurylase zu ATP konvertiert, welches wiederum die Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin durch das Enzym Luziferase antreibt. Diese Umsetzung zu Oxyluziferin generiert Lichtblitze proportional zu der Menge an gebildetem ATP. Uneingebaute Nukleotide und ATP werden durch die Apyrase abgebaut und die Reaktion kann mit einer anderen Nukleotidlösung wiederholt werden. Im Endeffekt erlaubt also die Sequenz der Nukleotidlösungen, die eine Chemilumineszenz auslösen die Detektion der Sequenz des *templates* (Ronaghi et al, 1998). Zur Sequenzierung des kompletten Genoms mussten 500 ng isolierte genomische DNA eingesetzt werden (siehe **2.3.1**). Sämtliche weitere Vorbereitungen der DNA zur Sequenzierung wurden freundlicherweise von Frauke Meyer, Stephanie Offschanka und Andrea Thürmer nach Protokollen des Herstellers (Fa. Roche, Mannheim) übernommen. Die Assemblierung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des „Newbler assembly tool v2.3“ von Roche (Mannheim). Die daraus resultierenden *contigs* wurden mit dem hauseigenen Skript „Fasta2exp.pl“ prozessiert. Dabei wurden sie in Partitionen von 5000 bp mit Überlappungen von 1500 bp unterteilt. Mit der Software Gap4 des Staden-*package* (Staden et al, 2000) wurden die *contigs* mit Hilfe dieser Überlappungen reassembliert. Gap4 wurde benutzt, um problemlos neue Sequenzen zum Lückenschluss hinzuladen und editieren zu können.

2.9.2 Sequenzanalyse nach (Sanger et al, 1977)

Diese Methode der Sequenzierung wurde ausschließlich zur Sequenzierung von PCR-Produkten zum Lückenschluss und zur Verifizierung von Klonierungen verwendet. Sie beruht auf einem Kettenabbruch durch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Sanger et al, 1992). Die ddNTPs werden anstelle eines unmarkierten dNTPs eingebaut und sorgen so dafür, dass der Strang nicht weiter verlängert werden kann. Daraus resultieren verschieden große Fragmente mit spezifischen Fluoreszenzmarkierungen, die von der Art des ddNTPs abhängen. Die Detektion dieser Fluoreszenz erfolgte mit dem Kapillarsequenzierer „3730XL DNA Analyzer“ (Fa. ABI Applied Biosystems, Foster City, USA).

2.9.3 Lückenschluss

Zur Orientierung der *contigs* nach der Assemblierung der Rohdaten in die richtige Reihenfolge wurde einerseits auf die Vektorette-PCR (siehe 2.5.2) und die Multiplex-PCR (siehe 2.5.3) andererseits zurückgegriffen. Zur Verifizierung und Bestimmung der Sequenz in der entsprechenden Lücke wurde eine Standard-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden an den zusammengehörenden Enden durchgeführt (siehe 2.5.1). Ergab sich ein eindeutiges PCR-Produkt, wurde dieses direkt aufgereinigt (siehe 2.4.6). Alternativ wurden die DNA-Banden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (siehe 2.4.7). Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert (siehe 2.9.2), wofür die gleichen Oligonukleotide eingesetzt wurden wie für die Amplifikation. Da die Länge der zu sequenzierenden DNA auf bis zu 1000 bp begrenzt war, wurden bei größeren PCR-Produkten an den jeweiligen Enden der vorangegangenen Sequenzierung neue Oligonukleotide erstellt und mit diesen auf dem gleichen PCR-Produkt erneut sequenziert, bis die Sequenz vollständig erhalten wurde (*primer walking*). Da hierfür eine sehr große Anzahl an Oligonukleotiden von Nöten war, wurde auf eine Auflistung dieser Oligonukleotide in der Arbeit verzichtet. Erhaltene Sequenzen wurden in die Genomsequenz-Datenbank in Gap4 geladen und konnten dort mit Überlappungen an die bereits vorhandene Sequenz angelagert werden, um so Lücken zwischen den *contigs* zu schließen. Eventuell vorhandene Sekundärstrukturen konnten durch Zugabe von DMSO oder Betain in die Sequenzierungsansätze aufgelöst werden. Waren innerhalb der Sequenz repetitive Bereiche vorhanden, war eine vollständige Sequenzierung mit dieser Methode nicht möglich und es musste eine Subklonierung in einen Vektor in einem sogenannten *shotgun approach* stattfinden. Dabei wurde das PCR-Produkt in einen Vektor kloniert (siehe 2.7) und dieser dann in Fragmente gesichert, die eine Größe zwischen 1 und 3 kb aufwiesen. Die Fragmente wurden dann wiederum mittels TOPO® TA-Klonierung (siehe 2.7.1) subkloniert. Das Ziel dieser Methode war die Ermöglichung einer gleichwahrscheinlichen Klonierung aller Abschnitte des DNA-Fragments ab, so dass später kein Bereich über- oder unterrepräsentiert war. Der Klonierungsansatz wurde in elektrokompente *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.8.1). Positive Klone wurden durch Antibiotika- und Blau-Weiß-Selektion ermittelt, die Plasmide mit Hilfe des BioRobot 8000 (siehe 2.3.2.1) präpariert und deren *inserts* mit den Oligonukleotiden ABIfor und ABIrev (A.I.,

Tab. 13) sequenziert. Sequenzen wurden in Gap4 geladen und mit Hilfe von Überlappungen, die durch die zufällige Verteilung der Fragmentbrüche während des Scherens entstanden sein sollten, assembliert und der Genomsequenz hinzugefügt.

2.9.4 Qualitätsverbesserung

Da viele Sequenzbereiche innerhalb der Lücken auch nach dem Lückenschluss noch nicht die notwendige Abdeckung und Sicherheit aufwiesen, wurden in diesen Bereichen weitere Sequenzierungen durchgeführt, um eine minimale Abdeckung von zwei Sequenzen und einen Qualitätswert von 45 zu erreichen.

Eine weitere wichtige Verbesserung der Qualität bestand in der Überprüfung einer eventuellen Verschiebung des offenen Leserahmens (ORF, *open reading frame*), also der Bereich der DNA, welcher zwischen einem Start- und einem Stopp-Codon liegt und potentiell für die Aminosäuresequenz eines Proteins kodiert. Die automatische ORF-Vorhersage und die anschließende manuelle Annotation brachten teilweise Gene hervor, die über mehrere ORFs verteilt lagen. Dieser Fehler war in den meisten Fällen auf eine Verschiebung des Leserahmens zurückzuführen, die durch eine Eigenheit der 454-Pyrosequenzierung entstanden war. Da die 454-Technologie auf der Stärke von Lichtblitzen beruht, konnten sogenannte Homopolymer-*stretche*, also die Aneinanderreihung von mehreren Basen desselben Typs, vom Gerät nicht ausreichend differenziert werden, so dass zum Teil 1-3 bp zu wenig oder zu viel detektiert wurden. In diesen Fällen wurden die entsprechenden Einzelsequenzen der Rohsequenzierung näher betrachtet und gegebenenfalls durch die Sequenzierung von PCR-Produkten über diese Bereiche korrigiert. Diese Korrektur fand allerdings nur innerhalb von ORFs statt, so dass in den Bereichen zwischen ORFs durchaus weitere Fehler dieser Art bestehen könnten. Bei Bereichen, wo kein Sequenzierfehler nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um eine natürliche Verschiebung des Leserahmens und somit um ein Pseudogen.

2.9.5 Annotation des Genoms

Sobald die Genomsequenz vollständig geschlossen war, wurde mit der Annotation begonnen. Hierzu gehörte die Identifikation aller potentiellen ORFs und der Zuweisung einer Funktion, falls möglich.

2.9.5.1 Vorhersage potentieller ORFs

Vorbereitend zur Annotation mussten zunächst alle potentiellen offenen Leserahmen identifiziert werden. Dazu wurde das Programm YACOP (Tech & Merkl, 2003) benutzt, welches eine Kombination aus den Programmen GLIMMER (Delcher et al, 1999), ZCurve (Guo et al, 2003) und CRITICA (Badger & Olsen, 1999) darstellt. tRNAs wurden mit Hilfe des Programms tRNAscan-SE (Lowe & Eddy, 1997) detektiert. Alle ORFs wurden manuell auf ihre korrekte Länge hin, d.h. der Start und Stopp, in dem Programm Artemis überprüft (Rutherford et al, 2000). Hierfür wurden verschiedene Kriterien berücksichtigt, wie das Vorhandensein einer Ribosomen-Bindestelle mit dem Sequenzmotiv AGGAGG bzw. leichter Variationen dieses Motivs unmittelbar vor dem Startcodon oder eine einheitliche *codon usage*, die in Artemis anhand eines *GC frame plots* visualisiert werden konnte.

2.9.5.2 Automatische Annotation

Die Aminosäuresequenzen der vorhergesagten ORFs wurden durch eine Analyse mittels BLAST® (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool, National Library of Medicine, Bethesda, USA) mit den aktuellsten Datenbanken von Swiss-Prot und TrEMBL (<http://www.uniprot.org/>) abgeglichen. Positive Treffer wurden automatisch als die wahrscheinliche Funktion angenommen, wobei ein Treffer in Swiss-Prot schwerer gewichtet wurde als in TrEMBL, da Swiss-Prot Datenbankeinträge manuell vor Annahme überprüft werden. Ein weiterer Vorteil der

Swiss-Prot Datenbank ist die Einteilung der Einträge nach Aussagekraft. Hierbei wird unterschieden in Einträge, die experimentell bestätigt wurden oder nur auf Homologien beruhen.

2.9.5.3 Manuelle Annotation




Die automatische Annotation wurde anschließend manuell überprüft und gegebenenfalls editiert. Hierfür wurde hauptsächlich das Programm ERGO (Fa. Integrated Genomics, Arlington Heights, USA) verwendet (Overbeek et al, 2003). Ebenfalls eingesetzt wurde das IMG/ER (*Integrated Microbial Genomes/Expert Review*) System (<http://img.jgi.doe.gov/>, (Markowitz et al, 2009)). In die Benutzeroberfläche dieser Programme waren externe Hilfsprogramme eingebunden, mit denen neben eines zusätzlichen Sequenzabgleiches mit den Swiss-Prot und TrEMBL Datenbanken mittels BLAST auch Domänenanalysen mit dem *web*-basierten Programm InterPro-Scan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>, (Zdobnov & Apweiler, 2001) durchgeführt werden konnten. Direkt in ERGO integriert waren automatische Vergleiche der Aminosäure- und Nukleotidsequenz mit Referenzorganismen der internen Genom-Datenbank, die zum Zeitpunkt der Annotation 491 Referenzorganismen beinhaltete, inklusive 42 Vertreter der Gattung *Clostridium*. So konnten auf Anhieb die besten Treffer zu homologen Genen aus anderen Organismen eingesehen werden. Eine weitere interne Funktion, die *contig regions*, beruhte auf Vergleichen zu Clustern und ähnlichen Genumgebungen der Referenzorganismen. Konnten keine vergleichbaren Sequenzen gefunden werden, wurden die Proteine als hypothetisch eingestuft. War die Ähnlichkeit zu anderen Proteinen nur schwach, bzw. die Funktion unsicher, wurde die jeweilige Funktion mit dem besten Treffer nur als wahrscheinlich angenommen.

2.10 Genomsequenz-Analysen

Für weitere Analysen des Genoms wurden verschiedene Programme verwendet. Zum Vergleich des Genoms von *C. acidurici* 9a mit Vergleichsorganismen auf Basis der Aminosäuresequenz fand das Programm BiBaG (*Bidirectional blast for identification of Bacterial pan and core Genomes*) Anwendung (Wollherr, 2010). Es dient dazu Orthologe in einem

Gesamtgenomvergleich zwischen je zwei Organismen durch einen bidirektionalen BLAST sowie globalen *alignments* auf Proteinebene zu identifizieren. Durch Ermittlung des besten Treffers in erster Instanz wird, wenn möglich, allen Proteinen ein Ortholog im Vergleichsorganismus zugeordnet. In zweiter Instanz wird dann überprüft, ob die identifizierten Orthologe mittels BLAST wieder auf das entsprechende Protein im Ausgangsorganismus zurückverweisen. In einem weiteren Analyseschritt werden anschließend diese bidirektionalen besten BLAST-Treffer mit Hilfe des Needleman-Wunsch-Algorithmus (Needleman & Wunsch, 1970) verglichen und so die globalen Sequenzähnlichkeiten bestimmt. Die Beurteilung des bidirektionalen BLAST-Treffers findet mit Hilfe des sogenannten *e-values* (*expected value*) statt. Dieser Parameter beschreibt die Anzahl der Treffer, die zufällig erwartet werden können, wenn man eine Datenbank bestimmter Größe durchsucht. Ein *e-value* von 1 bei einem zugewiesenen Treffer würde bedeuten, dass schlicht per Zufall in einer Datenbank dieser Größe ein weiterer Treffer mit einem ähnlichen *score* zu erwarten wäre. Je kleiner der *e-value*, also je dichter er an 0 ist, desto signifikanter ist der bidirektionale Treffer und desto wahrscheinlicher handelt es sich um ein Ortholog. Die Bewertung der Sequenzähnlichkeit basierend auf dem Needleman-Wunsch-Algorithmus erfolgte durch ein ähnliches Stufensystem wie beim *e-value* durch die Angabe der prozentualen Sequenzidentität. Die Gesamtbewertung erfolgte durch eine Kombination beider Systeme. Eine Übersicht dazu mit entsprechendem Farbcode des Needleman-Wunsch (NW) für spätere Abbildungen ist in **Tabelle 6** gegeben.

Tab. 6: Stufensystem zur Beurteilung eines Orthologs mit Hilfe des *e-values* und der Needleman-Wunsch-Prozentidentität.

<i>e-value</i>	Needleman-Wunsch-Identität	Farbcode (NW)
> e-20 und 1	0% - 20%	
< e-20 und > e-30	20% - 30%	
< e-30 und > e-90	30% - 50%	
< e-90 und > e-100	50% - 70%	
< e-100 und > e-120	70% - 90%	
< e-120 und 0	90% - 100%	

Zur Visualisierung der Daten wurde das Programm DNA-Plotter (Carver et al, 2009) benutzt und diente gleichzeitig der Ermittlung eventueller einzigartiger Gene bzw. Genregionen in *C. acidurici* 9a.

Sogenannte Fremdgene oder auch genomische Inseln (GIs, *genomic islands*), also Gene die im Laufe der Zeit wahrscheinlich von anderen Organismen durch verschiedene Arten von DNA-Transfer übernommen worden waren, wurden mit Hilfe von COLOMBO (Waack et al, 2006) und des *web*-basierten Programms IslandViewer (Langille & Brinkman, 2009) (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) identifiziert. Letzteres vereinte in sich die Programme SIGI-HMM (Hsiao et al, 2003), IslandPath-DIMOB (Langille et al, 2008) und IslandPick (Waack et al, 2006). Die ersten beiden Programme basieren auf dem Vergleich der unterschiedlichen Codon-Benutzung der verschiedenen Organismen, während das letzte Programm automatisch Genome phylogenetisch verwandter Organismen sucht und vergleicht, um so genomische Inseln vorhersagen zu können.

Die taxonomische Beziehung von *C. acidurici* 9a zu anderen Vertretern der *Clostridiaceae* wurde mit Hilfe des Programms ARB (Ludwig et al, 2004) ermittelt. Die Berechnungen erfolgten nach der *neighbour joining*-Methode und wurden unterstützend noch einmal mit der *maximum likelihood*-Methode wiederholt. Der Unterschied beider Methoden liegt darin, dass die *maximum likelihood*-Methode auf einem parametrischen Schätzverfahren beruht, für welches verschiedene Evolutionsmodelle in Form von Substitutionsmatrizen benötigt werden. Meist wird dabei die Wahrscheinlichkeit für Punktmutationen zwischen verschiedenen Nukleotiden anhand des vorhandenen Datensatzes geschätzt und optimiert (Tateno et al, 1994). Die *neighbour joining*-Methode benötigt dagegen Wissen über die Distanz zwischen zwei Paaren von Taxa, wie z.B. Arten oder Sequenzen. Sie basiert meist auf dem Kriterium der *minimum evolution*, was so viel heißt, dass paarweise die DNA-Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einem Ast des Baumes zusammengefügt werden. Dies geschieht immer wieder solange, bis alle Sequenzen einberechnet worden sind (Saitou & Nei, 1987).

Zur Ergänzung wurden an den Knotenpunkten die *bootstrap*-Werte in Prozent von 1000 Replikaten angegeben. Die *bootstrap*-Analyse gibt eine Möglichkeit der Bewertung, wie wahrscheinlich der Knotenpunkt in einem Baum an einer bestimmten Stelle ist (Knoop & Müller, 2006). Bei einem *bootstrap*-Wert von 100% war bei 1000 Berechnungen des gleichen Baumes mit verschiedenen Parametern dieser Knotenpunkt bei 100% der Bäume an der gleichen Stelle.

2.11 *real-time* qPCR

Die Methode der *real-time* qPCR oder auch quantitativen Echtzeit-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (siehe 2.5.1) ist aber zusätzlich in der Lage die amplifizierte DNA zu quantifizieren. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen des DNA-Farbstoffes „SYBR Green“, die während eines PCR-Zyklus am Ende der Elongation durchgeführt werden. Proportional zur Menge der PCR-Produkte nimmt dabei auch die Fluoreszenz zu. Die *real-time* qPCR wurde in dieser Arbeit für zwei Zwecke eingesetzt. Einerseits zur Bestimmung der Plasmid-Kopienanzahl, wo direkt mit DNA gearbeitet wurde und andererseits zur Bestimmung der Änderung von Transkriptionsstärken einzelner Genen zu unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellen und unter bestimmten Bedingungen unter Verwendung von cDNA. Beide sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.11.1 Standard *real-time* qPCR

Zellen von *C. acidurici* 9a wurden in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet. Da eine relative Quantifizierung stattfinden sollte, wurden interne Kontrollen benötigt, d.h. es wurden Kulturen geerntet, die einmal unter Standardbedingungen, also in einfachem 12 mM Harnsäuremedium gewachsen waren und einmal unter Bedingungen, die eine Änderung des Transkriptionsverhaltens der zu untersuchenden *cop*-Gene bewirken sollten, wie die Zugabe von CuCl_2 und ZnCl_2 ins Medium. Als konstitutiv transkribiertes Kontrollgen wurde das für die alpha-Untereinheit der RNA-Polymerase kodierende Gen *rpoA* gewählt. Nach der Ernte folgten die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen und anschließend das Umschreiben der mRNA in cDNA (siehe 2.4.9). Von der cDNA wurden wie folgt Verdünnungsstufen angelegt: unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:50, 1:125 und 1:250. Diese dienten als *template* und wurden mit dem „Absolute™ Blue qPCR SYBR® Green Rox Mix“ (Fa. Fisher Scientific, Schwerte) jeweils in vier Parallelen in *real-time* qPCR-Reaktionen eingesetzt.

***real-time* qPCR-Ansatz**

2x ABsolute™ Blue qPCR SYBR® Green Rox Mix	7,5 µl
Oligonukleotid 1	1,1 µl
Oligonukleotid 2	1,1 µl
cDNA	0,7 µl
H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 15 µl

Die Reaktionen wurden in opakweißen „ABgene™ 96-well PCR-Platten“ (Fa. Fisher Scientific, Schwerte) angesetzt und mit einer „ABsolute™ qPCR-Folie“ (Fa. Fisher Scientific, Schwerte) verschlossen. Für die *real-time* qPCR wurde ein iQ5 *real-time* PCR-Detektions-System (Fa. Bio-Rad, München) verwendet und folgendes Programm:

<i>real-time</i> qPCR-Programm:	15 min, 95 °C	Enzym-Aktivierung	
	40x {	15 sec, 95 °C	Denaturierung
		30 sec, 60 °C	<i>Annealing</i>
		30 sec, 72 °C	Extension
	10 min, 72 °C	Extension	

An dieses Programm wurde ein Dissoziations(Schmelz)-Schritt angeschlossen, um die spezifische Schmelztemperatur des Amplifikats und damit die Spezifität der Oligonukleotide zu ermitteln, damit zwischen spezifischen Produkten und unspezifischen *primer*-Dimeren unterschieden werden konnte. Dieser Schritt wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Dissoziation:	30 sec, 95 °C	Denaturierung
	30 sec, 60 °C	Start
	80x 10 sec, 60-95 °C (kontinuierliche Erhöhung)	Schmelzen

Die *threshold cycle values* (Ct) und Standardabweichungen (SA) wurden automatisch von der „iQ5 Optical System Software“ (Fa. Bio-Rad, Schwerte) generiert und für weitere Analysen in Excel (Fa. Microsoft, Redmond, USA) exportiert. Werte mit Standardabweichungen größer als 0,3 wurden in die weiteren Analysen nicht mit einbezogen. Zur Berechnung der PCR-

Amplifikations-Effizienz (E) der Oligonukleotide wurde der Anstieg der Regressionsgeraden bestimmt. Die Effizienz ließ sich anschließend mit Gleichung (1) berechnen. Gleichung (2) wurde danach nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001) zur Bestimmung der Änderungsrate der Transkriptionsstärke (R) herangezogen, da Unterschiede in der Amplifikations-Effizienz der Oligonukleotidpaare für die verschiedenen Gene angenommen wurden. E_{Zielgen} stellt dabei die Effizienz des Nukleotidpaares für das zu untersuchende Gen dar und E_{rpoA} die Effizienz des Nukleotidpaares für das Referenzgen *rpoA*. $\Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen(Standard-spez. Bedingung)}}$ beinhaltet die Differenz des Ct-Wertes für das Zielgens unter Standardbedingungen im Vergleich zu den spezifischen Bedingungen. Gleiches gilt für das Referenzgen.

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

$$E(\%) = (10^{(-1/\text{Steigung})} - 1) \times 100$$

$$(2) \quad R = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen(Standard-spez. Bedingung)}}} / (E_{rpoA})^{\Delta\text{Ct}_{rpoA(Standard-spez. Bedingung)}}$$

Die ideale PCR-Effizienz, also die absolute Steigung der Standard-Kurve, lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Absolute Steigung} = 1/\log_{10}2 = 3,332.$$

Das bedeutet, dass für eine zehnfache Differenz in der Konzentration an *template* idealerweise ein Ct-Wert von 3,332 erwartet werden kann. Die Berechnung von R wurde für jede Probe und Verdünnungsstufe berechnet und daraus der Durchschnitt und die Standardabweichung gebildet.

2.11.2 Bestimmung der Plasmid-Kopienanzahl (*plasmid copy number* - PCN)

Die PCN wurde nach einer modifizierten Methode von Škulj et al. (Škulj et al, 2008) bestimmt. Zellen von *C. acidurici* 9a wurden nach 5 h Wachstum in der exponentiellen Phase geerntet und zunächst bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurde die Gesamt-DNA wie in **2.3.1** beschrieben isoliert. Es wurden Oligonukleotide erstellt, die spezifisch innerhalb der Genregionen binden, die für das Plasmid-Replikationsprotein RepB (Curi_2p00010) kodieren (cau831/cau832) und für das chromosomale DNA-Replikations-Protein DnaA (Curi_c00010)

(cau825/cau826, **A.I., Tab. 13**). Da jedes der Gene nur einmal vorkommt im Genom, sollte man sie dementsprechend zueinander ins Verhältnis setzen und so die Kopienzahl des Plasmids bestimmen können.

Die Verdünnungsstufen und *real-time* qPCR-Reaktionen wurden wie bereits in **2.11.1** beschrieben angesetzt, mit dem einzigen Unterschied, dass statt cDNA die direkt isolierte Gesamt-DNA verwendet wurde.

Die Berechnung der PCN erfolgte ebenfalls nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001) mit der Gleichung (3). E_{chrom} entsprach dabei der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *dnaA* und E_{plasm} der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *repB*.

$$(3) \quad \text{PCN} = (E_{\text{chrom}})^{Ct(\text{chrom})} / (E_{\text{plasm}})^{Ct(\text{plasm})}$$

Die PCN wurde für jede Probe und Verdünnungsstufe berechnet und daraus der Durchschnitt und die Standardabweichung gebildet.

2.12 Bestimmung der Toleranz gegenüber Metallen

Zur Bestimmung der Toleranz von *C. acidurici* 9a gegenüber verschiedenen Metallen wurden wässrige Stammlösungen von 100 mM CuCl_2 und ZnCl_2 hergestellt und sterilfiltriert. Sie wurden anaerob sterilem Harnsäure-Medium in Konzentrationen von 2-12 mM für CuCl_2 und 2-28 mM für ZnCl_2 zugegeben. Inokuliert wurde jeweils 10%ig und die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Das Zellwachstum wurde photometrisch über die optische Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) alle 2 h bestimmt bis die stationäre Phase erreicht war. Aus den Daten wurde eine halblogarithmische Auftragung der $\text{OD}_{600\text{nm}}$ gegen die Zeit vorgenommen. Als Positivkontrolle diente inokuliertes Harnsäure-Medium ohne Metalle.

2.13 Geräte und Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Serva (Heidelberg), Gibco (Eggenstein), Gerbu (Gaiberg), Oxoid (Hampshire, UK), Roche (Mannheim) und Difco (Detroit, USA) bezogen. Außerdem fanden Chemikalien bzw. Enzyme folgender Firmen Anwendung:

MBI Fermentas (St. Leon Rot)	Restriktionsenzyme/Enzyme, dNTPs
New England Biolabs (Frankfurt/Main)	Restriktionsenzyme
Biozym (Hessisch Oldendorf)	Agarose
Messer Griesheim (Kassel)	Stickstoff (4.0) (99,99%)
	Inertal 20 (20% CO ₂ , 80% N ₂)
	Wasserstoff (3.0) (99,9%)

Neben den bereits im Text erwähnten Geräten wurden noch andere Geräte folgender Hersteller verwendet:

Gilson (Middleton, USA)	Mechanische Pipetten Pipetman Classic™
Eppendorf (Hamburg)	Elektrische 8-Kanal-Pipetten Research® pro Mechanische 8-Kanal-Pipetten Research® Dispenser Multipette® plus
Sartorius (Göttingen)	Waage BP 3100 S, Feinwaage MC 410 S
Scientific Industries (New York, USA)	Vortex-Genie™ 2
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 21 Tischzentrifuge Heraeus Pico 21 Zentrifuge MEGAFUGE 1.0 Zentrifuge MULTIFUGE 3 S-R
Beckman Coulter (Krefeld)	Zentrifuge Allegra™ X-12R
GFL (Wedel)	Wasserbad Typ1012
WTW (Weilheim)	pH-Meter pH 526 MultiCal ®

IKA Labortechnik (Staufen)

Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)

INFORS HT (Basel, Schweiz)

BIO-TEK Instruments (Bad Friedrichshall)

Magnetrührer RCT basic

Elektrophorese-Spannungsquelle EPS 300

Rundschüttel-Inkubator Multitron 2

Mikroplatten-Spektralphotometer

PowerWave® X Select

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Die Sequenzierung des Genoms von *C. acidurici* 9a

Die letzten 10 Jahre entwickelte sich die Genomsequenzierung zu einem Standardwerkzeug in der Molekularbiologie. Die Technologien wurden immer weiter entwickelt und die Zahl der sequenzierten Organismen stieg exponentiell an. Allein in der Datenbank von GOLD (*Genomes Online Database*, <http://www.genomesonline.org/>) befinden sich momentan 5764 abgeschlossene Genomprojekte, wovon 4807 den Prokaryoten zuzuordnen sind und 957 den Eukaryoten (Stand: 16.10.2012). Über 12.000 Projekte sind noch im Sequenzierungsprozess oder zumindest schon zur Sequenzierung vorgemerkt. Das rege Interesse an dieser Technologie liegt vor allem darin begründet, dass sie nicht nur eine gute Methode zur Bestätigung bereits vorhandener Experimente und Hypothesen darstellt, sondern auch relativ schnell zu vollkommen neuen Erkenntnissen führen kann.

Da bisher noch kein Vertreter der Gattung *Clostridium* sequenziert worden war, der in der Lage ist Purine als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu nutzen und *C. acidurici* in vielen Publikationen als Modellorganismus für damit in Zusammenhang stehende Stoffwechselfvorgänge diente (Barker & Beck, 1941; Barker & Beck, 1942; Gariboldi & Drake, 1984; Rakosky & Beck, 1955), sollte der Typstamm *C. acidurici* 9a im Rahmen dieser Arbeit als erstes purinolytisches *Clostridium* sequenziert und annotiert werden.

3.1.1 Sequenzierung, Lückenschluss und Annotation

Der Typstamm *C. acidurici* 9a wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Leibniz-Institut DSMZ) bezogen und in Harnsäure-Medium (Dürre, 1981) unter strikt anaeroben Bedingungen angezogen (siehe 2.2.2 und 2.2.4). Die Zellen wurden nach 5 h Wachstum in der späten exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0,4 geerntet.

Anschließend erfolgte die Isolierung der genomischen DNA (siehe **2.3.1**). Die Sequenzierung (siehe **2.9.1**) lieferte schließlich Rohdaten bestehend aus 212.878 Einzelsequenzen (*single reads*) mit einer durchschnittlichen Länge von 328 bp. Die *single reads* wurden mit Hilfe des Newbler Assembler assembliert, was in 53 *contigs*, also Sequenzstücke aus überlappenden *single reads*, mit Größen über 500 bp und einer Durchschnittsgröße von 57.938 bp resultierte. Die Gesamtgröße dieser *contigs* betrug 3.070.739 bp. Es wurde eine durchschnittliche Abdeckung des Genoms von 22,9 pro Base erreicht.

Die Orientierung zu sogenannten *scaffolds*, also Abschnitten der Genomsequenz bestehend aus *contigs* und Lücken, deren Anordnung im Genom rekonstruiert werden konnte, erfolgte hauptsächlich durch Vektorette-PCR (Riley et al, 1990) (siehe **2.5.2**). Mit dieser Methode wurden meist Produkte von etwa 500-3.000 bp erhalten. Die amplifizierten Bereiche wurden aufgereinigt und sequenziert und die Sequenzen der Genom-Datenbank hinzugefügt. Mittels Vergleich der neu generierten Sequenz mit den bereits vorhandenen, konnten benachbarte *contigs* identifiziert werden. Die so ermittelte Reihenfolge wurde durch eine PCR-Reaktion überprüft. Insgesamt konnten mit dieser Methode 35 der 53 Lücken geschlossen werden.

Mit einer weiteren PCR-basierten Methode, der Multiplex-PCR, konnte auch die Reihenfolge der verbliebenen *contigs* bestimmt werden (siehe **2.5.3**). Bei schwierigen Sequenzstücken wie *repeats* (repetitive Bereiche, deren Sequenz mehrmals im Genom vorkommt) konnte kein *primer walking* angewendet werden, um die Lücken zu schließen. Daher mussten die PCR-Produkte kloniert und anschließend *shotgun*-Genbanken erstellt werden (siehe **2.9.3**). Durch eine zufällige Fragmentierung des amplifizierten Sequenzbereiches und der anschließenden Klonierung in Vektoren konnten diese Bereiche so mit sich überlappenden Einzelfragmenten abgedeckt werden, so dass sich die Sequenz trotz repetitiver Motive vollständig anhand dieser Überlappungen rekonstruieren ließ.

Nachdem das Genom von *C. acidurici* 9a vollständig geschlossen war sollte es annotiert werden, d.h. die Protein-kodierenden Bereiche sollten bestimmt und soweit möglich eine Funktion zugeordnet werden. Dazu erfolgte zunächst eine Vorhersage der Lage der ORFs mit Hilfe des Programms YACOP (Tech & Merkl, 2003). Durch eine automatische Annotation sollte diesen ORFs eine mögliche Funktion zugewiesen werden, was durch eine BLAST-Analyse mit den aktuellsten Datenbanken von Swiss-Prot und TrEMBL geschah (siehe 2.9.5.2). Konnte ein positiver Treffer dabei erzielt werden, wurde dieser vorläufig als wahr übernommen und die Funktion auf das Ortholog in *C. acidurici* 9a übertragen. Swiss-Prot-Treffer wurden dabei höher

gewichtet als welche aus TrEMBL, da die Einträge der Swiss-Prot Datenbank manuell überprüft werden und dort eine Einteilung in experimentell bestätigte Einträge stattfindet, und solche, die auf reinen Sequenzhomologien basieren. Die manuelle Überprüfung der automatischen Annotation erfolgte mit dem Programm ERGO (Overbeek et al, 2003) und dem *web*-basierten IMG/ER-System (Markowitz et al, 2009). Die vollständig annotierte Genomsequenz ist bei NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit der BioProject ID 79221 und dem *locus tag*-Präfix „Curi“ hinterlegt. Das Chromosom erhielt die Zugangsnummer CP003326 und das Plasmid die Nummer CP003327.

3.1.2 Allgemeine Eigenschaften des Genoms

Das Genom von *C. acidurici* 9a besteht aus einem Chromosom mit einer Größe von 3.105.335 bp und einem Plasmid mit einer Größe von 2.913 bp. Eine Übersicht der allgemeinen Eigenschaften des Genoms im Vergleich zu anderen Vertretern der Familie der *Clostridiaceae* ist in **Tabelle 7** gegeben. Die vier weiteren Vertreter wurden nach ihrer relativen Verwandtschaft zu *C. acidurici* 9a anhand von 16S rRNA-Gen-Sequenzen (siehe 3.1.3.1) und der Verfügbarkeit einer vollständigen Genomsequenz ausgewählt. Alle Genome sind öffentlich bei NCBI zugänglich. Insgesamt gesehen, fügt sich das Genom von *C. acidurici* 9a mit einem G+C-Gehalt von 30% gut in die Gruppe der Clostridien ein. Es gehört mit zu den kleineren Vertretern besitzt aber trotzdem verhältnismäßig weniger DNA-kodierende Basen. Die restlichen 17% an Basen bildet nicht-kodierende DNA, welche also nicht für Proteine kodiert. Sie setzt sich zusammen aus Sequenzen, die für rRNAs und tRNAs kodieren, repetitiven Sequenzen wie z.B. CRISPR-Regionen, funktionellen Einheiten wie *riboswitche* oder Pseudogenen, Kopien von Genen, die nicht mehr als Vorlage für funktionale Proteine dienen können. *C. acidurici* 9a besitzt 17 solcher Pseudogene, in etwa vergleichbar mit einer Anzahl von 13 in *C. ljungdahlii* (**Tab. 7**). *A. oremlandii* weist dagegen mit 39 eine größere Anzahl auf. In der IMG/ER-Datenbank sind von den 44 komplett geschlossenen Genomen der Gattung *Clostridium* nur für 19 die Anzahl der Pseudogene aufgeführt (Stand: 16.10.2012). Die Spannweite reicht von einem Pseudogen wie bei *C. phytofermentans* ISDg bis zu 239 in *C. clariflavum* DSM 19732. Neben sechs rRNA-kodierenden Clustern, bestehend aus den Genen für 5S-, 16S- und 23S-rRNA beherbergt die Genomsequenz von *C. acidurici* 9a noch zwei weitere alleinstehende Gene für die 5S-rRNA-

Untereinheiten. Von den vier Vergleichsorganismen (**Tab. 7**) wies nur *A. oremlandii* ebenfalls weitere Kopien des 5S-rRNA-Gens auf. In der IMG-Datenbank konnten für 5 weitere der 44 vollständig sequenzierten Vertreter der Gattung *Clostridium* eine erhöhte Anzahl an 5S-rRNA-Genen im Vergleich zu den 16S- und 23S-rRNA-Genen festgestellt werden (Stand 16.10.2012). Mehr als zwei weitere Kopien dieses Gens traten dabei jedoch nicht auf.

Tab. 7: Übersicht der allgemeinen Eigenschaften des Genoms von *C. acidurici* 9a im Vergleich zu verschiedenen Vertretern der Clostridiaceae.












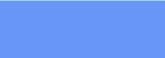

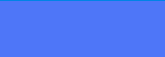
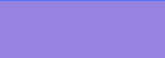




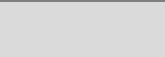
Eigenschaften	<i>C. acidurici</i> 9a ¹	<i>A. oremlandii</i> OhILAs ²	<i>C. sticklandii</i> DSM 519 ³	<i>C. difficile</i> 630 ⁴	<i>C. ljungdahlii</i> DSM 13528 ⁵
Länge [bp]	3.108.248	3.123.558	2.715.461	4.298.133	4.630.065
GC-Gehalt [%]	29,9	36,3	33,3	29,1	31,1
Kodierende DNA Basen [%]	83	85,8	90,1	84,1	85,3
Gene gesamt	2.962	2.951	2.688	3.983	4.283
Protein-kodierende Gene [%]	96,5	96,1	95,7	94,8	97,7
Pseudogene	17	39	-	24	13
rRNA-Operons	6	8	6	11	9
tRNAs	81	86	59	87	72

Zugangsnummern: ¹ CP003326, ² CP000853, ³ FP565809, ⁴ AM180355, ⁵ CP001666

Mit Hilfe des IMG/ER-Systems wurden soweit möglich alle in *C. acidurici* 9a identifizierten chromosomalen Gene in COG-Kategorien (*Cluster of Orthologous Groups*) eingeordnet. 23,7% der Gene konnten nicht in Kategorien eingeteilt werden. Die anteilige Kategorisierung der restlichen Gene ist in **Tabelle 8** aufgeführt. Eine Übersicht aller Gene auf dem Leit- und Folgestrang ist mit Farbcode den COG-Kategorien entsprechend in **Abbildung 3** dargestellt (Chromosom, Ring 1 und 2). Viele der Gene von *C. acidurici* 9a sind der Transkription, dem Aminosäuretransport und -metabolismus und Signaltransduktionsmechanismen zuzuordnen. Weitere Vergleiche zu anderen Clostridien offenbarte eine deutliche Unterrepräsentation von Genen in *C. acidurici* 9a, die für Proteine, involviert in Kohlenhydrattransport und -metabolismus, kodieren. Während in *C. acidurici* 9a 3,1% der Gene für Proteine dieser Kategorie kodieren, sind es in den anderen Organismen durchschnittlich 7,4%. Die anteilige Verteilung der Gene in die übrigen Kategorien fällt vergleichbar zu den anderen Organismen aus. Für diese Untersuchungen wurden 20 Clostridien ausgewählt, die einerseits unterschiedlichste Substrate

und Lebensstile aufwiesen, deren Gene sich aber andererseits wie auch bei *C. acidurici* 9a zu etwa 70-80% in COG-Kategorien einteilen ließen, damit sie untereinander vergleichbar waren und nicht etwa eine künstliche Unter- oder Überrepräsentation geschaffen wurde. Eine vollständige Übersicht der COG-Einteilungen aller berücksichtigten Organismen ist im Anhang zu finden (A.II., Tab. 14).

Tab. 8: Einteilung der chromosomalen Gene von *C. acidurici* 9a in COG-Kategorien

Name der Kategorie (Buchstabencode)	Anteil [%]	Farbcode (Abb. 3)
Translation, ribosomale Struktur und Biogenese (J)	6,5	
Transkription (K)	8,3	
Replikation, Rekombination und Reparatur (L)	5,3	
Zellzykluskontrolle, Zellteilung und Chromosompartitionierung (D)	1,3	
Verteidigungsmechanismen (V)	2,9	
Signaltransduktionsmechanismen (T)	8,1	
Zellwand-, Zellmembran- und Zellhüllbiogenese (M)	4,5	
Zellbeweglichkeit (N)	3,4	
Intrazellulärer Verkehr, Sekretion und vesikulärer Transport (U)	2,1	
Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz und Chaperone (O)	3,2	
Energieproduktion und -konservierung (C)	4,7	
Kohlenhydrattransport und -metabolismus (G)	3,1	
Aminosäuretransport und -metabolismus (E)	8,4	
Nukleotidtransport und -metabolismus (F)	2,6	
Coenzymtransport und -metabolismus (H)	5,4	
Lipidtransport und -metabolismus (I)	1,9	
Inorganischer Ionentransport und -metabolismus (P)	6,9	
Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus (Q)	1,0	
Nur generelle Funktionsvorhersage (R)	10,3	
Funktion unbekannt (S)	9,5	

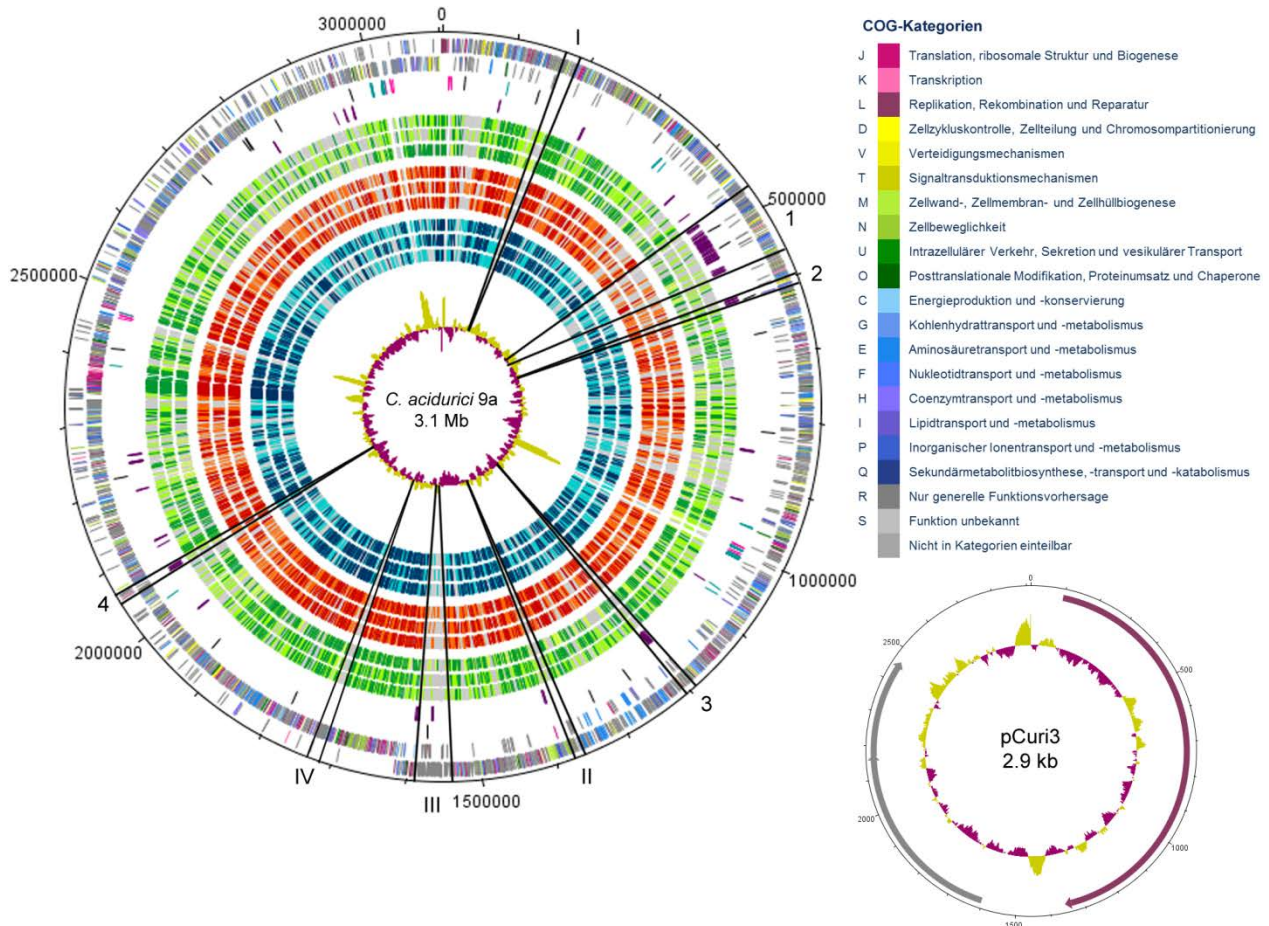


Abb. 3: Zirkuläre Darstellung des Chromosoms und des Plasmids von *C. acidurici* 9a.

Ringe auf dem Chromosom von außen nach innen: **1,2:** Leit- und Folgestrang mit allen identifizierten ORFs und deren farbige Einteilung in COG-Kategorien (Legende inklusive Farb- und Buchstabencode); **3:** rRNA-Kluster (pink), tRNAs (türkis) und Transposasen (schwarz); **4:** vorhergesagte Fremdgene (violett); **5-13:** Orthologe verschiedener anderer Organismen in Bezug auf *C. acidurici* 9a, vorhergesagt durch ein globales Alignment (siehe **2.10**). Zum Vergleich verwendete Organismen wurden in drei Kategorien eingeteilt: Spezialisten, die ungewöhnliche oder spezielle Substrate verwenden (Grüntöne), Lösungsmittelproduzenten, bzw. hauptsächlich saccharolytische Clostridien (Rottöne) und Pathogene, bzw. hauptsächlich proteolytische Clostridien (Blautöne). Je dunkler die Farbe, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass es sich tatsächlich um ein Ortholog an dieser Stelle handelt (siehe **2.10**), wobei grau anzeigt, dass in dem jeweiligen Organismus kein Ortholog vorhanden ist. Referenzorganismen von außen nach innen: *Clostridium sticklandii* DSM 519, *Clostridium kluveri* DSM 555, *Alkaliphilus oremlandii* OhiLas, *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, *Clostridium difficile* 630, *Clostridium botulinum* A ATCC 19397 und *Clostridium tetani* E88; **14:** G+C-Gehalt innerhalb des Chromosoms oberhalb des Durchschnitts (oliv) und unterhalb des Durchschnitts (magenta). Mit dem Programmen *IslandViewer* und *COLOMBO* vorhergesagte genomische Inseln (arabische Zahlen) und durch *BiBaG* identifizierte einzigartige Regionen (römische Zahlen) sind durch schwarze Striche voneinander getrennt. Ringe von außen nach innen auf dem Plasmid: 1: identifizierte ORFs und deren farbliche Einteilung in COG-Kategorien; 2: G+C-Gehalt innerhalb des Plasmids oberhalb der Durchschnitts (oliv) und unterhalb des Durchschnitts (magenta).

3.1.3 Vergleichende Analysen zu anderen Vertretern der Clostridien

3.1.3.1 Phylogenetische Analysen

Durch phylogenetische Analysen und der Erstellung von Stammbäumen sollte die verwandtschaftliche Beziehung von *C. acidurici* 9a zu weiteren Vertretern der Gattung *Clostridium* und anderen ähnlichen Organismen wie *Alkaliphilus oremlandii* OhILAs und *Acetobacterium woodii* DSM 1030 herausgestellt werden.

Hierzu wurden für die Berechnung des Baumes die 16S-rRNA-Gen-Sequenzen von 34 *Clostridiaceae* hinzugezogen (**Abb. 4**). Dabei handelte es sich ausschließlich um Typstämme, deren Genome zum Teil bereits vollständig sequenziert sind, größtenteils jedoch nur die 16S-rRNA-Gene. Bei einer 16S-rRNA-Gen-Analyse werden die Nukleotidsequenzen des Gens für die 16S-rRNA aller Organismen miteinander verglichen, da dieses in allen Bakterien konserviert ist und man davon ausgeht, dass es in allen Organismen mit der gleichen Geschwindigkeit evolviert und somit nicht nur die Geschichte des einzelnen Gens, sondern des ganzen Organismus widerspiegelt (Knoop & Müller, 2006). Allen 16S-Molekülen sind hochkonservierte Bereiche gemein, die für die Funktion der Ribosomen essentiell sind und dementsprechend keiner oder kaum einer Veränderung unterliegen. Die hoch variablen Bereiche des Moleküls stellen daher die Orte dar, anhand derer die Evolution eines Organismus und seiner verwandtschaftlichen Verhältnisse untersucht wird.

Um die Wurzel des Baumes zu bestimmen wurden die drei Archaeen-Stämme *Methanosarcina acetivorans* DSM 3824, *M. mazei* DSM 2053 und *M. barkeri* DSM 800 verwendet. Allerdings wurden sie der Abbildung nicht hinzugefügt, da sie nur für die Berechnung benötigt wurden. Soweit dies möglich war, wurden benachbarte Organismen in Gruppen (Cluster) nach Collins et al. (Collins et al, 1994) eingeteilt.

Als nächster direkter Verwandter zu *C. acidurici* 9a konnte hier das ebenfalls purinolytische *Clostridium C. purinilyticum* DSM 1384 identifiziert werden, welches direkt mit diesem zusammen clustert (**Abb. 4**). Beide Organismen sind dem Cluster XII zugeordnet (Collins et al, 1994). Daneben zeigte das Cluster XI bestehend aus *E. acidaminophilum* DSM 3953, *A. oremlandii* OhILAs, *C. sticklandii* DSM 519, *C. ghonii* JCM 1400 und *C. difficile* ATCC 9689

die meisten Ähnlichkeiten. Das dritte bekannte purinolytische *Clostridium*, *C. cylindrosporum* DSM 605, clustert dagegen nicht in derselben Gruppe, sondern an der Peripherie von Cluster I und scheint einen gemeinsamen Vorfahren mit den Organismen dieser Gruppe zu besitzen anstatt mit den Organismen der Cluster XI und XII.

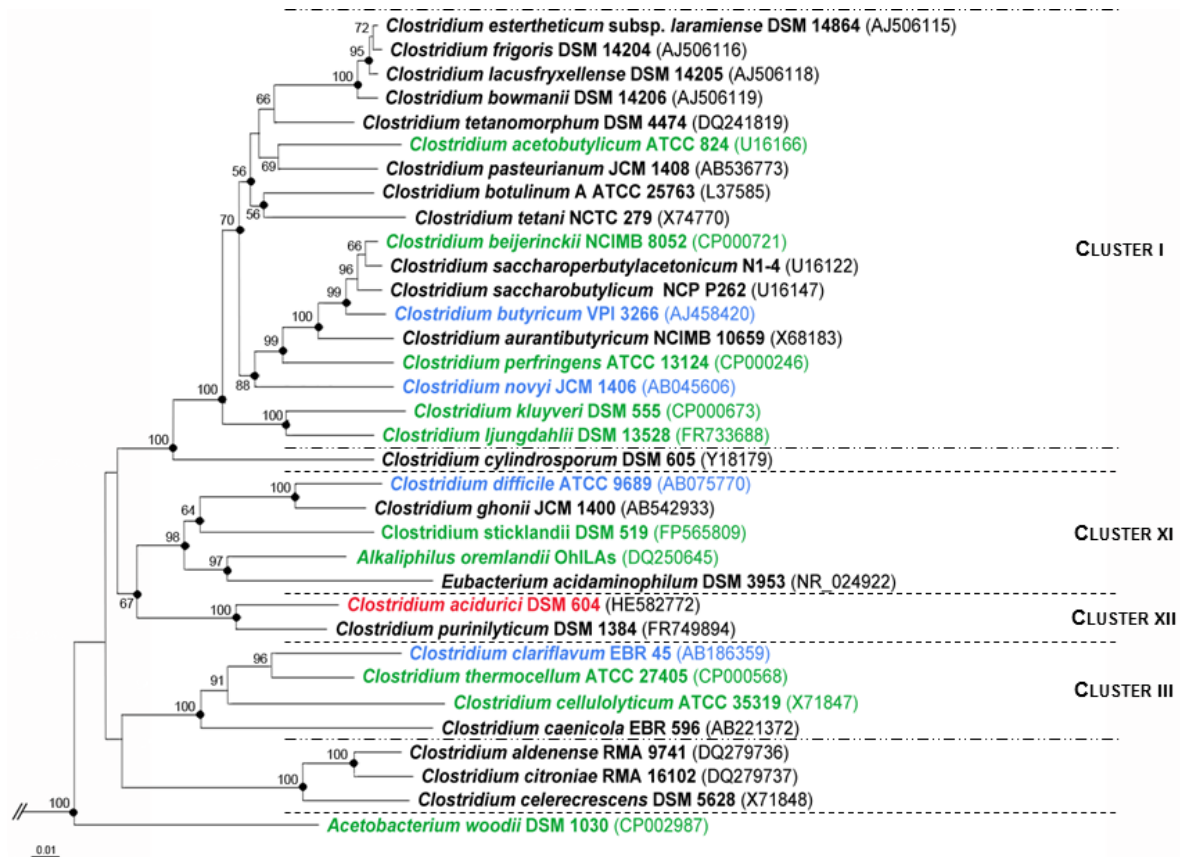


Abb. 4: Taxonomische Beziehung von *C. acidurici* 9a zu sowohl sequenzierten als auch nicht sequenzierten Typstämmen der *Clostridiaceae*.

Für die Berechnung des 16S rRNA-Gen-basierten Baumes wurden ausschließlich öffentlich zugängliche Typstämmen verwendet. Die Zugangsnummern sind in Klammern hinter dem jeweiligen Stamm angegeben. Die Kalkulation wurde mit Hilfe des Programmes ARB (Ludwig et al, 2004) mit der Neighbour-Joining-Methode durchgeführt. Knotenpunkte, die mit der Maximum-Likelihood-Methode reproduziert werden konnten, sind mit schwarzen Kreisen markiert. Die Zahlen an den Knotenpunkten stellen die Bootstrap-Werte in Prozent von 1000 Replikaten dar, wobei Werte <50% nicht aufgeführt sind. Die Länge des Balkens repräsentieren 0,01 Substitutionen pro Nukleotidposition. *C. acidurici* 9a ist in rot markiert, sequenzierte Stämme in grün und Stämme, die zwar nicht sequenziert sind, dafür aber ein anderer Stamm dieser Spezies, in blau. Die drei Archaeen-Stämme *M. acetivorans* DSM 3824, *M. mazei* DSM 2053 und *M. barkeri* DSM 800 wurden als Außengruppe zur Bestimmung der Wurzel des Baumes verwendet (nicht gezeigt). Gestrichelte Linien stellen definitive Grenzen zur nächsten Gruppe dar, Linien mit Strichen und Punkten solche, wo eine klare Abgrenzung nicht möglich bzw. nicht eindeutig war.

Der Nachteil der Berechnung auf 16S-rRNA-Gen-Ebene liegt darin, dass viele Spezies, vor allem innerhalb derselben Gattung nahezu identische 16S-rRNA-Gen-Sequenzen aufweisen und dadurch die Auflösung zum Teil nicht genau genug erfolgt (Martens et al, 2008). Im Zeitalter der Sequenzierung bietet die MLSA-Methode (*multilocus sequence analysis*) eine gute und genaue Alternative. Sie umgeht das Problem der sehr ähnlichen 16S-rRNA-Gen-Sequenzen, indem mehrere Gene, die in allen untersuchten Organismen in einfacher Kopie vorkommen verwendet und deren Aminosäure- oder auch Nukleotid-Sequenzen analysiert werden. Je mehr Proteine in die Berechnung einfließen, desto besser lässt sich das phylogenetische Verhältnis bestimmen (Martens et al, 2008). Für *C. acidurici* 9a und die Gattung *Clostridium* sollte daher ein Stammbaum nach der MLSA-Methode berechnet werden und einem 16S-rRNA-Gen-basierten Baum mit den gleichen Vertretern gegenüber gestellt werden. Für beide Methoden mussten zunächst die Organismen ausgewählt werden. Dafür wurden alle in der NCBI *reference sequence* (RefSeq)-Datenbank verfügbaren Genome aus dem Genus *Clostridium*, sowie die Genome von *A. oremlandii* OhILAs und *A. woodii* DSM 1030 hinzugezogen, wobei diejenigen ausgeschlossen wurden, welche mehr als 150 *contigs* aufwiesen. Diese Auswahl wurde getroffen, da bei einer zu großen Anzahl an *contigs* zu viele Gene in den entsprechenden Lücken unberücksichtigt bleiben würden. Da darin jedoch viele Vertreter der gleichen Spezies vorhanden waren, wurden hier jeweils nur 1-3 pro Spezies ausgewählt. Ein weiteres Kriterium bestand darin, dass zu jedem Organismus eine 16S-rRNA-Gen-Sequenz vorhanden war, um den MLSA-Baum mit dem 16S-rRNA-Gen-Baum vergleichen zu können, was bei einigen Organismen durch den Status eines *draft*-Genoms nicht gegeben war. Im Endeffekt flossen die Daten von 44 Organismen in die Analyse mit ein (siehe **A.III., Tab. 15**, grün markierte Organismen). Für die Berechnung nach der MLSA-Methode wurden alle Gene des *core*-Genoms (siehe 3.1.3.2) gegen alle Gene der verwendeten Organismen geblastet, um ihr Vorhandensein als einfache Kopie zu bestätigen und gegebenenfalls Gene auszusortieren, falls zu hohe Ähnlichkeiten zu einem anderen Protein bestanden. Der BLAST wurde mit dem Suchkriterium eines Treffers mit einem *e-value* kleiner als e^{-30} durchgeführt. 90 der 195 *core*-Gene blieben nach der Analyse bestehen und flossen in den MLSA-Stammbaum mit ein. Die Berechnung beider Stammbäume erfolgte mit Hilfe des Programms ARB (Ludwig et al, 2004) (<http://www.arb-home.de>) mit der *neighbour joining*-Methode. Die resultierenden Stammbäume sind in den **Abbildungen 5** (16S rRNA-Gen) und **6** (MLSA) dargestellt. Knotenpunkte, die mit einem schwarzen Kreis versehen sind, konnten auch mit der robusteren *maximum likelihood*-Methode reproduziert werden (siehe **2.10**).

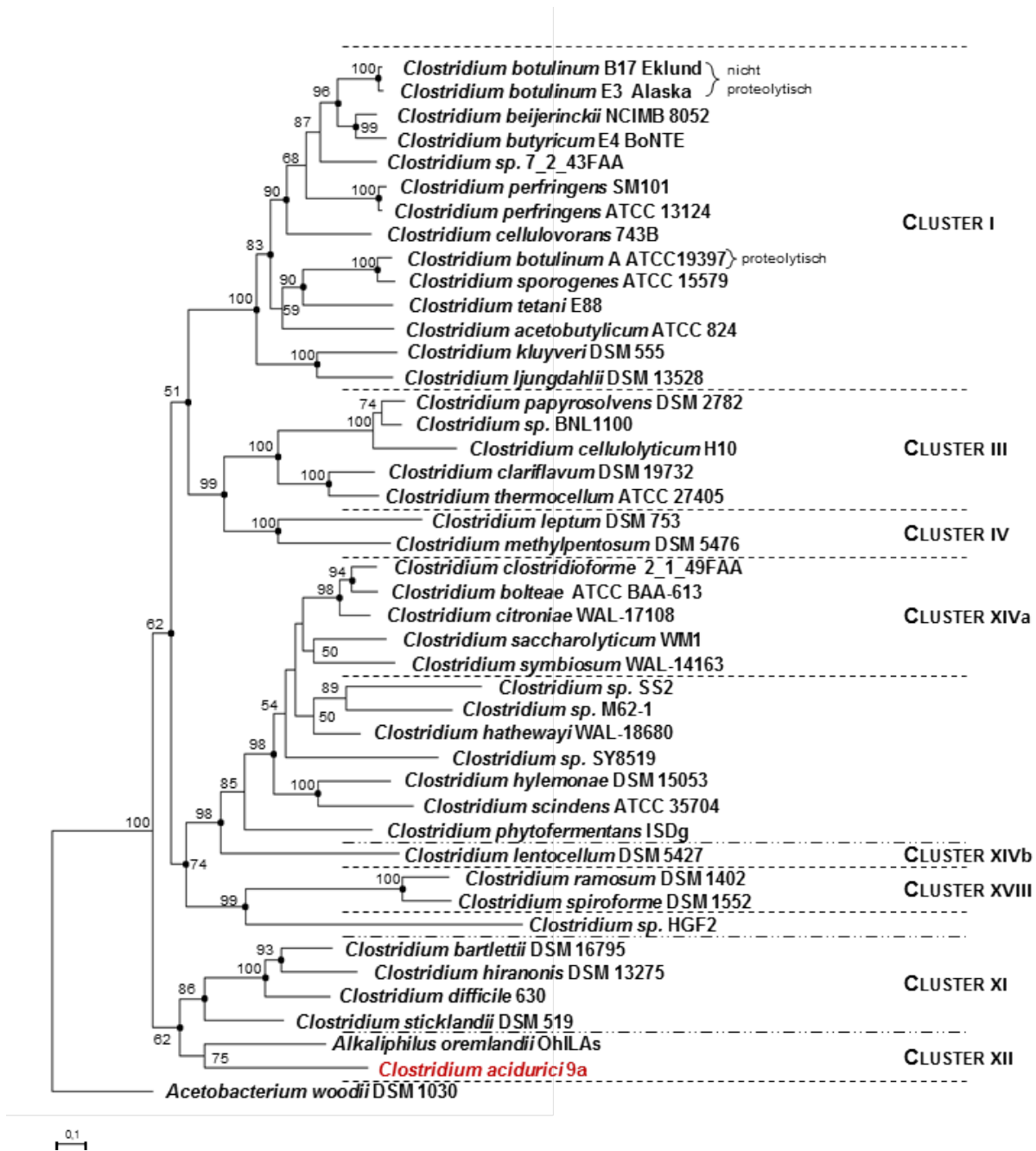


Abb. 5: 16S-rRNA-Gen-basierte taxonomische Beziehung von *C. acidurici* 9a zu anderen *Clostridiaceae*.

Es flossen die 16S rRNA-Gen-Nukleotid-Sequenzen von 44 Organismen in die Berechnungen mit ein. Die Zugangsnummern der verwendeten Organismen sind im Anhang zu finden (A.III., Tab. 15). Die Kalkulation wurde mit Hilfe des Programmes ARB (Ludwig et al, 2004) mit der Neighbour-Joining-Methode durchgeführt. Knotenpunkte, die mit der Maximum-Likelihood-Methode reproduziert werden konnten, sind mit schwarzen Kreisen markiert. Die Zahlen an den Knotenpunkten stellen die *bootstrap*-Werte in Prozent von 1000 Replikaten dar, wobei Werte <50% nicht aufgeführt sind. Die Länge des Balkens repräsentieren 0,1 Substitutionen pro Nukleotidposition. *C. acidurici* 9a ist in rot markiert. Der Organismus *A. woodii* DSM 1030 wurde zur Bestimmung der Wurzel des Baumes verwendet. Soweit dies möglich war, wurden verwandte Organismen Gruppen zugeordnet (Collins et al, 1994). Gestrichelte Linien stellen definitive Grenzen zur nächsten Gruppe dar, Linien mit Strichen und Punkten solche, wo eine klare Abgrenzung nicht möglich bzw. nicht eindeutig war.

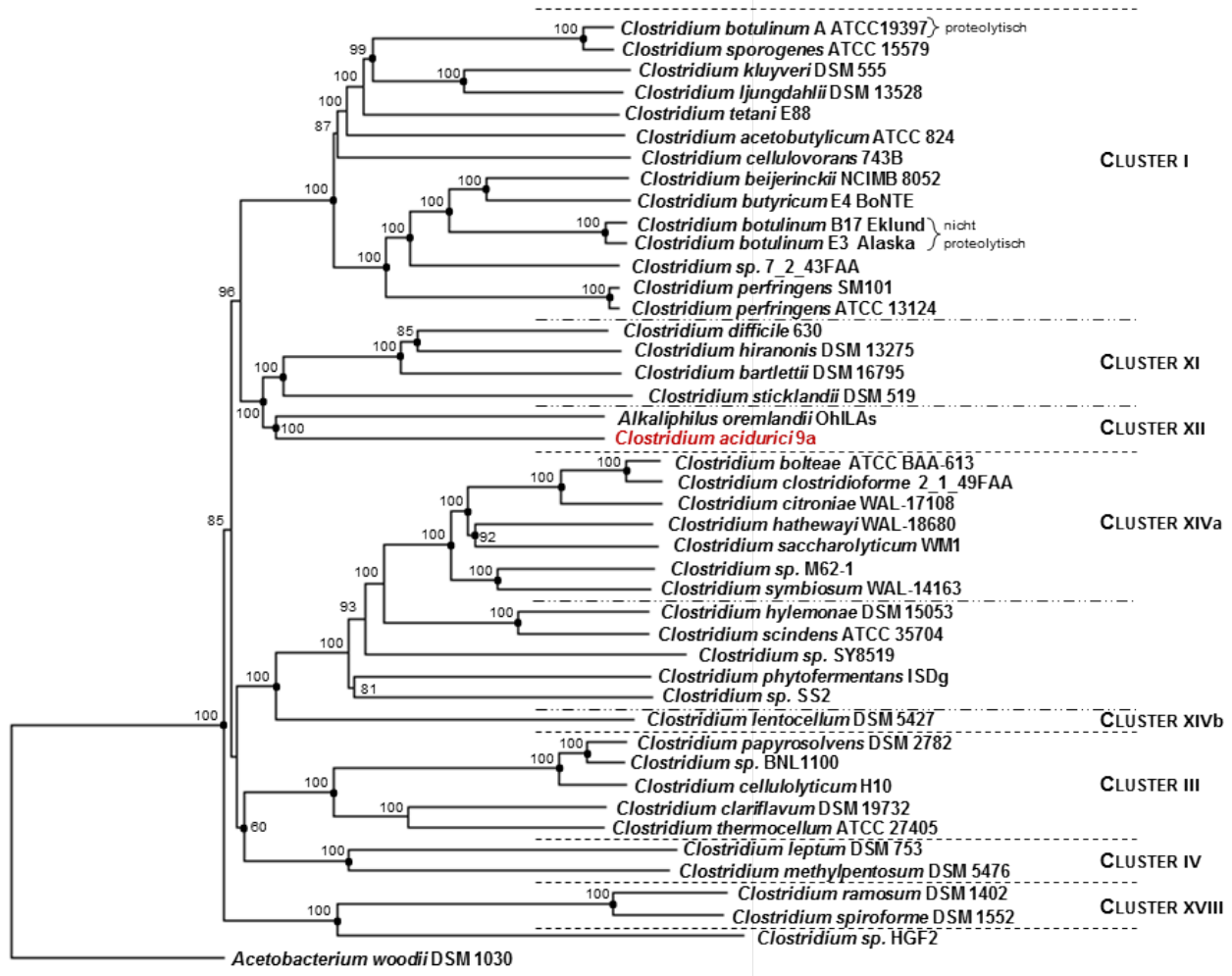


Abb. 6: MLSA-basierte taxonomische Beziehung von *C. acidurici* 9a zu anderen *Clostridia*ceae.

In die Berechnungen flossen die Aminosäure-Sequenzen von 90 Genen des *core*-Genoms in einfacher Kopie von 44 Organismen mit ein. Die Zugangsnummern der verwendeten Organismen sind im Anhang zu finden (A.III., Tab. 15). Die Kalkulation wurde mit Hilfe des Programmes ARB (Ludwig et al, 2004) mit der Neighbour-Joining-Methode durchgeführt. Knotenpunkte, die mit der Maximum-Likelihood-Methode reproduziert werden konnten, sind mit schwarzen Kreisen markiert. Die Zahlen an den Knotenpunkten stellen die *bootstrap*-Werte in Prozent von 1000 Replikaten dar, wobei Werte <50% nicht aufgeführt sind. Die Länge des Balkens repräsentieren 0,1 Substitutionen pro Nukleotidposition. *C. acidurici* 9a ist in rot markiert. Der Organismus *A. woodii* DSM 1030 wurde zur Bestimmung der Wurzel des Baumes verwendet. Soweit dies möglich war, wurden verwandte Organismen Gruppen zugeordnet (Collins et al, 1994). Gestrichelte Linien stellen definitive Grenzen zur nächsten Gruppe dar, Linien mit Strichen und Punkten solche, wo eine klare Abgrenzung nicht möglich bzw. nicht eindeutig war.

Zusätzlich wurde die Wahrscheinlichkeit der Knotenpunkte durch die Angabe von *bootstrap*-Werten unterstützt (2.10). Wie in den **Abbildungen 5** und **6** zu erkennen ist, erbringen die beiden Methoden sehr ähnliche Ergebnisse, wobei jedoch anzumerken ist, das im MLSA-basierten Baum weniger Übereinstimmungen zwischen der *neighbour joining*- und der *maximum*

likelihood-Methode vorliegen. Als Wurzel beider Bäume wurde *A. woodii* DSM1030 gesetzt, da er nicht zur Gattung *Clostridium* gehört und weniger Ähnlichkeiten zu *C. acidurici* 9a zeigte als *A. oremlandii* OhILAs. Letzterer konnte in beiden Bäumen als nächster Verwandter zu *C. acidurici* 9a identifiziert werden. Nach Collins et al. kann *C. acidurici* 9a dem Cluster XII zugeordnet (Collins et al, 1994) werden. *A. oremlandii* wurde in den damaligen Berechnungen nicht berücksichtigt, so dass eine Zuordnung zu diesem Cluster nur vermutet werden kann. Das benachbarte Cluster XI besteht aus *C. difficile*, *C. sticklandii*, *C. bartlettii* und *C. hiranonis*, wobei die letzten beiden Organismen auch hier damals nicht berücksichtigt wurden, jedoch ist die Clusterung in diesem Fall sehr eindeutig, so dass von ein und demselben Cluster ausgegangen werden kann. Das Cluster I bestehend aus *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. kluyveri*, *C. ljungdahlii*, *C. tetani*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. perfringens* und *C. cellulovorans* nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Clostridien ein. Zum Einen ist es das Größte unter den Clustern und zum Anderen zeigen Mitglieder dieser Gruppe sehr hohe Level an Ähnlichkeiten untereinander (generell höher als 90%), obwohl die Organismen unterschiedlichste Phänotypen und Substratspektren aufweisen (Collins et al, 1994). Im MLSA-Baum teilen Cluster I und Cluster XI/XII einen Knotenpunkt und stammen von einem gemeinsamen Vorfahren ab (**Abb. 6**). Im 16S-rRNA-Gen-Baum erfolgt eine Verzweigung viel früher und Cluster I teilt den Knotenpunkt mit dem Cluster III (**Abb. 5**). Vergleicht man die Ergebnisse in **Abbildung 5** und **6** weiter, so gibt es doch Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Die Einteilung der benachbarten Organismen in Cluster war zwar nahezu identisch, jedoch glichen sich die Verhältnisse innerhalb der Cluster nicht immer. Dies wird vor allem in Cluster XIVa deutlich, wo die Grenzen zum nächsten Cluster (unbenannt) zwischen den beiden Methoden verschwimmen. Besonders *C. hathewayi* und *C. sp. M62-1* stechen hier heraus und fallen mal in das eine, mal in das andere Cluster und sind dementsprechend unterschiedlichen Organismen als nächstem Verwandten zugeordnet.

3.1.3.2 Genomvergleiche mittels globalem Alignment und bestem bidirektionalen BLAST-Treffer

Für weiterführende Vergleiche innerhalb der Clostridien wurde ein bidirektionaler BLAST® mit dem Programm BiBaG mit dem Genom von *C. acidurici* 9a gegen 68 andere *Clostridiaceae* durchgeführt. Für die Analyse wurden wie schon für die Berechnung des MLSA-Baumes alle in der NCBI-RefSeq-Datenbank verfügbaren Genome aus dem Genus *Clostridium*, sowie die Genome von *A. oremlandii* OhILAs und *Acetobacterium woodii* DSM 1030 hinzugezogen. Jedoch wurden dieses Mal alle Stämme einer Spezies berücksichtigt. Eine Liste der verwendeten Genome ist im Anhang zu finden (**A.III., Tab.16**). Mit Hilfe eines globalen Alignments auf Proteinebene und der Methode des bidirektionalen besten BLAST-Treffers (siehe **2.10.**), sollten innerhalb dieser Organismen Orthologe zu den in *C. acidurici* 9a bestimmten Genen identifiziert werden. Darauf basierend konnten anschließend sowohl das *core*-Genom innerhalb der Gruppe der Clostridien bestimmt werden, also Gene, die allen Organismen gemein sind, als auch das flexible Genom. Im flexiblen Teil des Genoms können wiederum Unterscheidungen in solche Bereiche gemacht werden, die entweder in nur einigen der Organismen vorkommen oder Bereiche, die in *C. acidurici* 9a sogar einzigartig sind und in keinem der anderen Organismen Orthologe aufweisen. Wie auch bei komparativen Genomvergleichen in anderen Organismen (Kalhoefer et al, 2011), wurde bei einem *e-value* e^{-10} und einem *NW-score* 30% ein *cutoff* gesetzt, da bei schlechteren Werten davon auszugehen ist, dass es sich um kein Ortholog handelt. Die meisten Treffer zu den Genen in *C. acidurici* 9a zeigte *C. sporogenes* ATCC 15579 mit 1450 Orthologen, gefolgt von *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (1427), verschiedenen Stämmen von *C. botulinum* (1407-1421), *A. oremlandii* OhILAs (1405), *C. ljungdahlii* DSM 13528 (1341), *C. butyricum* E4 BoNT E (1317), verschiedenen Stämmen von *C. difficile* (1304-1310) und *C. kluyveri* DSM 555 (1302) (**A.IV., Tab. 16**). Die wenigsten Treffer konnten mit 814 Orthologen für *C. spiroforme* DSM 1552 erzielt werden. Eine genaue Übersicht der Anzahl an Orthologen und die prozentuale Verteilung von Genen nach (i) einem Needleman-Wunsch-(NW)-*score* $> 30\%$ und einem *e-value* $< e^{-10}$ und (ii) nach einem *NW-score* $> 70\%$ und einem *e-value* $< e^{-100}$ (siehe **2.10**) ist im Anhang gegeben (**A.IV., Tab. 16**) gegeben. Letzteres repräsentiert dabei Orthologe mit hoher Ähnlichkeit der Proteine.

Allgemein ist zu beobachten, dass mindestens 50% der Gene in *C. acidurici* 9a keine Orthologe in anderen Clostridien besitzen, im Vergleich mit *C. spiroforme* sogar 70%. Ein Unterschied ergibt sich, wenn man die Orthologe hinsichtlich des Grades der Konservierung, also der Höhe der Sequenzidentität, vergleicht. Zwar besitzt *C. sporogenes* ATCC 15579 mit 51% die meisten Orthologe zu *C. acidurici* 9a, jedoch ist der Anteil an stark konservierten Orthologen (mindestens 70% Sequenzübereinstimmung) mit 9,8% niedriger als bei *A. oremlandii* OhILAs, der hier mit 12% den höchsten Wert aufweist. Vom Prinzip her, spiegelt dies das verwandtschaftliche Verhältniss wie es in 3.1.3.1 für *C. acidurici* 9a und *A. oremlandii* OhILAs ermittelt wurde wider. Dies konnte jedoch nicht für *C. sporogenes* und *C. botulinum* bestätigt werden. Die näher verwandten Clostridien des Cluster XI, *C. difficile*, *C. sticklandii*, *C. bartletti* und *C. hiranonis* wiesen mit 8,9%, 7,7%, 7,4% und 6,7% zwar auch vergleichsweise stark konservierte Orthologe auf, jedoch lag der Anteil in vielen der Organismen aus dem Cluster I wie *C. sporogenes* ATCC 15579 (9,8%), *C. botulinum* F Langeland (9,7%) und *C. ljungdahlii* DSM 13528 (9,0%) wesentlich höher (**A.IV., Tab. 16**).

Eine Analyse des *core*-Genomes erbrachte ein Set von 195 Genen (siehe **A.V., Tab. 17**), welches allen verwendeten Organismen gemein ist und etwa 7% des gesamten Genoms ausmachen. Darunter befanden sich vor allem Genen für die Replikation wie *dnaA*, *dnaN* und *recF*, Gene des Zellwandaufbaus wie *murG* und *murE*, des allgemeinen Stoffwechsels wie *ackA* und *pfkA* und ribosomale Protein-kodierende Gene wie *rplO*, *rplR* und *rplF*. Interessanterweise gehörten auch Gene für Entgiftungssysteme wie *copA* und *cadA* dazu, wobei die restlichen Gene des *cop*-Systems (*copZ* und *csoR*, siehe **3.4.2**) nicht enthalten waren. Außerdem umfasste das *core*-Genom nicht nur Gene dessen Produkten eine klare Funktion zugewiesen werden konnte, sondern auch solche für nicht näher klassifizierte Methyltransferasen und Proteine mit unbekannter Funktion. Das flexible Genom von *C. acidurici* 9a umfasste demnach 2647 Gene, wobei der Großteil (2311) aus Genen bestand, die Orthologe auch in anderen Clostridien besaßen, jedoch nicht in allen. 336 Gene waren für *C. acidurici* 9a einzigartig. **Abbildung 7** gibt eine Übersicht über die Verteilung der Gene des *core*- und flexiblen Genoms in *C. acidurici* 9a.

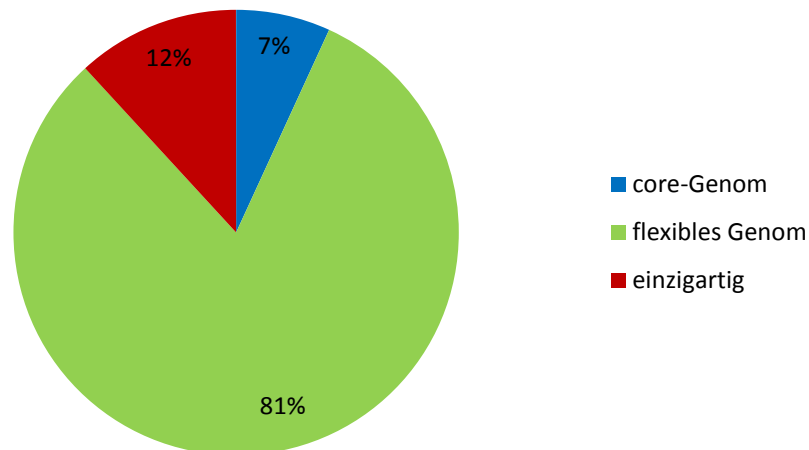


Abb. 7: Verteilung der Gene in *C. acidurici* 9a auf *core*-Genom und flexibles Genom.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Genen des *core*- (blau) und des flexiblen Genoms (grün) bzw. der einzigartigen Gene im flexiblen Genom (rot).

Es konnten vier Regionen ausgemacht werden, die eine Anhäufung dieser einzigartigen Gene aufwiesen, jedoch nicht zu den Fremdgen-Regionen gehören (vgl. 3.1.4). Zur Visualisierung dieser Regionen wurden die identifizierten Orthologe von neun ausgewählten Vertretern (A.IV., Tab. 16, grün markierte Organismen) mit dem Programm DNA-Plotter dem Genom von *C. acidurici* 9a gegenüber gestellt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3** in den chromosomalen Ringen 5-13 dargestellt. Die Auswahl der Organismen wurde so getroffen, dass eine Einteilung in drei Gruppen erfolgen konnte. Die äußeren drei Organismen, *C. sticklandii* DSM 519, *C. kluyveri* DSM 555 und *A. oremlandii* OhILAs bilden zusammen die Gruppe der Spezialisten (**Abb. 3**, Ringe 5-7, Grüntöne). Sie sind zum Teil in der Lage sehr unterschiedliche oder auch ungewöhnliche Substrate wie Aminosäuren (*C. sticklandii*) (Fonknechten et al, 2010), Ethanol und Acetat (*C. kluyveri*) (Seedorf et al, 2008) oder Arsenat und Thiosulfat (*A. oremlandii*) (Stolz et al, 2007) zu verwerten. Die zweite Gruppe umfasst die saccharolytischen, bzw. Lösungsmittelbildenden Clostridien (**Abb. 3**, Ringe 8-10, Rottöne) *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 und *C. ljungdahlii* DSM 13528, wobei letzterer zwar in der Lage ist diverse Hexosen und Pentosen zu verwerten, aber auch fermentativ auf CO₂/H₂ oder Synthesegas wachsen kann (Köpke et al, 2010). Die letzte Gruppe bilden die pathogenen Vertreter (**Abb. 3**, Ringe 11-13, Blautöne) *C. difficile* 630, *C. botulinum* A ATCC 19397 und *C. tetani* E88. Die vier

auffälligen Bereiche im Genom von *C. acidurici* 9a stellten eine Anhäufung von Genen dar, die keine Orthologe in allen anderen Organismen aufwiesen. In **Abbildung 3** sind diese Bereiche durch römische Zahlen (I-IV) gekennzeichnet. Im Bereich I konnten zwei Gene identifiziert werden, die für Proteine mit S-Layer-Domänen kodieren (Curi_c01670-01680) und für ein Protein mit einer Calycin-ähnlichen Domäne (Curi_c01620). Calycine bilden eine große Superfamilie an Proteinen, die alle eine ähnliche beta-Fass-Struktur aufweisen und in Familien wie Lipocaline und Fettsäurebindeproteine unterteilt werden. In Abschnitt II befinden sich hauptsächlich Gene, die für uncharakterisierte Transkriptionsfaktoren (Curi_c12620-12630) oder Acetyltransferasen (Curi_c12610) kodieren. Am Auffälligsten sind die Regionen III und IV. Hier sind große Cluster von aufeinanderfolgenden Genen lokalisiert, die ausschließlich für Proteine unbekannter Funktion kodieren (Curi_c14550-14600, Curi_c14650-14730, Curi_c16420-16570). Bei der Analyse des flexiblen Genoms von *C. acidurici* 9a fielen vier weitere Gene auf, deren Orthologe nur in einem weiteren Organismus außer *C. acidurici* 9a identifiziert werden konnten. Drei davon wurden im Genom von *A. woodii* DSM 1030 gefunden. Es handelt sich dabei um Gene, die für zwei Untereinheiten einer ATP-abhängige Protease kodieren (*hslU* und *hslV*, Curi_c16080-16090) und für eine Histidin-Kinase eines Zwei-Komponenten-Signaltransduktions-Systems (Curi_c04700). In *E. coli* fungiert HslUV gleichzeitig als Hitzeschock-Protein, Protein-aktivierte ATPase und ATP-abhängige Proteinase (Seol et al, 1997). Eine BLAST-Analyse der beiden Proteine ergab keinen einzigen Treffer für ein Protein aus einem *Clostridium*. Dafür zeigten sie Ähnlichkeiten zu Vertretern der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus*. In *A. oremlandii* OhILAs wurde ebenfalls ein einzigartiges Ortholog identifiziert. Hier handelt es sich um das Gen für die Permease-Untereinheit eines nicht näher charakterisierten ABC-Transporters (Curi_c05210). Innerhalb des Genus *Clostridium* wurden keine einzigartigen Orthologe gefunden, die nur in einer weiteren Spezies auftraten.

3.1.4 Identifizierung von Fremdgenen und hypervariablen Regionen

Neben einzigartigen Genen innerhalb der Clostridien sollte auch Fremd-DNA im Genom von *C. acidurici* 9a identifiziert werden, also DNA, die potentiell von anderen Organismen im Laufe der Evolution übernommen worden ist. Dazu gehören unter anderem die sogenannten *genomic*

islands (GIs), Bereiche im Genom, die Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer liefern (Langille & Brinkman, 2009). Oft werden sie basierend auf ihren Funktionen unterschieden und dann z.B. *pathogenicity island* oder *antibiotic resistance islands* genannt. Hinweise auf ein GI sind zum Einen ihre Größe, die meist mehr als 10 kb beträgt, ihre gelegentliche Assoziation mit tRNA-kodierenden Genen und einem abweichenden G+C-Gehalt im Vergleich zum Rest der Gene des Genoms (Kalhoefer et al, 2011). Natürlicherweise sind auch Transposasen bzw. mobile genetische Elemente als häufige Ursache für horizontalen Gentransfer oft mit GIs assoziiert (Osborn & Boltner, 2002). Die Vorhersage solcher *genomic island* mit Sequenz-basierten bioinformatischen Methoden beruht auf der natürlichen Variation der Genomsequenz-Zusammensetzung verschiedener Spezies (Langille et al, 2008; Langille & Brinkman, 2009). Sind in einem Genom Sequenzregionen zu finden, die eine vom Rest abnormale Benutzung der Codons oder Nukleotide aufweisen, ist dies meist ein Hinweis auf horizontalen Gentransfer. Die Vorhersage der Fremdgene im Genom von *C. acidurici* 9a geschah mit Hilfe der Programme COLOMBO (Waack et al, 2006) und IslandViewer (Langille & Brinkman, 2009). Insgesamt wurden 91 kb (2,9%) an mutmaßlicher Fremd-DNA identifiziert. Die vorhergesagten Gene beider Programme sind in **Abbildung 3** in Ring 4 dargestellt (violett). Besonders auffällige Bereiche, also Regionen mit einer Akkumulierung an Fremdgenen wurden mit arabischen Zahlen gekennzeichnet (1-4). Eine zusätzliche genaue Auflistung aller ermittelten Fremdgene ist im Anhang aufgeführt (**A.VI., Tab. 18**).

In Bereich 1 (**Abb. 3**) befinden sich viele Gene, die für ABC-Transportsysteme kodieren, wie z.B. ein Ferrichrom-ABC-Transporter (Curi_c04900-04930) und ein weiterer uncharakterisierter Transporter (Curi_c04500-04520). In der gleichen Region konnte auch ein Cluster an Genen identifiziert werden, welches Resistenz gegen Vancomycin vermittelt (Curi_c05040-05050). COLOMBO schlug als eventuelle Herkunft für diese Gene Alphaproteobakterien vor. Mehrere der Fremdgene innerhalb der Regionen 1-4 kodierten unter anderem für weitere nicht näher charakterisierte Acetyltransferasen (Curi_c05130, Curi_c05320), transkriptionelle Regulatoren (Curi_c04890, Curi_c05120) oder Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme (Curi_c04810-04820, Curi_c05350-05360, Curi_c05440-05450). Mit Transposasen bzw. mobilen genetischen Elementen waren lediglich die Regionen 1 und 2 assoziiert (**Abb. 3**, Ring 3, schwarz). Im Gegensatz dazu konnte ein abweichender G+C-Gehalt als Hinweis auf ein GI nur in den Regionen 3 und 4 festgestellt werden.

Obwohl keine vollständigen Prophagen in der Genomsequenz gefunden wurden, konnten zumindest Gene identifiziert werden, die für Phagenreste wie Proteine der Integrase-Familie (Curi_c05580, Curi_c24810, Curi_c24830) und die kleine Untereinheit der Phagen-Terminase (Curi_c14970) kodieren. Der frühere Kontakt von *C. acidurici* 9a mit Phagen wurde durch die Identifizierung von CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) und der damit assoziierten *cas*-Gene (CRISPR-associated genes) deutlich (Curi_c06190-06260). CRISPR stellen als hypervariable Regionen (HVRs) eine andere Form von Fremd-DNA dar. Sie beinhalten Abschnitte sich wiederholender DNA-Sequenzen, welche der allgemeinen Meinung nach eine Art bakteriellen Immunsystems gegen fremdes Erbgut von Phagen, Viren usw. darstellen (Barrangou et al, 2007). CRISPR variieren in ihrer Länge zwischen 20 und 50 bp. Sie wechseln sich mit sogenannten *spacern* ab, die keine Sequenzwiederholungen aufweisen und eine Länge von etwa 20-70 bp besitzen können. Da die Sequenz der CRISPR Sequenzwiederholungen meist palindromisch ist, weist die zugehörigen RNA eine stabile Sekundärstruktur auf. Die Spacer-Regionen wurden von Bolotin et al. (Bolotin et al, 2005) als identisch zu Fremd-DNA aus Phagen und Plasmiden identifiziert. Sie mussten durch einen früheren Kontakt des Organismus mit solchen Elementen entstanden sein und brachten die Idee des CRISPR als Immunsystem auf. Die *cas*-Gene im Genom des „Phagen-infizierten“ Organismus sind strikt mit den CRISPR-Elementen assoziiert und immer in der Nähe eines *repeat*-Clusters lokalisiert (Haft et al, 2005). Die Gene *cas1-cas6* bilden dabei die Kernausrüstung an *cas*-Genen. In weiteren Untersuchungen konnten durch multiple Sequenzalignments in Kombination mit Hidden-Marcov-Models 41 zusätzliche Cas-Proteinfamilien entdeckt und acht CRISPR-assoziierte Subtypen definiert werden (Haft et al, 2005). Im Genom von *C. acidurici* 9a wurden als Kerngene *cas1* (Curi_c06250), *cas2* (Curi_c06260), *cas3* (Curi_c06230), *cas4* (Curi_c06240) und *cas6* (Curi_c06190) identifiziert. Auch das Kerngen *cas5* war in diesem Cluster lokalisiert, dabei handelte es sich jedoch um die Variation *cas5t*, die nur den N-terminalen Bereich beinhaltete. Zusätzlich wurden die Gene *cst1* (Curi_c06200), welches ein CXXC-CXXC-Motiv aufwies und *cst2* (Curi_c06210), dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu dem CRISPR-assoziierten Autoregulator DevR aus *Myxococcus xanthus* zeigte. Die Gene *cas5t*, *cst1* und *cst2* sind dem CRISPR-assoziierten Subtypen Tneap zuzuordnen, basierend auf dem Organismus *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 (Haft et al, 2005). In etwa 86% aller in der CRISPR-Datenbank (<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>) gelisteten Archeen und 48% aller gelisteten Bakterien konnten CRISPR-Regionen identifiziert werden

(Stand 16.10.2012). In *C. acidurici* 9a wurden mit Hilfe des CRISPR-Finders (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>) eine große und zwei kleinere CRISPR-Regionen entdeckt. Eine Übersicht ihrer Eigenschaften ist in **Tabelle 10** gegeben.

Tab. 9: CRISPR-Regionen und ihre Eigenschaften in *C. acidurici* 9a.

	CRISPR 1	CRISPR 2	CRISPR 3
Startposition	704762	2342574	2342944
Stopposition	706990	2342866	2343634
Länge [bp]	2228	292	690
Anzahl Spacer	33	4	10
Basenzahl Spacer [ø]	37	37	37
Consensussequenz repeat	3'- GCATTAATAGAACTA AAGTAGAATGTAAAT -5'	3'- ATTTACATTCTACTC TAGTTCTATTAATAC -5'	3'- ATTTACATTCTACTC TAGTTCTATTAATAC -5'
Basenzahl repeat	30	30	30

CRISPR 2 und CRISPR 3 weisen die gleiche Consensussequenz auf und werden lediglich durch 78 bp voneinander getrennt. Da keine weiteren *cas*-Gene in der Nähe dieser beiden CRISPR-Regionen identifiziert wurden, sondern nur stromaufwärts direkt vor der CRISPR-Region 1, ist fraglich, ob es sich bei den Regionen 2 und 3 tatsächlich um CRISPR handelt. Eine BLAST-Analyse aller *spacer* sollte weitere Einblicke bringen, jedoch konnten aus den Ergebnissen keine Rückschlüsse auf die Art des erfolgten „Angriffs“ von außen gezogen werden.

3.2 Nähere Betrachtung des Plasmids pCuri3 aus *C. acidurici* 9a

Wie bereits erwähnt, konnte in *C. acidurici* 9a ein Plasmid mit einer Größe von 2.913 bp identifiziert werden (**Abb. 3**). Bereits während der Isolierung der Gesamt-DNA aus *C. acidurici* 9a zur Sequenzierung und der anschließenden Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel fiel eine definierte Bande in der Höhe von ca. 3.000 bp auf (**Abb. 7**).

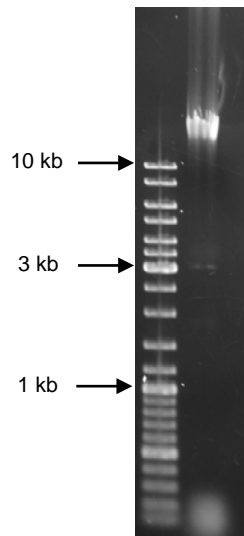


Abb. 8: Visualisierung genomischer DNA aus *C. acidurici* 9a.

Die isolierte genomische DNA aus *C. acidurici* 9a wurde auf ein 0,8 %iges Agarogel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die chromosomale DNA ist als dicker heller Schmier oberhalb von 10 kb zu erkennen, die Plasmid-DNA als schwache Bande bei 3 kb.

Dies gab bereits den ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines Plasmids. Mit einer Modifizierung des QIAprep® Spin Miniprep Kit-Protokolls (siehe 2.3.2.2) konnte das Plasmid später isoliert und eindeutig nachgewiesen werden. Die Sequenzierung des Genoms bestätigte später das Vorhandensein. Aufgrund seiner geringen Größe konnten neben dem Replikationsprotein-kodierenden Gen nur zwei weitere Gene (Curi_3p00020-00030) auf dem Plasmid identifiziert werden. Beide kodieren für Proteine ohne bekannte Funktionen und Domänen oder Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen. Der G+C-Gehalt weicht mit 29% leicht von dem des Chromosoms ab. Für einen Vergleich clostridialer Plasmide wurden alle in NCBI gelisteten Plasmide des Genus *Clostridium* hinzugezogen, deren Sequenz vollständig sequenziert und geschlossen war. Die Größe der so erhaltenen 46 Plasmide wurde in einem Diagramm gegen die Anzahl an kodierenden Genen auf dem Plasmid aufgetragen (**Abb. 9**).

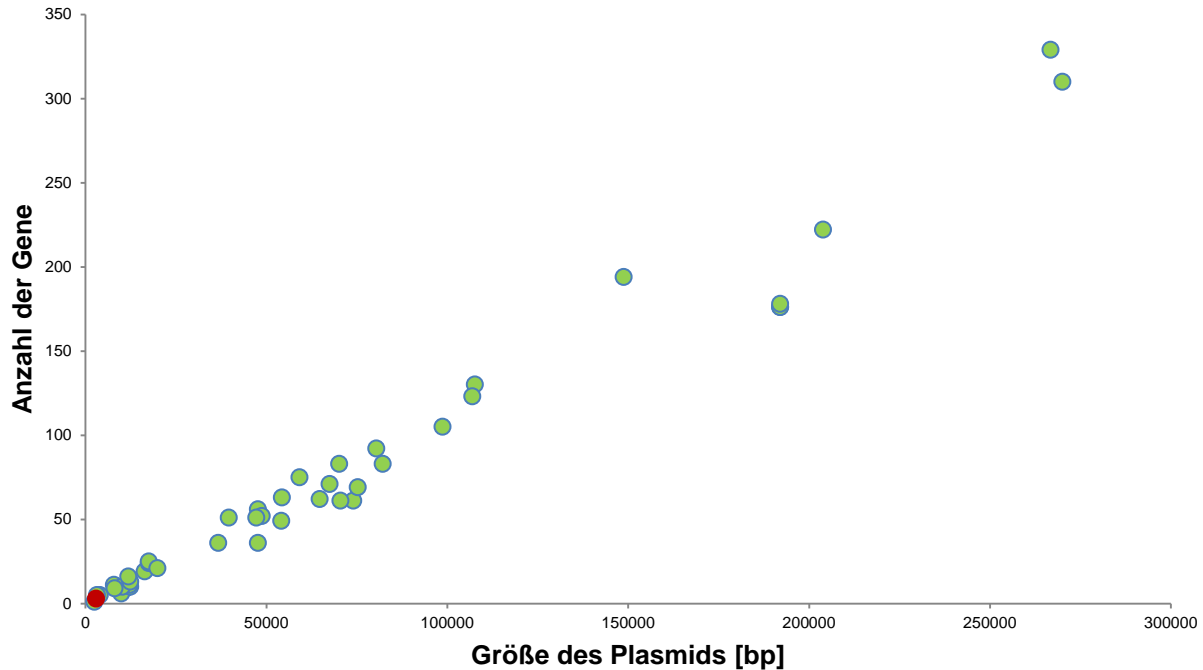


Abb. 9: Vergleichende Visualisierung der Größe und Anzahl an Genen verschiedener clostridialer Plasmide. Die Anzahl der Gene von 46 sequenzierten Plasmiden des Genus *Clostridium* (Quelle: NCBI Database) wurden gegen ihre Größe (Anzahl Basenpaare) aufgetragen. Das Plasmid pCuri3 aus *C. acidurici* 9a ist in rot hervorgehoben. Alle anderen in grün gehalten. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Plasmide und ihrer Größen und Gen-Anzahl sind im Anhang zu finden (A.VII., Tab. 19).

Wie zu erwarten, steigt mit der Größe des Plasmids auch die Anzahl an Genen, die auf dem Plasmid kodiert liegen, was an der linearen Steigung der Auftragung der Punkte sichtbar wird. Bei einem Vergleich der Größen fällt auf, dass sich drei Gruppen herausbilden: Plasmide mit einer Größe bis zu 20 kb, einer Größe von 40-100 kb und einer Größe von 150-270 kb. Plasmide in der Größe von pCuri3 unter 4 kb sind eher selten und es wurden nur vier davon identifiziert. Lediglich das Plasmid pMCF-1 aus *Clostridium* sp. Ist mit 2.450 bp noch kleiner als pCuri3, so dass das Plasmid von *C. acidurici* 9a eines der kleinsten in einem *Clostridium* sequenzierten darstellt.

3.2.1 Bestimmung der Anzahl an Plasmidkopien

Zur weiteren Charakterisierung des Plasmids, sollte untersucht werden, in wie vielen Kopien es pro Chromosom in der Zelle vorliegt und ob es sich dementsprechend um ein *high-* oder *low-copy*-Plasmid handelt. Die Anzahl an Plasmidkopien (*Plasmid Copy Number*, PCN) sollte mittels *real-time* qPCR nach einer modifizierten Methode von Škulj et al. (Škulj et al, 2008) für Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geschätzt werden. Dafür wurden Zellen nach ca. 5 h geerntet und zunächst bei -80 °C tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurde die Gesamt-DNA isoliert (siehe 2.3.1) und das Vorhandensein von sowohl chromosomaler als auch Plasmid-DNA per Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für die *real-time* PCR-Reaktion auf DNA-Ebene wurden die Oligonukleotide cau825/cau826 und cau831/cau832 (siehe A.I., Tab. 13) verwendet. Wobei erstere spezifisch an Nukleotide innerhalb des Gens für das chromosomale Replikationsprotein DnaA binden und letztere an Nukleotide innerhalb des Gens, welches für das Plasmid-Replikationsprotein RepB kodiert. Da beide Gene nur ein einziges Mal im gesamten Genom vorkommen, sollte mit der *real-time*-Methode das relative Verhältnis der Menge an PCR-Produkt der beiden zueinander Aufschluss darüber geben, wie viele Male das Plasmid-Replikationsgen *repB* im Verhältnis zum chromosomalen Gen *dnaA* vorhanden ist und somit, wie viele Kopien des Plasmids in der Zelle vorliegen. Die isolierte Gesamt-DNA wurde in mehreren Stufen verdünnt und im Endeffekt für die PCR-Reaktionen 1:1, 1:5, 1:25, 1:50, 1:125 oder 1:250 eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden wie in 2.11.1 und 2.11.2 beschrieben mit den jeweiligen Oligonukleotiden angesetzt und die Amplifikation mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes „SYBR Green“ quantifiziert. Es wurden für jede Verdünnungsstufe vier Parallelansätze angefertigt, damit ein abweichender Wert falls nötig ausgeschlossen werden konnten. Die Ct-Werte wurden von der IQ5 Optical System Software automatisch berechnet. Für das chromosomale Oligonukleotidpaar wurde eine Effizienz von 93% berechnet und für das Plasmid-Oligonukleotidpaar eine Effizienz von 91% (Eingesetzte Werte siehe A.VIII., Tab. 20/21, Berechnung siehe 2.11.2, A.VIII., Abb. 32/33). Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte für jede Probe und Verdünnungsstufe nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** zusammengefasst.

Tab. 10: Anzahl der Plasmidkopien in den verschiedenen Verdünnungsstufen der *template*-DNA

Verdünnungsstufe	Anzahl Plasmidkopien
1:1	7,8
1:5	8,3
1:25	10,5
1:50	9,1
1:125	9,5
1:250	7,8
Ø	8,8
Standardabweichung	1,1

Es ergaben sich für Zellen gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase etwa 9 (\pm 1) Plasmidkopien pro Chromosom. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Plasmid in *C. acidurici* 9a um ein *low-copy*-Plasmid handelt.

3.2.2 Transkriptionsanalyse von Plasmid-lokalisierten Genen durch RT-PCR

Wie bereits erwähnt, konnten neben dem Gen für das Plasmid-Replikationsprotein noch zwei weitere Gene (Curi_c00020-00030) identifiziert werden, welche für zwei hypothetische Proteine kodieren. Da keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen festgestellt werden konnten, sollte zumindest eine semi-quantitative Transkriptionsanalyse durchgeführt werden, um herauszufinden, ob diese Gene unter Standard-Wachstumsbedingungen in 12 mM Harnsäure-Medium bei 37 °C transkribiert werden. Dazu wurden Zellen in der exponentiellen Phase nach 5 h Wachstum geerntet und die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.3.3). Anschließend wurde die RNA mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.9) und eine semi-quantitative PCR mit 24 Zyklen im Vergleich zu 30 Zyklen durchgeführt (siehe 2.5.1). Dabei wurden die Oligonukleotide cau843/cau844 zur Amplifikation von Bereichen aus Curi_c00020 verwendet und cau833/cau834 für Bereiche aus Curi_c00030. Als Referenz diente das *housekeeping*-Gen

recO, welches für ein konstitutiv exprimiertes Reparaturprotein kodiert. Für die Positivkontrollen wurde DNA als *template* für die PCR-Reaktion eingesetzt, für die Negativkontrollen H₂O oder RNA. Wie in **Abbildung 9** zu erkennen ist, hat sowohl für Curi_c00020 als auch Curi_c00030 eine vergleichbare Amplifikation stattgefunden, so dass von einer konstitutiven Transkription beider Gene in einem ähnlichen Maße ausgegangen werden kann.

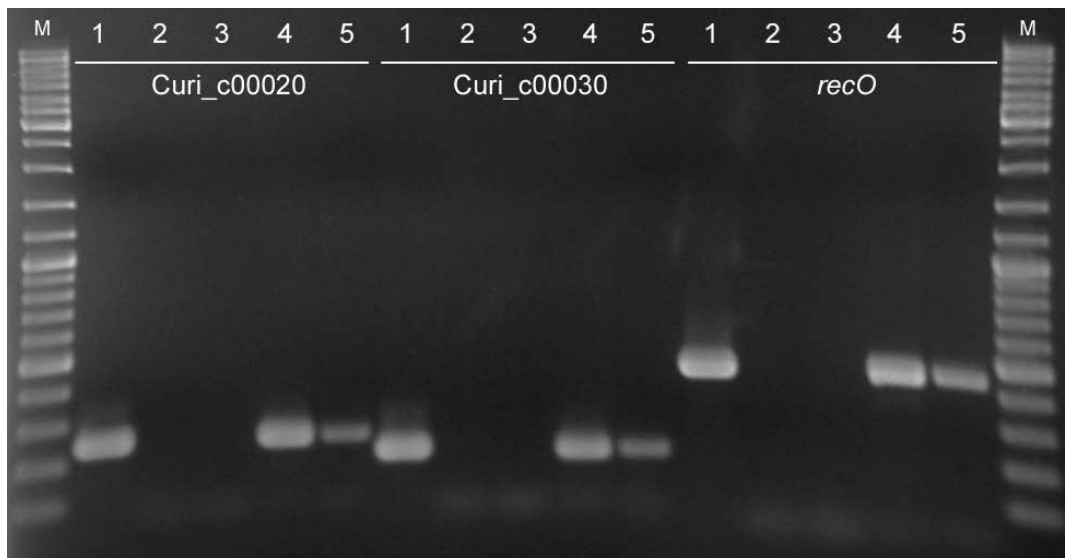


Abb. 10: Semi-quantitative Transkriptionsanalyse von Plasmid-assoziierten Genen.

Zellen wurden innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe von *random hexamer*-Oligonukleotiden. Für die semi-quantitative Transkriptionsanalyse wurden spezifische Oligonukleotide für die Plasmid-assoziierten Gene Curi_c00020 und Curi_c00030, welche für zwei hypothetische Proteine kodieren, eingesetzt. Als Kontrollgen diente *recO*, welches für ein konstitutiv exprimiertes Reparaturprotein kodiert. Für die Positivkontrollen (1) wurde DNA als *Template* für die PCR-Reaktion eingesetzt, für die Negativkontrollen Wasser (2) und RNA (3). Die PCR wurde mit cDNA als *Template* durchgeführt mit 30 Zyklen (4) im Vergleich zu 24 Zyklen (5) für eine semi-quantitative Analyse. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. M, Marker 10 kb Ladder Mix

3.3 Substratverwertung und Energiehaushalt

Als purinolytisches *Clostridium* ist *C. acidurici* 9a in der Lage, viele Purinderivate als alleinige Quelle für Kohlenstoff, Stickstoff und Energie zu nutzen. Zu diesen verwertbaren Purinderivaten gehören Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin und Guanin. Adenin kann dagegen nicht genutzt werden (Barker & Beck, 1942), obwohl auf dem Chromosom Gene identifiziert wurden, welche

für Adenin-Deaminasen kodieren (Curi_c04950, Curi_c09560, Curi_c29030). Neben Purinen wurden auch diverse andere Substrate getestet. Unter anderem Aminosäuren in den Kombinationen (1) Leucin, Lysin, Aspartat, Alanin, Valin und Prolin, (2) Arginin, Histidin und Cystein und (3) Hydroxyprolin, Tyrosin und Glycin (Barker & Beck, 1942) oder die Hexose Glukose (Barker & Beck, 1941). Mit keinem der genannten Substrate konnte Wachstum von *C. acidurici 9a* beobachtet werden.

Mit Hilfe der Annotation des Genoms von *C. acidurici 9a* sollten im Folgenden sowohl die einzelnen Schritte der Verwertung verschiedener Substrate als auch der Energiehaushalt und Intermediärmetabolismus rekonstruiert und überprüft werden.

3.3.1 Abbau von Purinen

Während des Wachstums mit Purinen wie Harnsäure als Substrat entstehen als Endprodukte Acetat, CO₂ und NH₃ (Barker & Beck, 1941). Der erste Schritt während des Abbaus von Purinen in *C. acidurici 9a* ist immer die Umwandlung des Purins zu Xanthin (Vogels & Van der Drift, 1976). Solche Reaktionen werden in diesem Organismus hauptsächlich von dem Enzym Xanthin-Dehydrogenase katalysiert. Es benötigt Selenit als Cofaktor (Wagner & Andreesen, 1979) und kommt in Prokaryoten als Heterotetramer oder- hexamer vor, je nachdem, ob die Untereinheiten von zwei oder drei Genen kodiert werden. Die Xanthin-Dehydrogenase in *C. acidurici 9a* besteht aus drei Untereinheiten, welche entweder Molybdän in Form des Molybdän-Cofaktors (XdhA), FAD (XdhB) oder 2Fe-2S-Cluster (XdhC) binden können. Es konnte ein Cluster von Genen (Curi_c23900-23920) im Genom von *C. acidurici* identifiziert werden, welche für dieses Enzym kodieren. Zusätzlich wurde eine Kopie entdeckt (Curi_c28980), die für die XdhC-Untereinheit kodiert, in dessen direkter Nachbarschaft auch Gene lokalisiert sind, die wichtig sind für die Synthese von akzessorischen Proteinen und Cofaktoren wie dem schon erwähnten Molybdän-Cofactor (Curi_c28990-29090). Eine weitere Kopie, welche für eine XdhA-Untereinheit (Curi_c19420) kodiert wurde in einem Cluster mit Genen für die δ - und γ -Untereinheit (Curi_c19430-19440) der Purin-Hydroxylase gefunden, welche die Hydroxylierung von Hypoxanthin zu Xanthin katalysiert (Andreesen, 2005).

Etwas anders läuft die Umwandlung zu Xanthin ab, wenn Guanin als Substrat verwendet wird. Hier wird nicht die Xanthin-Dehydrogenase aktiv, sondern das Enzym Guanin-Deaminase (Curi_c00270, Curi_c19450). Es wurde 1944 das erste Mal von Hitchings und Falco beschrieben und später von Rakosky und Beck weiter charakterisiert (Rakosky & Beck, 1955; Rakosky et al, 1955).

Vom Xanthin weiterführend, wird die Purin-Struktur durch die Hydrolyse der Bindung zwischen dem Atom 1 und dem Atom 6 im Pyrimidin-Ring aufgebrochen und so 4-Ureido-5-Imidazol-Carboxylsäure gebildet (Rabinowitz & Pricer, 1956). Als katalysierendes Enzym wirkt hier die Xanthin-Amidohydrolase. In den folgenden Schritten wird 4-Ureido-5-Imidazol-Carboxylsäure über mehrere Zwischenprodukte zu Formiminoglycin umgewandelt (**Abb. 11**). Die dabei involvierten Enzyme wie 4-Ureido-5-Imidazolcarboxylat-Amidohydrolase, 4-Aminoimidazol-Deaminase oder 4-Imidazonase wurden in *C. cylindrosporum* und teilweise auch in *C. acidurici* 9a zwar experimentell nachgewiesen (Pricer & Rabinowitz, 1956; Rabinowitz & Pricer, 1956), jedoch nie sequenziert, so dass bis jetzt keine verfügbare Nukleotid- oder Aminosäuresequenz existiert. Dementsprechend konnten die dafür kodierenden potentiellen Gene im Genom von *C. acidurici* 9a nicht identifiziert werden. Aus dem gleichen Grund konnte auch das Glycin-Formiminotransferase-kodierende Gen nicht auffindig gemacht werden, welches die anschließende Dekomposition von Formiminoglycin zu Glycin, einem der wichtigsten Zwischenprodukte, mit Hilfe von Tetrahydrofolat katalysiert. Der weitere Abbau dieser Aminosäure bis hin zum Endprodukt Acetat soll im nächsten Kapitel näher erläutert werden (siehe **3.3.2**).

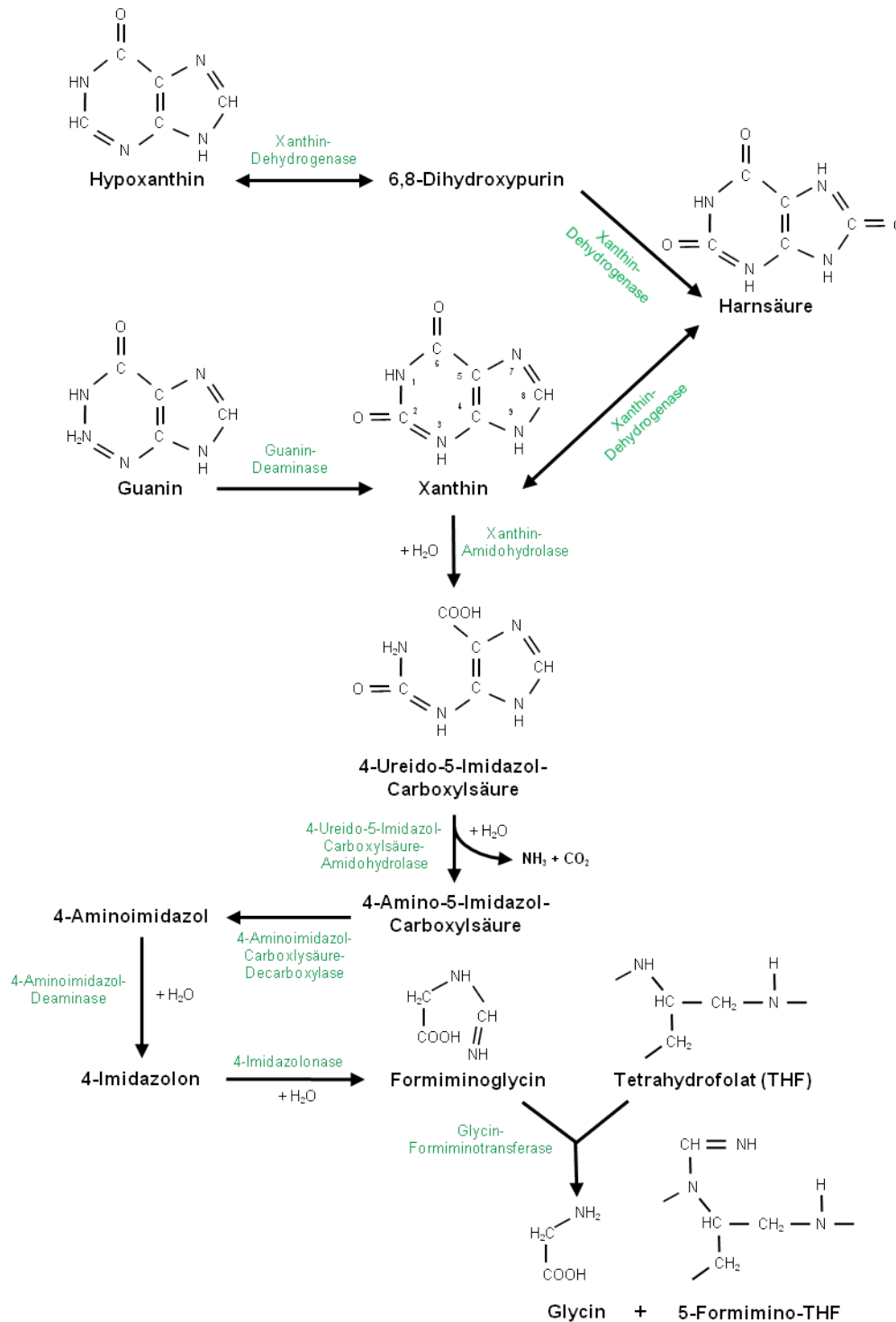


Abb. 11: Abbau von Purinen zu Glycin in purinolytischen Clostridien.

Dargestellt ist der Abbau verschiedener Purine über diverse Zwischenprodukte bis hin zu Glycin (modifiziert nach (Vogels & Van der Drift, 1976)), wie es für *C. cylindrosporium* und teilweise für *C. acidurici* experimentell bestimmt wurde (Pricer & Rabinowitz, 1956; Rabinowitz & Pricer, 1956). Wichtige Substrate und Zwischenprodukte sind mit ihrer jeweiligen Strukturformel dargestellt. Die katalysierenden Enzyme sind in grün abgebildet.

3.3.2 Abbau von Glycin als Zwischenprodukt der Purinverwertung

Prinzipiell existieren in den purinolytischen Clostridien zwei bekannte Wege, um während der Purinverwertung Glycin in Acetat umzuwandeln. Als erster von beiden wurde der Glycin-Serin-Pyruvat-Weg entdeckt (Sagers & Gunsalus, 1961). Dabei wird Glycin zu Methylen-THF oxidiert (decarboxyliert), welches mit einem zweiten Glycin-Molekül zu Serin kondensiert. Der letzte Schritt geschieht mit Hilfe des Enzyms Serin-Hydroxymethyltransferase. Das entsprechende Gen *glyA* konnte im Genom von *C. acidurici* 9a identifiziert werden (Curi_c17240). Serin wird daraufhin mit Hilfe der L-Serin-Dehydratase (*sdhA/sdhB*, Curi_c17690-17700) zu Pyruvat deaminiert und die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (*por1/por2*, Curi_c20330, Curi_c21330) katalysiert anschließend die Umsetzung zu Acetyl-CoA und CO₂. Im nächsten Schritt transferiert die Phosphotransacetylase (Curi_c12550) reversibel die Acetyl-Einheit vom CoA zu Phosphat und das Endprodukt Acetat wird mit Hilfe des Enzyms Acetatkinase (Curi_c16390) aus dem daraus resultierenden Acetylphosphat gebildet. Generell werden bei dem Glycin-Serin-Pyruvat-Weg 4 Glycin zu 3 Acetat, 2 CO₂ und 4 NH₃ umgewandelt. Zusätzlich entsteht 1 ATP. Eine Übersicht der wichtigsten Schritte ist in **Abbildung 12** dargestellt. Das aus der Decarboxylierung von Pyruvat entstandene CO₂ kann teilweise wieder zu Methylen-THF zurück konvertiert werden, welches anschließend wiederum für Kondensationen mit weiteren Glycin-Molekülen zur Verfügung steht. Ein wichtiges Element dieses ganzen Abbauweges ist der Multienzymkomplex der Glycin-Decarboxylase/Synthase. Als Glycin-Decarboxylase katalysiert er die Oxidation von Glycin zu CO₂, Methylen-THF, NH₃ und NAD(P)H. Die Synthase-Funktion in die Gegenrichtung ist auch möglich, wobei Glycin synthetisiert wird und durch Methylen-THF ein Pool an C1-Einheiten generiert werden kann (Andreesen, 1994b). Im Normalfall besteht dieser Enzymkomplex aus vier Untereinheiten, die auch alle im Genom von *C. acidurici* 9a identifiziert wurden: eine Aminomethyltransferase (*gcvT*, Curi_c00740), ein hitzestabiles Systemprotein (*gcvH*, Curi_c00750), eine Glycin-Decarboxylase, welche aus einem α 2/ β 2-Tetramer besteht (*gcvPA/gcvPB*, Curi_c00760-00770) und eine separat lokalisierte Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (Curi_c09790). Letztere ist in anderen Organismen wie *E. coli* nicht nur Bestandteil der Glycin-Decarboxylase/Synthase, sondern unter anderem auch der Pyruvat-Dehydrogenase und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Cronan & La Porte, 1996). Bei der

Reaktion von Formiminoglycin und THF zu Glycin entsteht nebenher auch 5-Formimino-THF. In diesem zweiten Arm des Reaktionsweges (**Abb. 12**) wird im Endeffekt CO_2 mit Hilfe des Enzyms Formiat-Dehydrogenase (*fdhA/fdhB*, Curi_c16670/Curi_c16640 und *fdhF*, Curi_c29370-29380) aus Formiat gebildet. Die Rückreaktion ist genauso möglich und CO_2 kann in diesem Fall über Glycin und Serin zu Acetat umgewandelt werden (**Abb. 12**; Glycin-Weg), was wiederum durch das Glycin-Synthase-System ermöglicht wird (Vogels & Van der Drift, 1976).

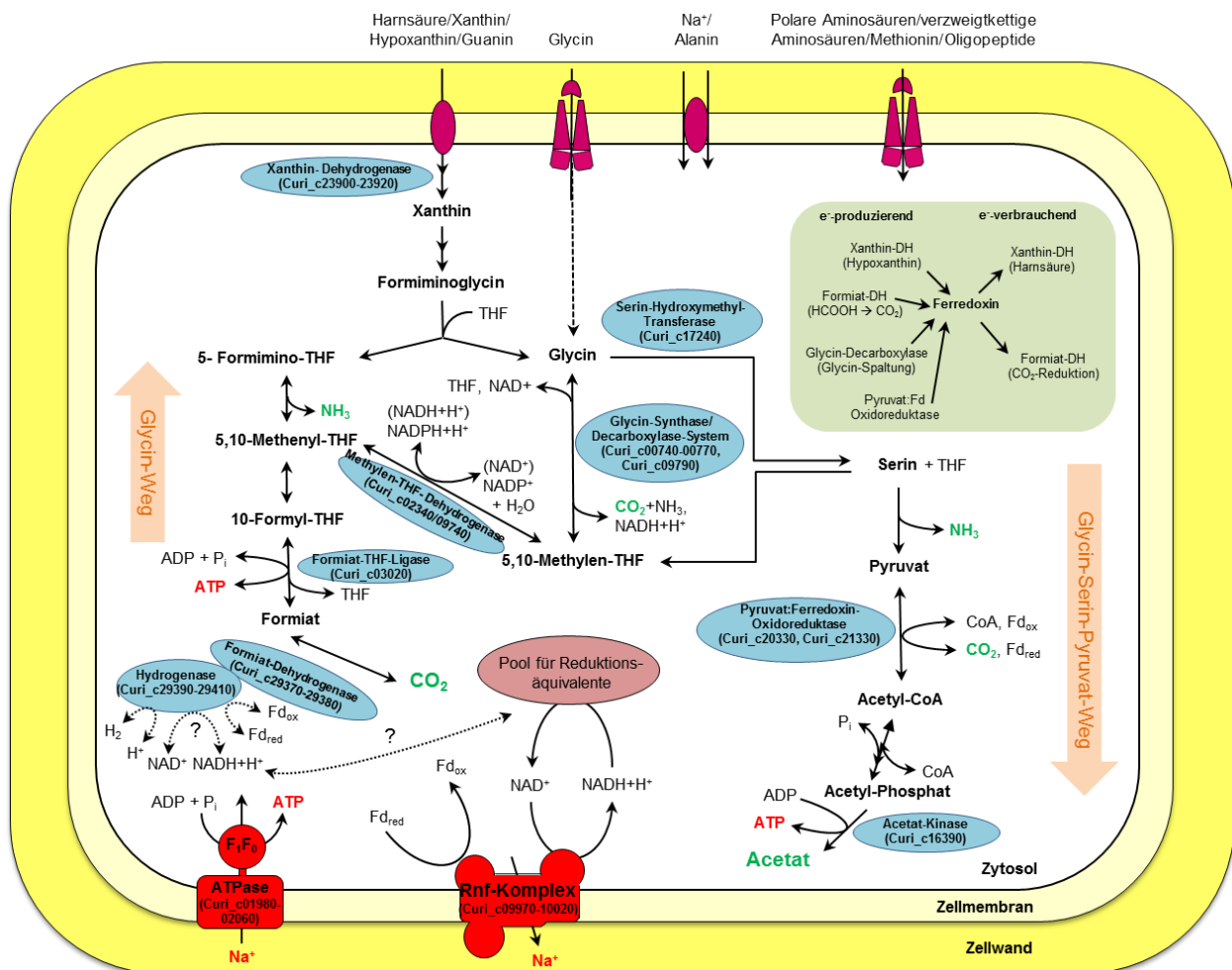


Abb. 12: Wichtige metabolische Pfade involviert im Purinabbau von *C. acidurici* 9a.

Dargestellt ist ein Genom-basiertes Modell wichtiger metabolischer und energetischer Schritte während der Purinverwertung in *C. acidurici* 9a. Für den Vorgang relevante Enzyme sind in blauen Ellipsen hervorgehoben, Endprodukte in grünen Buchstaben. Elektronen-verbrauchende oder -produzierende Schritte, in die Ferredoxin involviert ist (hellgrüne Box) wurden modifiziert nach Vogels und van der Drift (Vogels & Van der Drift, 1976). Fd = Ferredoxin; ox = oxidiert; red = reduziert; THF = Tetrahydrofolat; ? = unbekannt

Es konnten vier potentielle Gene identifiziert werden, die für Formiat-Dehydrogenasen kodieren. Während *fdhA* und *fdhB* für zwei Untereinheiten einer NAD⁺-abhängigen Formiat-Dehydrogenase kodieren (Curi_c16670/Curi_c16640), stellen die Genprodukte von *fdhF1* und *fdhF2* jeweils eine eigenständige Formiat-Dehydrogenase H dar (Curi_c29370-2938). Die Gene *fdhB* und *fdhF2* kodieren außerdem für die Selenoprotein-Varianten der Formiat-Dehydrogenase, die einzigen Selenoproteine, die im Genom identifiziert werden konnten.

In Anwesenheit von Selenit wird in Organismen wie *C. purinilyticum* statt des Glycin-Serin-Pyruvat-Weges der zweite, energetisch günstigere Weg der Glycin-Reduktase eingeschlagen (Dürre & Andreesen, 1982b; Dürre & Andreesen, 1983). Glycin wird dabei direkt zu Acetat über eine Selen-abhängige Glycin-Reduktase reduziert. Im Endeffekt werden über diesen Weg 4 ATP generiert. Die dafür benötigten Reduktionsäquivalente werden dabei wie auch im Glycin-Serin-Pyruvat-Weg von der vollständigen Oxidation eines Glycin-Moleküls durch das Glycin-Decarboxylase/Synthase-System zur Verfügung gestellt. In den purinolytischen Clostridien *C. cylindrosporum* und *C. purinilyticum* konnte eine Aktivität der Glycin-Reduktase experimentell bestätigt werden (Dürre & Andreesen, 1983). In diesen beiden Organismen wird der Glycin-Serin-Pyruvat-Weg eher als eine Art Notversorgung im Falle von Selenmangel benutzt (Dürre & Andreesen, 1982b; Tanaka & Stadtman, 1979). Es wurde immer vermutet, dass *C. acidurici* 9a den gleichen Weg einschlägt und bei ausreichender Selen-Versorgung ebenfalls die Glycin-Reduktase einsetzt. Die Glycin-Reduktase setzt sich aus mindestens drei Proteinen zusammen, die Selenoprotein A, Selenoprotein B und Protein C genannt werden (Andreesen, 1994a). Beim Selenoprotein B handelt es sich um ein Substrat-spezifisches Enzym, so dass diese Komponente in den Enzymen Betain- und Sarkosin-Reduktase, deren Substrate statt Glycin dessen Derivate Betain und Sarkosin sind, jeweils ein anderes ist. Selenoprotein A wird von dem Gen *grdA* kodiert und stellt die zentrale Komponente der Glycin-Reduktase dar, da es zentral mit allen weiteren Komponenten in Aktion tritt. Das Selenoprotein B wird von den Genen *grdB* und *grdE* kodiert und bindet das Substrat Glycin kovalent unter Ausbildung einer Schiff'schen Base (Andreesen, 1994a). Durch eine Umetherung entsteht am Selenoprotein A ein Carboxymethylselenoether, der durch gemeinsame Kathalyse des Selenoproteins A und des Proteins C, welches von den Genen *grdC* und *grdD* kodiert wird, in einen Acetylthioester überführt wird (Poehlein, 2008). Durch Phosphorylyse dieses Acetylthioesters wird Acetylphosphat freigesetzt, welches wiederum mit Hilfe des Enzyms Acetat-Kinase zu Acetat und ATP umgesetzt wird. Im Genom von *C. acidurici* 9a konnten jedoch keine potentiellen Gene

identifiziert werden, die für eines der drei Proteine der Glycin-Reduktase kodieren, so dass dieser Weg vermutlich nicht von *C. acidurici* 9a genutzt werden kann.

3.3.3 Untersuchung von Glycin als Substrat

Wie bereits erwähnt, wurden für *C. acidurici* neben Purinen auch verschiedene Aminosäuren als Substrat getestet (Barker & Beck, 1942), was jedoch zu keinem Wachstum führte. Auch der Abbau oder Transport in die Zelle konnte nicht gemessen werden. Die einzige Aminosäure, die von *C. acidurici* verwendet werden und eine definitive Abnahme der Konzentration im Medium über einen bestimmten Zeitraum gemessen werden konnte, war Glycin. Wachstum fand jedoch ausschließlich in der Gegenwart von zusätzlicher Harnsäure statt (Barker & Beck, 1942). Der Import von Glycin in die Zelle erfolgt wahrscheinlich über ein ABC-Transportsystem und benötigt Natrium-Ionen und metabolisch generierte Energie aus Harnsäure oder Xanthin (Chen, 1975). In *C. acidurici* 9a wurde ein Cluster aus drei Genen identifiziert (Curi_c10180-10200), die vermutlich für solch einen Glycin/Betain ABC-Transporter kodieren. Die Umsetzung des externen Glycins erfolgt anschließend über Serin und Pyruvat zu Acetat wie bereits im Glycin-Serin-Pyruvat-Weg beschrieben (siehe 3.3.2).

3.3.3.1 Wachstumsversuche in Glycin-haltigem Medium

Um die Verwertung von Glycin genauer zu betrachten, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Das Medium enthielt dabei 100 mM Glycin und von 0 bis 12 mM variierende Konzentrationen an Harnsäure. Es wurde zwischen adaptierten und nicht adaptierten Kulturen unterschieden, d.h. die Vorkulturen für den Hauptversuch waren entweder durch wiederholtes Wachstum in Glycin-haltigem Medium schon an Glycin gewöhnt oder sie wurden direkt von Harnsäure-Medium auf Glycin-Medium umgesetzt, so dass noch keine Adaption stattgefunden hatte. Medium mit 100 mM Glycin ohne Harnsäure diente als Negativkontrolle. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 12 h photometrisch überprüft und die optische Dichte (OD_{600nm}) halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die daraus resultierenden Wachstumskurven sind

in **Abbildung 13** dargestellt. Es wird dabei ein signifikanter Unterschied zwischen adaptierten und nicht-adaptierten Zellen deutlich. Die nicht adaptierten Zellen zeigten eine deutlich längere *lag*-Phase, wenn sie von Harnsäure-Medium direkt auf Glycin-haltiges Medium umgesetzt wurden, als die bereits adaptierten Zellen, die schon auf Glycin im Medium eingestellt waren. Dementsprechend verschoben sich auch die anderen Wachstumsphasen und die stationäre Phase wurde erst etwa 2 h später erreicht als bei einem Wachstum ohne Glycin. Generell erreichten die unangepassten Zellen bei Wachstum mit Glycin auch nicht die gleiche maximale OD_{600nm} wie Zellen in Medium ohne Glycin. Bei 12 mM Harnsäure im Medium wurde eine maximale OD_{600nm} von 0,76 erreicht, während bei der Anwesenheit von Glycin nur eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht wurde. Für die geringeren Konzentrationen sah es ähnlich aus, so dass bei der niedrigsten Harnsäurekonzentration eine maximale OD_{600nm} von 0,26 ohne Glycin und 0,17 mit Glycin gemessen werden konnte. Bei adaptierten Zellen relativierte sich dieses und es waren keine konkreten Unterschiede zwischen dem Wachstum mit oder ohne Glycin sichtbar. Interessanterweise, zeigte sich jedoch, dass die maximal erreichte OD_{600nm} mit der Konzentration an Harnsäure im Medium korrelierte. Je weniger Harnsäure im Medium, desto geringer war die maximale OD_{600nm} . Dabei machte es keinen Unterschied, ob Glycin im Medium vorhanden war oder nicht, da kein Anstieg oder Abfall der optischen Dichte durch die Zugabe von Glycin zu beobachten war.

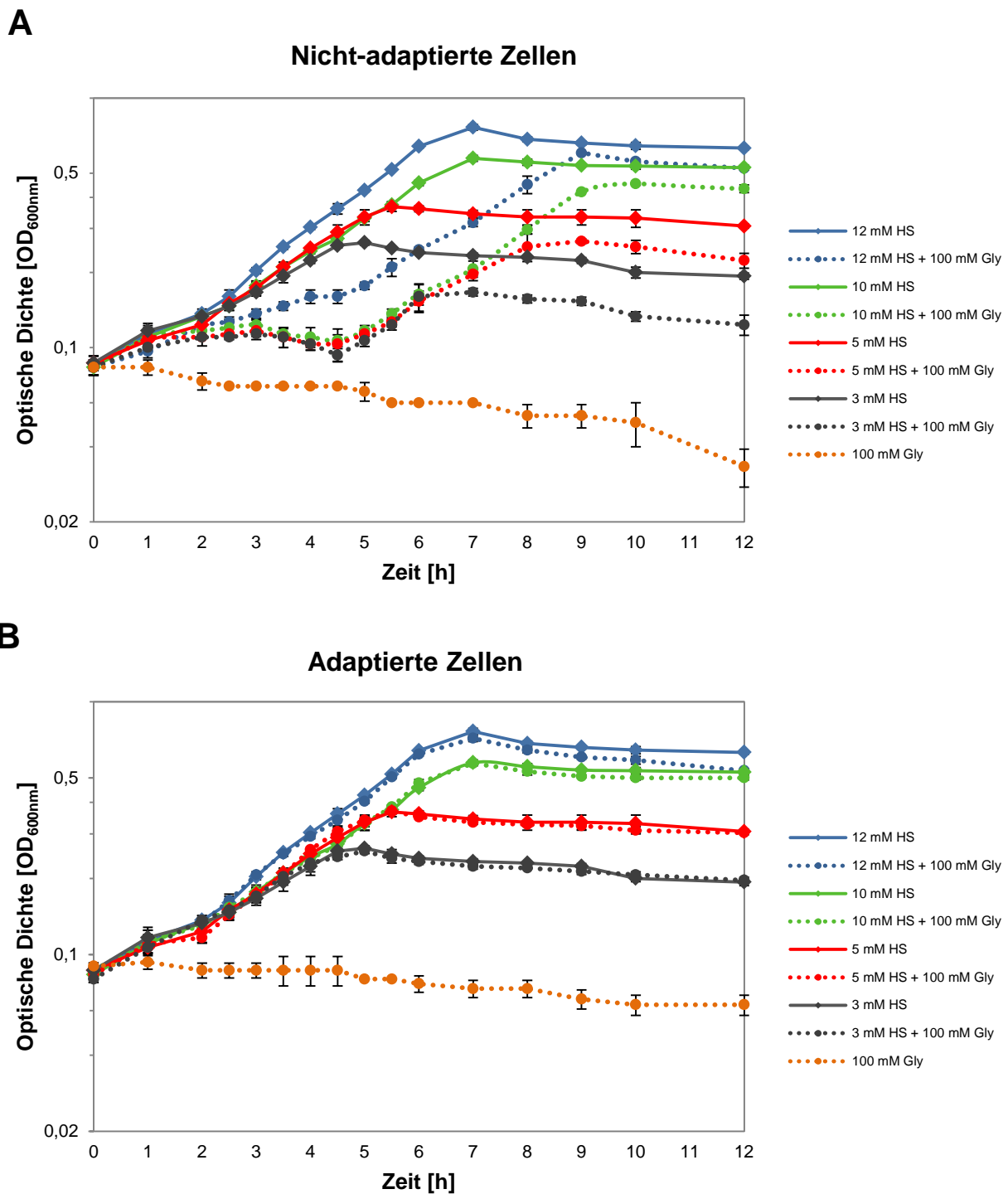


Abb. 13: Wachstum auf Harnsäure und Glycin mit adaptierten und nicht-adaptierten Zellen.

Das Wachstum von Kulturen von *C. acidurici* 9a wurde über 12 h in Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Harnsäure (HS) mit (gestrichelte Linien) oder ohne (durchgezogene Linien) Glycin (Gly) verfolgt. Medium mit 100 mM Glycin ohne Harnsäure diente als Negativkontrolle. Es wurden einerseits nicht-adaptierte Zellen verwendet (**A**), die direkt von Harnsäure-Medium auf Glycin-haltiges Medium umgesetzt wurden und andererseits bereits adaptierte Zellen (**B**), welche vorher schon in Glycin-haltigem Medium (12 mM Harnsäure, 100 mM Glycin) gewachsen waren. Die optische Dichte (OD_{600nm}) wurde photometrisch in drei Parallelkulturen bestimmt und halblogarithmisch gegen die Zeit (h) aufgetragen.

3.3.3.2 Transkriptionsanalyse von Genen des Glycin-Abbaus durch RT-PCR

Auch wenn die Zugabe von Glycin im Medium keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von adaptierten Zellen zeigte, sollte mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR eine Transkriptionsanalyse verschiedener Gene durchgeführt werden, die in den Abbau von Glycin zu Acetat involviert waren. Es sollte überprüft werden, ob die Zugabe von Glycin ins Medium einen Einfluss auf die Transkription der Gene ausübt. Es wurden dabei solche Gene ausgewählt, die für die Enzyme der wichtigsten Zwischenschritte kodieren (vgl. **Abb. 12**): die β -Untereinheit der Decarboxylase des Glycin-Synthase/Decarboxylase-Systems (*gcvPB*, Curi_c00770), die Serin-Hydroxymethyltransferase (*glyA*, Curi_c17240), die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (*por1/por2*, Curi_c20330/Curi_c21330), die Acetat-Kinase (*ackA*, Curi_c16390) und schließlich die Formiat-Dehydrogenase (*fdhA/fdhB*, Curi_c16670/Curi_c16640 und *fdhF1/fdhF2*, Curi_c29370-29380) als wichtiges Enzym des zweiten Abbauzweiges (Glycin-Weg) über Formyl-THF und Formiat zu CO₂ (vgl. **Abb. 12**). Für diesen Versuch wurden adaptierte Zellen verwendet, die in Medium mit Glycin und 3 mM, 5 mM, 10 mM oder 12 mM Harnsäure gewachsen waren. Geerntet wurde in Intervallen von 2 h, beginnend bei 1 h bis zu 9 h. Die Gesamt-RNA wurde isoliert (siehe **2.3.3**) und die Reinheit der RNA nach einem DNase-Verdau durch PCR überprüft. Da keine ersichtlichen Produkte gebildet wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass keine DNA-Kontamination vorhanden war.

Die RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe **2.4.9**) und diese als *template* in einer semi-quantitativen PCR mit 20 Zyklen und den entsprechenden Oligonukleotiden (**A.I., Tab. 13**) eingesetzt. Zur Analyse wurden die PCRs in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 14** dargestellt. Für alle Positivkontrollen mit DNA als *template* konnte ein Produkt erhalten werden, welches stets die gleiche Größe aufwies, wie die Produkte der PCR mit cDNA als *template*. Die Negativkontrollen lieferten, wie zu erwarten, kein Produkt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei sinkender Konzentration an Harnsäure auch die Transkriptionsstärke aller untersuchten Gene abnimmt, besonders im Bereich von 5-9 h. Dies gilt sowohl bei der Anwesenheit als auch der Abwesenheit von Glycin im Medium. Unterschiede in der Transkriptionsstärke werden erst sichtbar, vergleicht man Zellen, die mit oder ohne Glycin gewachsen waren, aber in gleicher

Harnsäure-Konzentration. Während für die Gene des Glycin-Serin-Weges *gcvPB*, *glyA*, *ackA* und *porA1* die Transkription zunimmt sobald Glycin anwesend ist, nimmt sie für die Gene der Formiat-Dehydrogenase *fdhB*, *fdhF1* und *fdhF2*, also des zweiten Zweiges des Glycin-Weges, ab. Eine weitere interessante Beobachtung konnte für die Gene *por2* und *fdhA* gemacht werden. Das zweite für die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase kodierende Gen *por2* wurde anscheinend überhaupt nicht transkribiert und das Gen *fdhA* für die alpha-Untereinheit der NAD⁺-abhängigen Formiat-Dehydrogenase nur sehr schwach. Dabei machte es keinen Unterschied, ob Glycin im Medium vorhanden bzw. wie hoch die Konzentration an Harnsäure war.

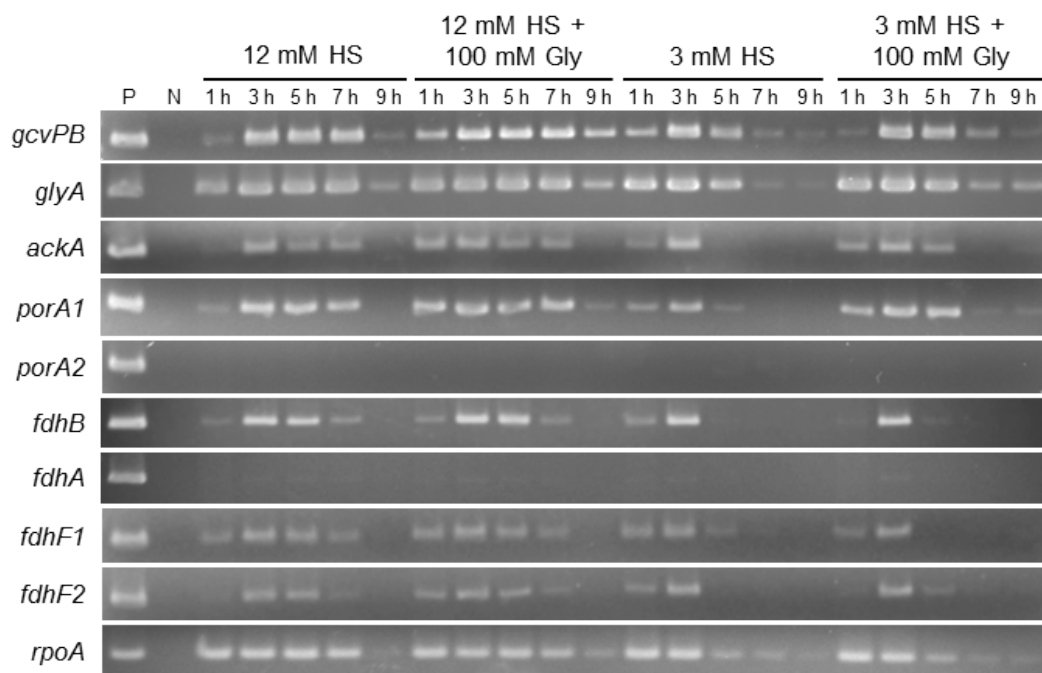


Abb. 14: Transkriptionsanalyse wichtiger Gene des Glycin-Abbaus.

Adaptierte Zellen von *C. acidurici* 9a wurden in Medium mit 12 mM oder 3 mM Harnsäure (HS) und mit oder ohne Glycin (Gly) angezogen und nach 1 h, 3 h, 5 h, 7 h und 9 h Wachstum geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und anschließend eine semi-quantitative RT-PCR zur Analyse der Transkription von Genen durchgeführt, die für Enzyme mit einer wichtigen Rolle bei der Umwandlung von Glycin zu Acetat spielen. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Gene der beta-Untereinheit der Glycin-Decarboxylase (*gcvPB*), der Serin-Hydroxymethyltransferase (*glyA*), der Acetat-Kinase (*ackA*), der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (*porA1*, *porA2*) und der Formiat-Dehydrogenase (*fdhA*/*fdhB*, *fdhF1*, *fdhF2*). Das *House-Keeping*-Gen *rpoA*, welches für die alpha-Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert, diente als Referenz. Als Positivkontrolle wurde DNA als *Template* für die PCR-Reaktion eingesetzt, als Negativkontrolle H₂O.

3.3.4 Zucker als Substrat

3.3.4.1 Wachstumsversuche mit verschiedenen Hexosen und Pentosen

In den frühen Studien zu *C. acidurici* 9a von Barker und Beck (Barker & Beck, 1942) wurde auch versucht, Glukose als Substrat zu verwenden. Als kein Wachstum erfolgte, wurde zusätzlich, ähnlich zu den Wachstumsexperimenten mit Glycin, Harnsäure in geringen Mengen hinzugefügt, so dass geringes Wachstum sichtbar wurde. Anders als bei den Versuchen mit Glycin, konnte aber auch nach mehreren Stunden Inkubation kein Abbau der Glukose im Medium festgestellt werden, so dass man davon ausging, dass Zucker, anders als Glycin, nicht als Substrat verwendet werden können. Interessanterweise, ergab die Annotation des Genoms von *C. acidurici* 9a, dass dieser Organismus genetisch vollständig ausgestattet ist, um Glykolyse zu betreiben. Neben den Genen, die auch in die Richtung der Glukoneogenese wirken können (**Abb. 15**), wurden auch Gene identifiziert, die für die Schlüsselenzyme Phosphofruktokinase (Curi_c20210) und Pyruvat-Kinase (Curi_c20200) kodieren, welche spezifisch für die Richtung der Glykolyse sind (**Abb. 15**). Auch Gene, die für Enzyme des Pentosephosphat-Weges kodieren wurden entdeckt, wie die Transaldolase (Curi_c01790), die Ribulosephosphat-3-Epimerase (Curi_c16760) und die Ribosephosphat-Pyrophosphokinase (Curi_c23850). Das Gen für das Schlüsselenzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase konnte jedoch nicht identifiziert werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob Gene im Genom vorhanden waren, die für Enzyme von Transportsystemen für Zucker kodieren, damit die Voraussetzungen eines Imports der Zucker gegeben waren. Dabei konnten zwar zwei Gene identifiziert werden, die für ein Hpr Phospho-Carrier-Protein (Curi_c20230) und eine EIIC-Komponente eines Phosphotransferasesystems (Curi_c00230) kodieren, aber es wurden weder potentielle Kandidatengene für die anderen Untereinheiten des substratspezifischen Enzyms II noch für das substratunspezifische Enzym I gefunden. Da die Voraussetzungen für Glykolyse jedoch gegeben waren, sollte untersucht werden, ob *C. acidurici* 9a mit anderen Hexosen als Glukose oder Pentosen als Substrat Wachstum zeigt. Dafür wurden 2 M Stocklösungen von Glukose, Fruktose, Galaktose, Sucrose, Ribose und Ribulose hergestellt und 30 mM bzw. 100 mM in Medium ohne Harnsäure eingesetzt.

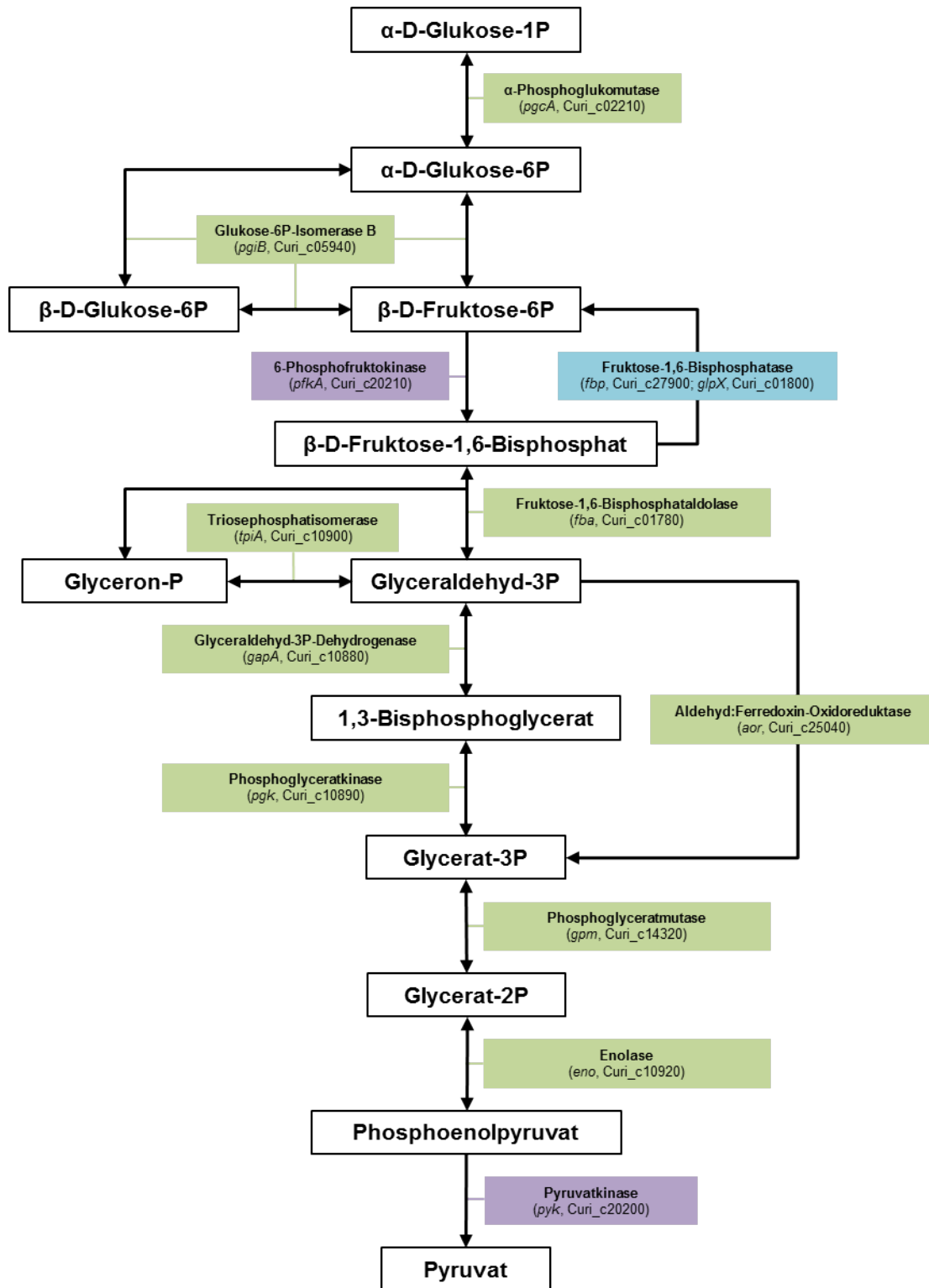


Abb. 15: Glykolyse und Glukoneogenese.

Dargestellt ist ein grober Überblick über die Intermediate (weiß) und involvierten Enzyme der Glykolyse und Glukoneogenese (grün). Schlüsselenzyme der Glykolyse sind in violett dargestellt, Schlüsselenzyme der Glukoneogenese in blau. Zu jedem Enzym sind zusätzlich das entsprechende in *C. acidurici* 9a identifizierte Gen und der Locus-Tag angegeben.

Da Harnsäure *C. acidurici* 9a auch als Stickstoffquelle dient und Zucker hier keinen Ersatz zur Harnsäure bieten, wurde dem Medium außerdem noch 2,3 mM Ammoniumsulfat hinzugefügt. Die OD_{600nm} wurde über 48 h hinweg alle 2 h spektrophotometrisch gemessen. Da auch nach 48 h keine Steigung der OD_{600nm} festgestellt werden konnte, wurde über eine weitere Woche hinweg einmal täglich eine Messung durchgeführt. Da hier ebenfalls kein Wachstum bestimmt werden konnte, sondern die OD_{600nm} tatsächlich sogar noch weiter absank, wurde davon ausgegangen, dass auch eine längere Inkubation keinen Erfolg bringen würde. Durch mikroskopische Untersuchungen konnte allerdings festgestellt werden, dass zwar keine Teilung der Zellen stattgefunden hatte, zumindest aber Sporen gebildet werden konnten. Zur Überprüfung wurden Kulturen, die bereits fünf Tage in Zucker-haltigem Medium inkubiert worden waren zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 ml abgenommen und das „Pellet“ darin resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend bei 100 °C für 12 min erhitzt, um sicher zu gehen, dass keine vegetativen Zellen mehr vorhanden waren und dann in frisches Harnsäure-Medium inokuliert. Bereits nach 3 h wurde Wachstum wieder sichtbar, so dass das Vorhandensein von Sporen bestätigt werden konnte.

3.3.4.2 Transkriptionsanalysen von Genen der Glykolyse durch RT-PCR

Da kein Wachstum von *C. acidurici* 9a mit Zucker als Substrat beobachtet werden konnte und auch keine Gene für potentielle Zucker-Transportsysteme identifiziert wurden, sollte die Transkription von Genen, die in die Glykolyse involviert sind anhand einer semi-quantitativen RT-PCR überprüft werden. Es lag die Vermutung nahe, dass die Gene zwar alle vorhanden waren, aber vor allem die Schlüsselgene der Glykolyse, welche nicht zur Glukoneogenese benötigt werden, während des Wachstums mit Harnsäure als Substrat stillgelegt sind und nicht transkribiert werden. Um dies zu überprüfen wurden Kulturen von *C. acidurici* 9a nach 5 h Wachstum in Harnsäure-Medium geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und Reste von DNA durch einen Verdau mit DNase entfernt (siehe 2.3.3). Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und diese als *template* in einer semi-quantitativen PCR mit 20 Zyklen eingesetzt (siehe 2.5.1). Es wurden dabei spezifische Oligonukleotide (A.I., Tab. 13) für die PCR-Reaktion verwendet, die in Bereichen der Gene für die Phosphofruktokinase, der

Enolase, der Glyceraldehyd-3P-Dehydrogenase, der 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase, der Phosphoglukomutase, der Pyruvatkinase und der Fruktose-1,6-Bisphosphatase binden. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert (**Abb. 16**).

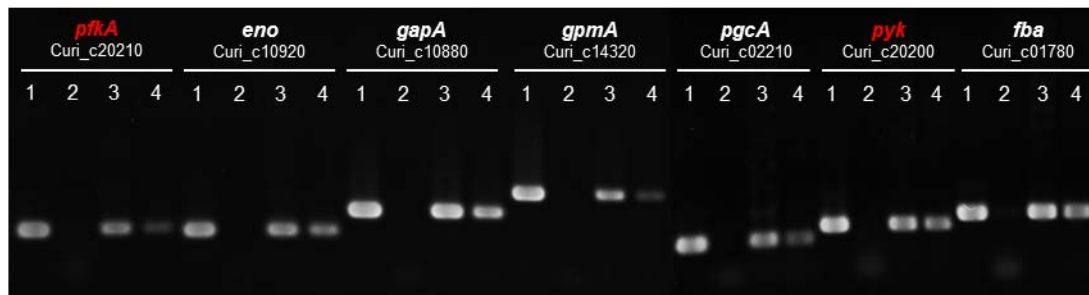


Abb. 16: Transkriptionsanalyse von Genen der Glykolyse in *C. acidurici* 9a.

Dargestellt sind die durch RT-PCR mit 30 Zyklen (3) und im Vergleich zur semi-quantitativen Analyse mit 20 Zyklen (4) amplifizierten Produkte und ihre entsprechenden Genbereiche und Lokus-Tags. Die Positivkontrolle (1) wurde mit DNA als *Template* durchgeführt, die Negativkontrolle (2) mit H₂O. Die Gene für die Schlüsselenzyme der Glykolyse sind in Rot dargestellt. *pfkA*: Phosphofruktokinase, *eno*: Enolase, *gapA*: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, *gpmA*: 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase, *pgcA*: Alpha-Phosphogöukomutase, *pyk*: Pyruvatkinase, *fba*: Fruktose-1,6-Bisphosphatase. Der Größenstandard wurde nicht mit aufgeführt, die Produkte liegen aber alle bei einer Größe von 200-450 bp. Die Abbildung wurde aus zwei Gelbildern zusammengestellt.

Dabei wurde deutlich, dass für alle untersuchten Gene der Glykolyse inklusive derjenigen, die für die Schlüsselenzyme Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase kodieren, ein Produkt mit cDNA als *template* erhalten werden konnte, und anders als erwartet, bei Wachstum mit Harnsäure ohne die Zugabe von Zuckern bereits eine Transkription der Gene stattfand.

3.3.5 Energiehaushalt und -konservierung

Generell kann Energie während des Wachstums auf Purinen von *C. acidurici* 9a aus mehreren Schritten gewonnen werden. Einer besteht aus der Hydrolyse von Methenyl-THF zu 10-Formyl-THF (siehe **Abb. 12**), wobei ATP und Formiat durch die Reaktion von ADP mit 10-Formyl-THF gebildet werden (Rabinowitz, 1959). Desweiteren wird Energie aus der finalen Umwandlung von Acetyl-Phosphat und ADP zu Acetat und ATP durch das Enzym Acetat-Kinase erzeugt. Für beide enzymatischen Reaktionen konnten im Genom von *C. acidurici* 9a die entsprechenden

kodierenden Gene identifiziert werden. Das Gen *fhs* kodiert für die Formiat-THF-Ligase (Curi_c03020), das Gen *ackA* für die Acetat-Kinase (Curi_c16390). Wie auch schon für andere Clostridien und dem Homoacetogenen *A. woodii* beschrieben (Biegel et al, 2009; Fonknechten et al, 2010; Köpke et al, 2010; Schmidt et al, 2009), besitzt *C. acidurici* 9a neben den beiden oben genannten Schritten zusätzlich auch die Möglichkeit Energie per Elektronentransport-Phosphorylierung mit Hilfe des Rnf-Komplexes (Curi_c09970-10020) zu gewinnen. Dieser Enzymkomplex unterstützt den Fluss von Elektronen von reduziertem Ferredoxin zu NAD^+ , wodurch ATP chemiosmotisch über Ionen-Translokation entlang der Membran generiert wird. Zusätzlich konnten im Genom Gene identifiziert werden, die für eine F_1F_0 -ATPase kodieren (Curi_c01980-02060). Wachstumstests zur Abhängigkeit von *C. acidurici* 9a von Natrium-Ionen wurden nicht durchgeführt, aber es wurden Na^+ -bindende Aminosäure-Motive nach Rahlfs (Rahlfs & Müller, 1999) und Meier (Meier et al, 2006) identifiziert (**A.IX., Abb. 34**).

In *A. woodii* spielt diese Kopplung von Rnf-Komplex generiertem elektrogenem Na^+ -Transport mit der Produktion von ATP durch eine Na^+ -abhängige F_1F_0 -ATPase eine wichtige Rolle während des Wachstums auf H_2 und CO_2 mit Hilfe des Wood-Ljungdahl-Weges (Biegel et al, 2009; Poehlein et al, 2012; Schmidt et al, 2009). In acetogenen Bakterien wird der Wood-Ljungdahl-Weg benutzt, um Kohlenstoffmonoxid oder -dioxid zu fixieren und zu Acetyl-CoA zu konvertieren, was sie dazu befähigt, CO_2 als Elektronenakzeptor zu benutzen. Für *C. acidurici* 9a und die anderen purinolytischen Clostridien *C. cylindrosporum* und *C. purinilyticum* wurde alternativ der sogenannte Glycin-Weg identifiziert. Eine vergleichende Übersicht über beide Wege ist in **Abbildung 17** dargestellt. In den ersten Schritten ähnelt der Glycin-Weg stark dem Wood-Ljungdahl-Weg, weicht aber in den späteren Schritten davon ab (Dürre & Andreesen, 1982a; Thauer, 1972; Waber & Wood, 1979). Der erste Schritt, die Reduktion von CO_2 zu Formiat, wird durch das Enzym Formiat-Dehydrogenase katalysiert. Die meisten Formiat-Dehydrogenasen funktionieren nur in eine Richtung, daher ist das Enzym aus den purinolytischen Bakterien ziemlich einzigartig, da es in der Lage ist zusätzlich in die Gegenrichtung von CO_2 zu Formiat zu wirken (Andreesen, 1994b).

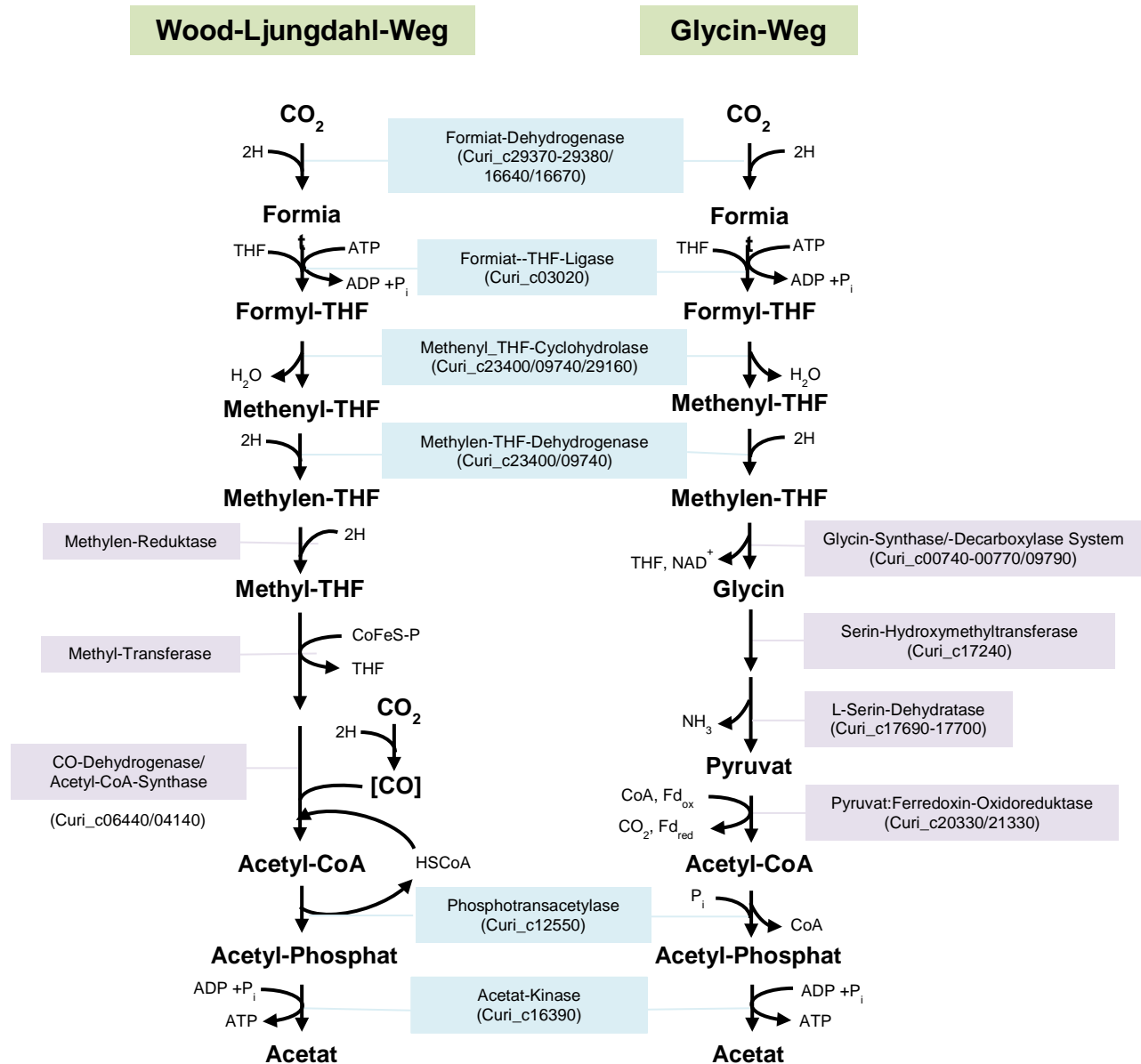


Abb. 17: Der Wood-Ljungdahl-Weg und der Glycin-Weg im Vergleich.

Dargestellt ist ein Vergleich zwischen dem Wood-Ljungdahl-Weg, wie er z.B. in *A. woodii* vorkommt und dem Glycin-Weg in *C. acidurici* 9a. Gemeinsame Enzyme sind in blauen Kästen dargestellt, unterschiedliche in violetten. Die Locus-tags für in *C. acidurici* 9a vorhandene Gene oder nur teilweise vorhandene Untereinheiten sind in Klammern unterhalb des entsprechenden Enzymnamen bzw. Kasten aufgeführt. Es ist zu beachten, dass einige Schritte des Glycin-Weges auch als Rückreaktion möglich sind, der Einfachheit halber aber nicht mit dargestellt wurden (Vergleich **Abb. 2** und **Abb. 11**).

Im Genom von *C. acidurici* 9a konnten, wie bereits erwähnt, vier Gene identifiziert werden (*fdhA*: Curi_c16640, *fdhB*: Curi_c16670, *fdhF1*: Curi_c29370, *fdhF2*: Curi_c29380), die für Formiat-

Dehydrogenasen kodieren, wobei die Gene *fdhA* und *fdhB* zusammen eine NAD⁺-abhängige Formiat-Dehydrogenase kodieren und die beiden Gene *fdhF1* und *fdhF2* jeweils für eine Formiat-Dehydrogenase H. Die beiden Gene, welche für die NAD⁺-abhängige Formiat-Dehydrogenase kodieren, liegen im Genom durch zwei Gene getrennt voneinander, welche für Proteine kodieren, die an der Biosynthese von Molybdopterin beteiligt sind (**Abb. 18**). Diese Lokalisierung ist sinnvoll, da die Formiat-Dehydrogenase ein Molybdän-abhängiges Enzym ist und Molybdän durch den Molybdopterin-Cofaktor komplexiert wird (Andreesen, 2005). Die Formiat-Dehydrogenase-H-kodierenden Gene clustern zusammen mit drei Genen, die für ein Protein kodieren, welches die größten Ähnlichkeiten zu einer eisenhaltigen Hydrogenase zeigte (*hydABC*: Curi_c23990-24010) (**Abb. 18**). Eisen-Hydrogenasen stellen ein lösliches Elektronenbifurkationssystem als Teil der Energiekonservierung in vielen Anaeroben dar und dienen der Reduktion von Ferredoxin und der damit verbundenen Überwindung der Elektronenbarriere (Poehlein et al, 2012). Neben dem *hydABC* Gen-Cluster wurden zusätzlich zwei unabhängig davon lokalisierte Gene gefunden, die für jeweils eine HydA-Untereinheit kodieren. Eins (*hydA1*: Curi_c05020) liegt in der Fremdgen-Region 1 (siehe **Abb. 3**), die auch die Vancomycin-Resistenz-vermittelnden Gene beherbergt und das andere (*hydA2*: Curi_c05750) ist direkt in einem Cluster von Genen lokalisiert, die in die Biosynthese von Cobalamin involviert sind (Curi_c05740-05800). Stromabwärts wurde zusätzlich das Gen *fdhD* (Curi_c29330) identifiziert, welches für ein akzessorisches Protein der Formiat-Dehydrogenase kodiert.

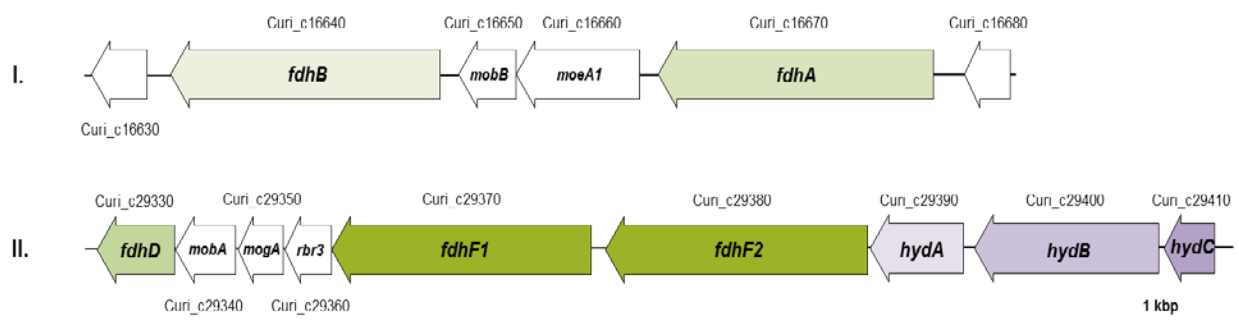


Abb. 18: Organisation und Lokalisierung der Gencluster der Formiat-Dehydrogenasen.

Cluster I: Die Gene *fdhA* und *fdhB* (Curi_c16640, Curi_c16670) kodieren für zwei Untereinheiten der NAD-abhängigen Formiat-Dehydrogenase und sind durch zwei Gene von einander getrennt, welche für Molybdopterin-Biosynthese-Proteine kodieren (Curi_c16650-16660). Cluster II: Die Gene *fdhF1* und *fdhF2* (Curi_c29370-29380), welche für die Formiat-Dehydrogenase H kodieren, sind zusammen in einem Cluster mit den Genen *hydA*, *hydB* und *hydC* (Curi_c29390-29410) lokalisiert, die für drei Untereinheiten einer eisenhaltigen Hydrogenase kodieren. Stromabwärts dazu ist das Gen *fdhD* (Curi_c29330) lokalisiert, welches für ein akzessorisches Protein der Formiat-Dehydrogenase kodiert. Formiat-Dehydrogenase-assoziierte Gene sind in Grüntönen dargestellt, Hydrogenase-assoziierte in Violettönen.

Nach der Umwandlung von CO₂ zu Formiat durch die Formiat-Dehydrogenase besteht der zweite Schritt des Glycin-Weges in der Generierung von Formyl-THF aus Formiat und THF. Diese Reaktion wird durch das Enzym Formiat-THF-Ligase (Curi_c03020) katalysiert und es muss ein ATP dafür verbraucht werden. Nach diesem Schritt trennt sich der Glycin-Weg vom Wood-Ljungdahl-Weg. Über mehrere THF-Intermediate und mit Hilfe des Glycin-Synthase-Systems, wird Glycin gebildet und über Serin und Pyruvat zu Acetat umgewandelt (siehe 3.3.2, Glycin-Serin-Pyruvat-Weg) (Champion & Rabinowitz, 1977).

Trotz der Nutzung des Glycin-Weges zur CO₂-Fixierung wurden im Genom von *C. acidurici* 9a Gene des Wood-Ljungdahl-Weges identifiziert. Unter anderem eine Untereinheit der CO-Dehydrogenase (*cooS*: Curi_c06440) und ein mögliches akzessorisches Protein der CO-Dehydrogenase (Curi_c04140). Potentielle Gene der restlichen Wood-Ljungdahl-Weg-spezifischen Proteine konnten allerdings nicht ausgemacht werden.

3.3.6 Intermediärmetabolismus

Da der Intermediärmetabolismus eines Organismus sehr umfangreich ist und viele Untergebiete umfasst, sollen hier nur die wichtigsten Merkmale und Stationen kurz erwähnt werden, die in *C. acidurici* 9a rekonstruiert werden konnten.

Wie die meisten anderen Anaeroben besitzt *C. acidurici* 9a keinen vollständigen Tricarbonsäure-Zyklus, ist aber in der Lage zumindest Teile davon zu biosynthetischen Zwecken zu verfolgen. Die (Re)-Citrat-Synthase aus *C. acidurici* konnte bereits 1968 teilweise isoliert und charakterisiert werden (Gottschalk, 1968). Das für dieses Enzym kodierende Gen (Curi_c11840) wurde im Genom von *C. acidurici* 9a in einem Cluster zusammen mit einem Gen identifiziert, welches für das Enzym Aconitase (Curi_c11850) kodiert. Das Gen für die Isocitrat-Dehydrogenase (Curi_c28890), dem dritten Enzym dieses Zweiges, ist nicht in diesem Cluster lokalisiert. Die (Re)-Citrat-Synthase gehört zu der Familie der Acyltransferasen und seine Substrate sind Acetyl-CoA, H₂O und Oxalacetat. Es katalysiert die Umwandlung zu Citrat und CoA (Gottschalk, 1968). Das Citrat wird von der Aconitase weiter zu Aconitat und Isocitrat konvertiert. Die Isocitrat-Dehydrogenase in *C. acidurici* 9a ist NADP⁺-abhängig und wandelt

Isocitrat über Oxalosuccinat zu 2-Oxoglutarat um, welches dann für weitere metabolische Schritte genutzt werden kann.

Glutamat kann direkt aus alpha-Ketoglutarat gebildet werden durch die Glutamat-Dehydrogenase (Curi_c02840) oder durch die Glutamat-Synthase über Glutamin und die Involvierung der Glutamin-Synthetase (Curi_c11850). Fumarat wird mit Hilfe der Aspartat-Aminotransferase (Curi_c15430) und die Argininosuccinat-Synthase und –Lyase synthetisiert. Die Gene, die für diese beiden Enzyme kodieren (Curi_c06890-06900) liegen zusammen in einem Cluster.

Mehrere Vertreter der Clostridien, unter anderem *C. tetanomorphum*, *C. perfringens* und *C. thermoaceticum*, produzieren Corrine in großen Mengen (Friedmann & Cagen, 1970; Oh-hama et al, 1988). Den allgemeinen Vorläufer der Corrin-Biosynthese und anderen Tetrapyrrolen stellt 5-Aminolävulinsäure dar. Es existieren zwei bekannte Wege für die Synthese von 5-Aminolävulinsäure. Einer davon ist der sogenannte C5-Weg. Es konnte im Genom von *C. acidurici* 9a die komplette genetische Ausstattung für diesen Weg identifiziert werden, in welchem 5-Aminolevulinsäure aus Glutamat gebildet wird. Gene, die für die Schlüsselenzyme Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase (*hemL*, Curi_c24630) und Glutamyl-tRNA-Reduktase (*hemA*, Curi_c24690) kodieren, konnten in einem Cluster zusammen mit den Genen *hemB*, *hemC* und *hemD* identifiziert werden, welche für Enzyme kodieren, die zur Synthese von Uroporphyrinogen-III aus 5-Aminolävulinsäure und Corrine wie das Coenzym B₁₂ (Curi_c24680-24950) benötigt werden. Dieses Cluster wird zwischendurch von einem Cluster an Genen unterbrochen, die für hypothetische Proteine kodieren (Curi_c24760-24880).

Gene zur Biosynthese von Häm konnten im Genom von *C. acidurici* 9a nicht identifiziert werden, was eine Unfähigkeit Cytochrome zu bilden vermuten lässt.

3.4 Genom-basierte Untersuchungen zu Resistenzen

Während der Annotation des Genoms von *C. acidurici* 9a wurden diverse Gene entdeckt, deren Genprodukte möglicherweise Resistenzen gegen verschiedene Stoffe vermitteln könnten. Hauptsächlich wurden dabei Gene für Antibiotika- und Metallresistenzen identifiziert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, inwiefern tatsächlich Resistenzen in *C. acidurici* 9a vorhanden sind und wie stark diese ausgeprägt sind.

3.4.1 Resistenz gegen Antibiotika und ähnliche antimikrobielle Substanzen

Neben Genen, die eine Rolle in der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Antibiotika spielen, wurden auch Gene identifiziert, deren Genprodukte möglicherweise für eine Resistenz gegenüber den antimikrobiellen Substanzen 4-Azaleucin und Acriflavin verantwortlich sind. Alle identifizierten Gene, sowie die entsprechenden Lokus-*tags* und Annotationen sind in **Tabelle 12** zusammengefasst.

Wachstumsversuche zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Antibiotika wurden bereits früher mit *C. acidurici* 9a durchgeführt (Schiefer-Ullrich et al, 1984). Da aber Unstimmigkeiten zwischen den Ergebnissen der damaligen Tests und den Genentdeckungen im Genom vorlagen, sollten eigene Wachstumsversuche mit den entsprechenden Antibiotika und noch ein paar zusätzlichen Substanzen durchgeführt werden. Dazu wurden anders als bei Schiefer-Ullrich et al. keine Agar-Diffusions-Tests mit Antibiotikaplättchen auf einem Bakterienrasen durchgeführt, sondern verschiedene Konzentrationen an Antibiotikum in flüssigem Harnsäure-Medium angesetzt und diese 10%ig mit *C. acidurici* 9a inokuliert (siehe **2.2.3** und **2.2.4**). Es wurden stets vier verschiedene Konzentrationen pro Antibiotikum getestet, wobei immer die vom Hersteller der Substanz empfohlene Standardkonzentration als Ausgangspunkt diente und noch jeweils zwei Konzentrationen unterhalb und eine oberhalb dieses Wertes gewählt wurden. Die genauen Werte sind **Tabelle 4** (siehe **2.2.3**) zu entnehmen. Das Wachstum wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm überprüft. Da das Wachstum von *C. acidurici* 9a unter Standardbedingungen in Harnsäure-Medium (siehe **2.2.4**) nach 6-7 h sein Maximum erreicht, erfolgte die erste Überprüfung in dieser Zeitspanne. Eine weitere Messung wurde jeweils nach 24 h und nach 48 h durchgeführt, um sicherzugehen, dass eine wirkliche Hemmung des Wachstums vorlag und nicht nur eine Verzögerung, hervorgerufen durch das Antibiotikum. Da dieses mit der Messung nach 48 h ausgeschlossen werden konnte und sich die optische Dichte in der Zeit nach 7 h nicht mehr erhöhte, wurden die Messwerte zu diesem Zeitpunkt als maßgeblich zur Bestimmung der Resistenz eingesetzt. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in **Abbildung 19** gegeben. Die genauen Messwerte sind im Anhang zu finden (**A.X., Tab. 22**).

Tab. 11: Antibiotika-Resistenzprotein-kodierende Gene von *C. acidurici* 9a.

Antibiotikum	Lokus-Tag	Gen	Annotation
Vancomycin	Curi_c05040		potentieller Vancomycin <i>Response</i> -Regulator
	Curi_c05050	<i>vanW</i>	Vancomycin B/G-Typ Resistenzprotein
	Curi_c05060	<i>vanG</i>	D-Alanin-D-Serine Ligase
	Curi_c05070	<i>vanXY</i>	D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase
	Curi_c05080	<i>vanT</i>	Serine-Typ Alanin /Serin Racemase
	Curi_c20140	<i>vanR</i>	Vancomycin <i>Response</i> -Regulator
	Curi_c20130	<i>vanS</i>	Vancomycin Sensor Histidin Kinase
	Curi_c20120	<i>vanY</i>	D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase
	Curi_c20090		potentielle D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase
	Curi_c20080		Protein der VanZ-Familie
Ampicillin	Curi_c00470	<i>blaI1</i>	Penicillinase Repressor
	Curi_c00480	<i>blaR1</i>	beta-Lactamase Regulatorprotein
	Curi_c26710		potentielle Metallo-beta-Lactamase
	Curi_c26740		potentieller Penicillinase Repressor
	Curi_c26750		potentielles beta-Lactamase Regulatorprotein
	Curi_c27160	<i>blaI2</i>	Penicillinase Repressor
	Curi_c27170	<i>blaR2</i>	beta-Lactamase Regulatorprotein
Bacitracin	Curi_c18920	<i>bacA</i>	Undecaprenyl-diphosphatase/Bacitracin Resistenzprotein
	Curi_c27290	<i>bcrA</i>	Bacitracin ABC-Transporter Permease-Protein
	Curi_c27280	<i>bcrB</i>	Bacitracin ABC-Transporter ATP-Bindeprotein
Chloramphenicol/Thiamphenicol	Curi_c07100	<i>cat1</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase
	Curi_c07640	<i>cat2</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase
	Curi_c15350	<i>cat3</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase
Erythromycin/Clarithromycin	Curi_c02730		potentielles Macrolid ABC-Transporter ATP-Bindeprotein
	Curi_c02740		potentielles Macrolid ABC-Transporter Permease-Protein
	Curi_c00630		potentielles Macrolid Exporter ATP-Binde-/Permease-Protein
Acriflavin	Curi_c03050		Effluxprotein der äußeren Membran
	Curi_c03060		RND-Familie Effluxtransporter, MFP Untereinheit
	Curi_c03070		Acriflavin Resistenzprotein
	Curi_c03080		TetR-Familie <i>Response</i> -Regulator
	Curi_c29460		Acriflavin Resistenzprotein
	Curi_c29470		RND-Familie Effluxtransporter, MFP Untereinheit
	Curi_c29480		TetR-Familie <i>Response</i> -Regulator
4-Azaleucin	Curi_c06580	<i>azlC1</i>	BC ¹ Aminosäure Permease/Azaleucin Resistenzprotein
	Curi_c25360	<i>azlC2</i>	BC Aminosäure Permease/Azaleucin Resistenzprotein
	Curi_c25250	<i>azlD</i>	BC Aminosäure Transportprotein/ Azaleucin Resistenzprotein

¹ BC = *branched-chain*

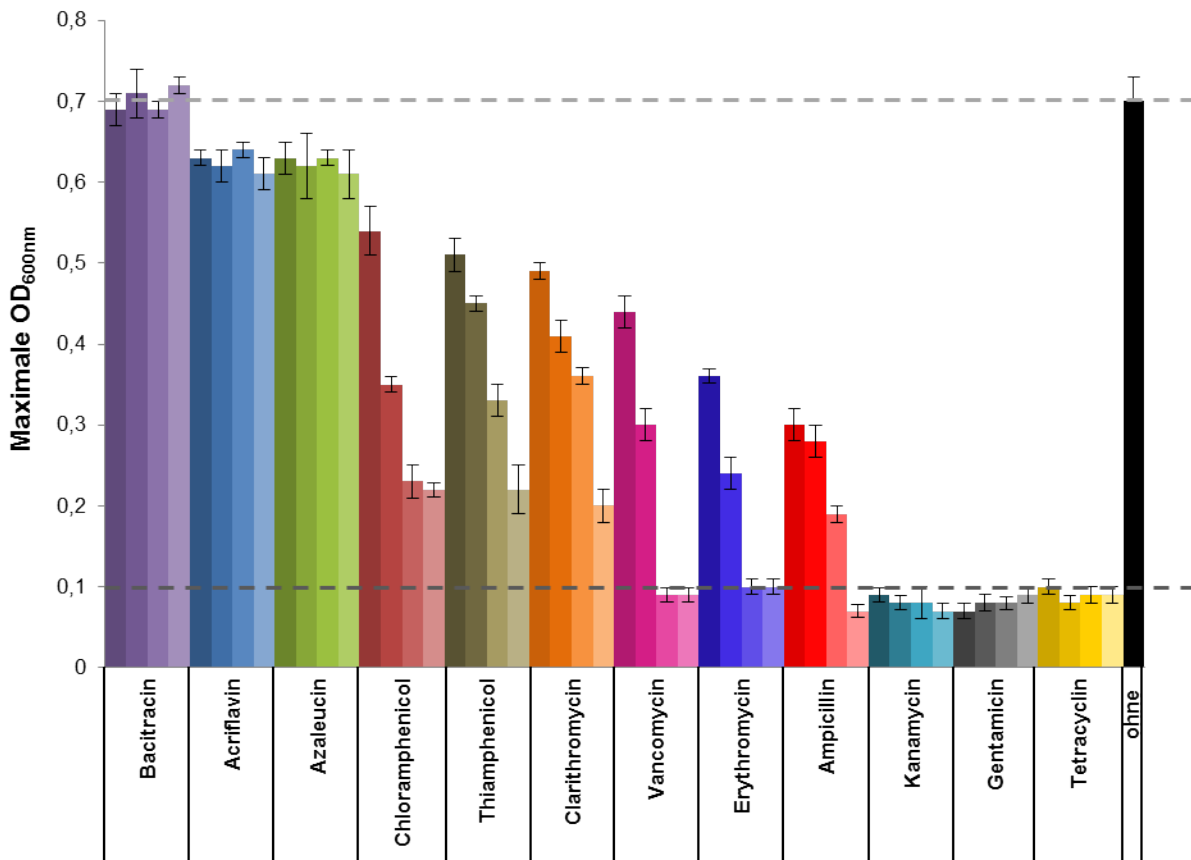


Abb. 19: Wachstum von *C. acidurici* 9a mit verschiedenen Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen.

Dargestellt ist die jeweils maximal erreichte OD_{600nm} nach 7 h Wachstum in 12 mM Harnsäure-Medium supplementiert mit Bacitracin (Violett-Töne), Acriflavin (Blau-Töne), Azaleucin (Grün-Töne), Chloramphenicol (Dunkelrot-Töne), Thiamphenicol (Braun-Töne), Clarithromycin (Orange-Töne), Vancomycin (Pink-Töne), Erythromycin (Royalblau-Töne), Ampicillin (Hellrot-Töne), Kanamycin (Türkis-Töne), Gentamicin (Grau-Töne) oder Tetracyclin (Gelb-Töne). Die Farbabstufungen innerhalb eines Antibiotikums symbolisieren die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen an Antibiotikum (Konzentrationen siehe 2.2.3). Je heller der Farbton, desto höher die Konzentration. Wachstum in 12 mM Harnsäure-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum diente als Referenz (schwarz). Gestrichelte Linien markieren die durchschnittliche OD_{600nm} nach dem Inokulieren zum Zeitpunkt 0 h (dunkelgrau) und die durchschnittliche OD_{600nm} bei Wachstum ohne Antibiotikum (hellgrau).

Es konnten im Genom von *C. acidurici* 9a keine potentiellen Gene identifiziert werden, die eine Resistenz gegen Kanamycin und Tetracyclin vermitteln. Eine Sensitivität gegenüber dieser beiden Antibiotika wurde bereits früher beschrieben (Schiefer-Ullrich et al, 1984) und konnte experimentell in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei keiner der verwendeten Konzentrationen wurde Wachstum festgestellt (**Abb. 19**). Gentamicin ist als Aminoglykosid in derselben Gruppe von Antibiotika anzusiedeln wie Kanamycin und weist daher durch die Behinderung des Ablesens der mRNA an den Ribosomen durch Blockierung der ribosomalen 30S-Untereinheit den gleichen Wirkmechanismus auf. Es sind drei Resistenzmechanismen gegen Aminoglykoside

bekannt: (1) der aktive Transport des Antibiotikums aus der Zelle heraus durch Efflux-Pumpen/Transporter, (2) spontane Mutation im Gen und dadurch Änderung des Zielproteins des Aminoglykosids und (3) enzymatische Inaktivierung des Aminoglykosids (Jana & Deb, 2006). Die enzymatische Inaktivierung/Modifizierung stellt dabei eine der wichtigsten Resistenzmechanismen dar (Shaw et al, 1993). Sie erfolgt durch drei Klassen von Enzymen, den Aminoglykosid-Acetyltransferasen, den Aminoglykosid-Nukleotidyltransferasen und den Aminoglykosid-Phosphotransferasen. Im Genom von *C. acidurici* 9a konnten weder potentielle Gene für eines der genannten Enzyme noch für andere Gene, die Resistenzen durch einen der anderen beiden Wirkmechanismen vermitteln identifiziert werden. Die hohe Sensitivität gegenüber Gentamicin (**Abb. 19**) bestätigte dies.

Ebenfalls ähnlich zu den Ergebnissen von Schiefer-Ullrich et al. konnte eine schwache Resistenz gegen Vancomycin festgestellt werden. Vancomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, das in einem weiten Feld von multiresistenten Gram-positiven Bakterien eingesetzt wird. Es hemmt den Aufbau der Zellwand durch Komplexbildung mit den L-Lysin-D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen des Zellwandbausteins Murein und blockiert so die Quervernetzung. In Vertretern der Gattung *Enterococcus* sind mittlerweile sechs Arten von Vancomycin-Resistenz bekannt (Courvalin, 2006). Alle laufen ähnlich ab, unterscheiden sich jedoch in der Zusammensetzung der Gen-Cluster. In *C. acidurci* 9a konnten zwei Cluster-Bereiche identifiziert werden, die Vancomycin-Resistenzgene enthalten. Das erste beherbergt Gene für das Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem VanR-VanS (Curi_c20130-20140), welches dafür verantwortlich ist, Vancomycin in der Zelle wahrzunehmen und daraufhin als transkriptioneller Aktivator zu wirken (Arthur et al, 1992). Ebenfalls in diesem Cluster lokalisiert ist das D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase-kodierende Gen *vanY* (Curi_c20120), dessen Genprodukt den D-Alanyl-D-Alanin-enthaltenden Peptidoglycan-Vorläufer hydrolysiert und somit die Bindung von Vancomycin an dieses Molekül verhindert. Etwas weiter stromaufwärts konnte ein weiteres Gen identifiziert werden, welches für VanY (Curi_c20090) kodiert und eines, das für ein VanZ-ähnliches Protein (Curi_c20080) kodiert. Das zweite große Cluster (Curi_c05040-05080) beinhaltet Gene, die für das Vancomycin B/G-Typ Resistenzprotein VanW, die D-Alanin-D-Serin Ligase VanG, die D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase VanXY und die Serin-Typ Alanin Racemase VanT kodieren. Ein zweites VanR-kodierendes Gen ist ebenfalls dort lokalisiert, aber das korrespondierende Gen für VanS fehlt. Wie bereits erwähnt, liegt dieses zweite Cluster an

Genen in einer Region, die als genomische Insel mit Fremdgenen identifiziert wurde (siehe **3.1.4**).

Wie auch für Vancomycin, konnte eine leichte Resistenz gegen das Zellwandsynthese-hemmende Antibiotikum Ampicillin ermittelt werden. Wachstum fand nur in einem mäßigen Umfang bis zu einer maximalen OD_{600nm} von 0,3 in Gegenwart der schwächsten Konzentration statt und wurde bei Konzentrationen ab 100 $\mu\text{g/ml}$ vollständig inhibiert. Es wurden mehrere Penicillinase Repressoren, beta-Lactamase Regulatoren und mögliche Metallo-beta-Lactamasen identifiziert (**Tab. 12**), die eine Resistenz vermitteln könnten, wenn auch nur in geringem Umfang. Chloramphenicol (Thiamphenicol) und Erythromycin (Clarithromycin), die wie Kanamycin in die Proteinsynthese eingreifen, wiesen nur leichte Effekte auf das Wachstum auf. Ein mäßiges bis gutes Wachstum konnte bei niedrigeren wie auch höheren Konzentrationen festgestellt werden. Als Resistenz-vermittelnde Gene wurden solche identifiziert, die für Chloramphenicol Acetyltransferasen kodieren (Curi_c07100, Curi_c07640, Curi_c15350) und für mögliche Macrolid ABC-Transportsysteme (Curi_c02730-02740, Curi_c00630).

Als sehr resistent erwies sich *C. acidurici* 9a gegen das Antibiotikum Bacitracin. Das Wachstum war stets unvermindert und vergleichbar zu Wachstum ohne Antibiotikum, auch bei Konzentrationen $>100 \mu\text{g/ml}$. Bacitracin gehört zu den Polypeptid-Antibiotika und greift durch Komplexbildung mit Undecaprenol-diphosphat in die bakterielle Murein-Biosynthese ein, so dass der Membrantransport der Mureinbausteine inhibiert wird. Im Genom von *C. acidurici* 9a wurden Gene für ein Bacitracin ABC-Transportsystem (Curi_c27280-27290) identifiziert, welches Bacitracin aus der Zelle exportiert und ein zusätzliches Gen für das Bacitracin Resistenzprotein BacA (Curi_c18920), dessen Rolle im Resistenzmechanismus noch nicht geklärt ist.

Wie schon erwähnt, wurden auch noch zwei zusätzliche antimikrobielle Substanzen getestet, da mögliche Resistenzgene gefunden wurden. Dies waren zum einen Gene für ein Acriflavin Resistenzsystem (Curi_c03050-03080, Curi_c29460-29480) und zum anderen solche für Azaleucin-Resistenzproteine/*branched-chain* Aminosäure Transportsysteme (Curi_c06580, Curi_c25350-25360). Acriflavin wird oft in wässrigen Lösungen als örtliches Antiseptikum zur äußerlich Anwendung oder oral als Harn-Antiseptikum verabreicht. Früher wurde es auch zur Behandlung von Gonorrhö eingesetzt, in neueren Zeiten aber von den Antibiotika abgelöst (Hassan et al, 2011). Azaleucin ist ein Analog der Aminosäure Leucin und kommt als natürliches Produkt in *Streptomyces neocaliberis* (Argoudelis et al, 1967) vor. Durch seine Inkorporation in

Proteine anstelle von Leucin, werden diese inaktiv und gleichzeitig die Biosynthese von Leucin, Isoleucin und Valin inhibiert (Rabinovitz et al, 1969). Sowohl Acriflavin als auch Azaleucin wurden bisher noch nicht in *C. acidurici* 9a getestet. Gegen beide konnte eine ausgeprägte Resistenz nachgewiesen werden, da auch bei den höchsten Konzentrationen (350 µg/ml Acriflavin und 200 µg/ml 4-Azaleucin) ähnlich wie bei Bacitracin keine Inhibierung des Wachstums festgestellt werden konnte.

3.4.2 Resistenz gegenüber Metallen

Obwohl viele Metalle von Bakterien als Spurenelemente benötigt werden, können sie in höheren Konzentrationen äußerst toxisch wirken. Da sie in einer Reihe von Stoffwechselprozessen involviert sind und u.a. als Cofaktoren für viele Enzyme dienen, resultieren überschüssige Metall-Ionen durch die Deplatzierung der Metalle zu falschen Bindestellen oder Ligandeninteraktionen in veränderte Enzymspezifitäten, DNA-Schäden und Zellfunktionsstörungen (Bruins et al, 2000). Eine Menge Bakterien entwickelten deshalb unterschiedliche Mechanismen, um das überschüssige Metall aus der Zelle zu transportieren. Es sei gleich zu Anfang geklärt, dass hier bewusst der Begriff „Metall“ gewählt wurde, obwohl die untersuchten Metalle im allgemeinen Sprachgebrauch als Schwermetalle bezeichnet werden. Da es aber keine wirklich einheitliche Definition des Schwermetalls als solches gibt (Hodson, 2004) und die IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) empfiehlt, diesen Begriff künftig nicht mehr zu verwenden (Duffus, 2002), wird im Folgenden nur noch von „Metall“ die Rede sein oder auf eine besser definierte Bezeichnung zurückgegriffen.

In *C. acidurici* 9a konnten verschiedene Gene identifiziert werden, deren Genprodukte in diese oben erwähnten Transportmechanismen involviert sein könnten. Eine Übersicht dazu ist in **Tabelle 13** gegeben. Es wurde ein komplettes Kupfer-Homeostasis-System entdeckt, bestehend aus einer P-Typ ATPase, die in der Lage ist Kupfer zu exportieren (*copA*, Curi_c01370), einem Kupfer Chaperon (*copZ*, Curi_c01380), welches einkommende Cu⁺-Ionen bindet und zu ihren Bestimmungsorten (wie z.B. CopA) eskortiert, und ein transkriptioneller Repressor (*copR*, Curi_c01390), der die Cu⁺-Ionen registriert und anschließend von der DNA dissoziiert, um so die

Transkription der Gene *copA* und *copZ* zu veranlassen. Genauere Betrachtungen zu diesem *cop*-Operon und seiner Funktionsweise werden in Kapitel 3.4.2.2 vorgenommen.

Tab. 12: Übersicht der auf dem Chromosom von *C. acidurici* 9a identifizierten Metall-Resistenzgene.

Eine Kategorisierung fand anhand der Ionen statt, die am Wahrscheinlichsten transportiert werden. Daneben sind weiterhin die Gennummern und entsprechenden Annotationen aufgeführt.

Lokus-Tag	Gen	Annotation	Ionen
Curi_c01370	<i>copA</i>	Kupfer P-Typ ATPase	Cu ⁺ /Ag ⁺
Curi_c01380	<i>copZ</i>	Kupfer Chaperon	
Curi_c01390	<i>csor</i>	Kupfer-sensorischer transkriptioneller Regulator	
Curi_c01850	<i>chrA1</i>	Chromat Transportprotein	Cr ⁶⁺
Curi_c01860	<i>chrA2</i>	Chromat Transportprotein	
Curi_c04760	<i>chrA3</i>	Chromat Transportprotein	
Curi_c06400	<i>cadA</i>	Kadmium, Zink, und Kobalt P-Typ ATPase	Zn ²⁺ /Cd ²⁺
Curi_c26810	<i>czcD</i>	Kadmium, Zink, und Kobalt/H(+)-K(+) Antiporter	Zn ²⁺ /Cd ²⁺
Curi_c11220		Kationen-transportierende P-type ATPase	Zn ²⁺ /?
Curi_c15240		mögliches Aluminium Resistenzprotein	Al ³⁺

Als zweites wurden drei Gene identifiziert, die für Chromat-Transportproteine kodieren. Es wird angenommen, dass sie in der Lage sind, Cr⁶⁺-Ionen aus der Zelle zu exportieren und diese so von dem überschüssigen Metall zu befreien. Auch Gene, die für Proteine des Zink-, Kadmium- und Kobalt-Exports kodieren wurden entdeckt. Dazu gehören der Kadmium, Zink, Kobalt/H(+)-K(+) Antiporter CzcD (Curi_c26810) und eine weitere P-Typ ATPase (Curi_c06400). Eine dritte Kationen P-Typ ATPase (Curi_c11220) ist vermutlich ebenfalls in der Lage Zn²⁺-Ionen zu exportieren. Als letztes wurde ein mögliches Gen identifiziert, welches für ein Aluminium-Resistenzprotein kodiert (Curi_c152490), das Ähnlichkeiten zu dem Protein Alu1 in *Arthrobacter viscosus* zeigt, welches eine Aluminium-Toleranzaktivität aufwies (Jinki Jo 2002).

3.4.2.1 Wachstumsversuche mit CuCl_2 und ZnCl_2

Kupfer und Zink sind zwei der bedeutendsten Spurenelemente und häufige Cofaktoren in Bakterien. Zink spielt dabei sowohl in katalytischen Komponenten wie z.B. der Carboanhydrase als auch strukturellen Komponenten zur Proteinstabilisierung in Form von Zinkfinger-Proteinen eine Rolle (Coleman, 1992). Kupfer stellt aufgrund seiner zwei Oxidationsstufen einen hervorragenden Katalysator für Redoxreaktionen bei Prozessen wie der Atmung und Photosynthese z.B. als Cofaktor im Cytochrom C dar (Puig & Thiele, 2002). Aufgrund ihrer wichtigen Bedeutung wurden speziell diese beiden Übergangsmetalle im Folgenden untersucht. Mit klassischen Wachstumsversuchen sollte überprüft werden, wie *C. acidurici* 9a sich in der Gegenwart von Ionen dieser beiden Metalle verhält. Hierfür wurden 100 mM Stammlösungen der Salze CuCl_2 und ZnCl_2 erstellt und in Konzentrationen von 2-12 mM (CuCl_2) oder 2-28 mM (ZnCl_2) dem Harnsäure-Medium zugesetzt. Hungate-Röhrchen wurden je 10%ig inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Alle 2 h wurde das Wachstum photometrisch durch die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ gemessen und eine halblogarithmische Auftragung daraus erstellt. Die daraus resultierenden Wachstumskurven sind in **Abbildung 20** dargestellt. Beim Wachstum sowohl mit CuCl_2 (**A**) als auch mit ZnCl_2 (**B**) gibt die schwarze Kurve jeweils die Referenzkurve an, wo die Inokulation in Harnsäure-Medium ohne entsprechendes Metall erfolgte. Es wird bei beiden deutlich, je höher die Konzentration an CuCl_2 oder ZnCl_2 , desto niedriger war die erreichte maximale $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von *C. acidurici* 9a. Bei Wachstum mit CuCl_2 (**A**), fällt auf, dass die charakteristische Kurvenform wie man sie beim Wachstum in Standard-Harnsäure-Medium erhält, sich durch die Zugabe von CuCl_2 veränderte. Es wurde zunächst eine längere Eingewöhnungsphase (*lag*-Phase) benötigt, bevor die Zellen in exponentielles Wachstum eintraten. Des Weiteren konnten mehrstufige Wachstumsphasen beobachtet werden. Das heißt, die Wachstumskurve besteht aus mehreren Wachstumsphasen (exponentiellen Phasen) und Plateauphasen, die sich abwechseln bis die stationäre Phase schlussendlich eintritt. Zusätzlich verkürzten sich mit steigender Konzentration an CuCl_2 die Wachstumsphasen, während die Plateauphasen immer länger wurden. Ab 12 mM war unter den gegebenen Testbedingungen kein Wachstum mehr möglich.

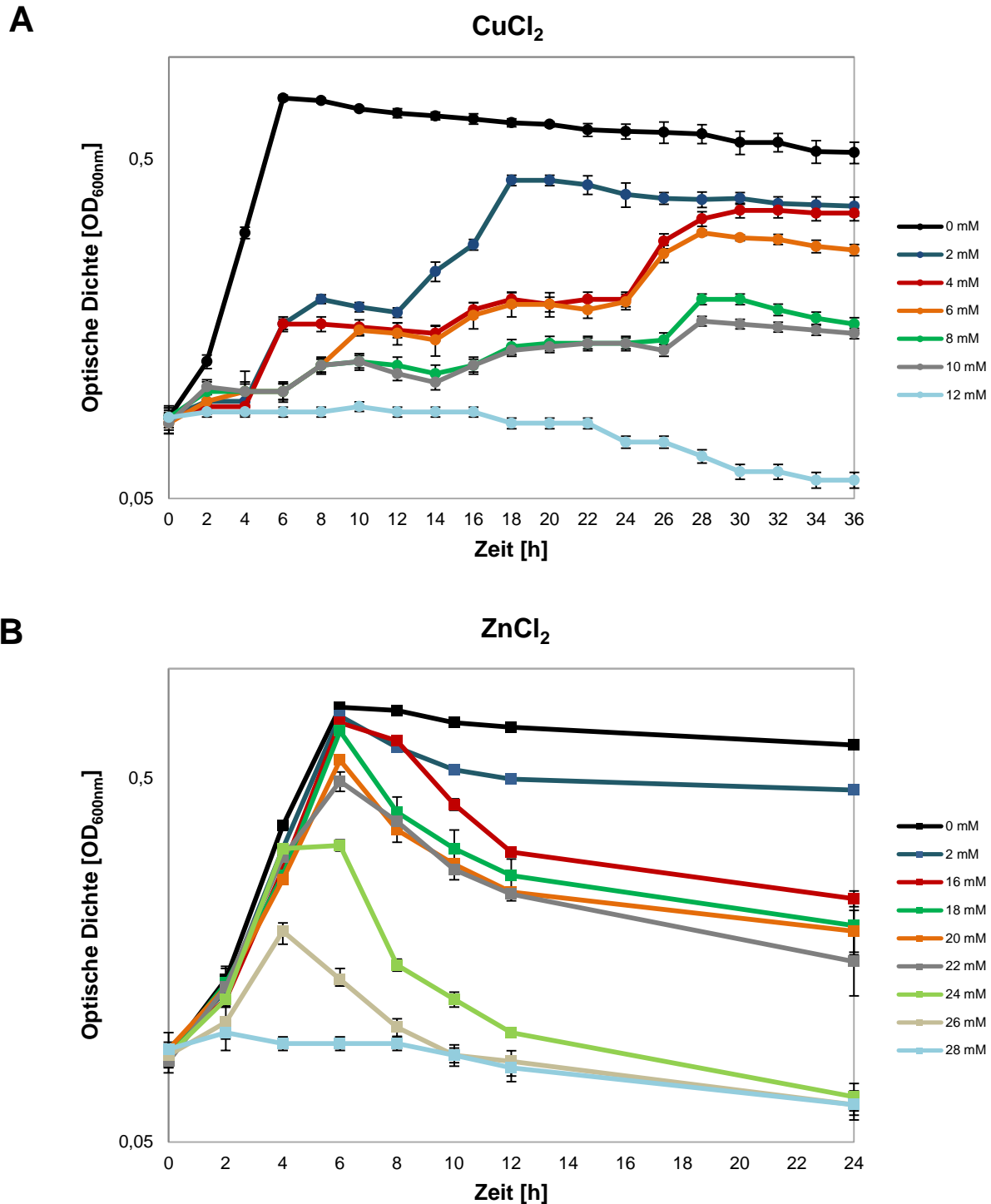


Abb. 20: Wachstum von *C. acidurici* 9a in der Gegenwart von Metallen.

Dargestellt ist eine halblogarithmische Auftragung der gemessenen optischen Dichte gegen die Zeit. Zellen von *C. acidurici* 9a wurden in Harnsäure-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an CuCl₂ (A) oder ZnCl₂ (B) angezogen. Die Konzentration der Metall-Salze wurde solange angehoben, bis kein Wachstum mehr sichtbar war. Das Wachstum wurde über die optische Dichte photometrisch alle 2 h bestimmt bis die stationäre Phase definitiv erreicht war. Das Wachstum von Zellen in Harnsäure-Medium ohne Metalle diente als Positivkontrolle (schwarze Linien). Tests wurden in Triplikaten durchgeführt.

Im Gegensatz zum Wachstum mit CuCl_2 , war beim Wachstum mit ZnCl_2 zu beobachten, dass die charakteristische Kurvenform erhalten blieb. Auch eine längere Gewöhnungsphase der Zellen an das supplementierte Medium schien nicht nötig zu sein. Bis zu einer Konzentration von 22 mM ZnCl_2 verkürzte sich auch die exponentielle Phase nicht und die maximale $\text{OD}_{600\text{nm}}$ wurde nach ca. 6 h erreicht. Erst ab 24 mM ZnCl_2 verkürzte sie sich und die stationäre Phase begann bereits nach 4 h. Auffällig war hier hingegen, dass mit steigender Konzentration an ZnCl_2 im Medium die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ in der stationären Phase immer steiler abfiel und ab einer Konzentration von 24 mM ZnCl_2 sogar nach 12-16 h unterhalb der Ausgangs- $\text{OD}_{600\text{nm}}$ fiel. Wachstum war ab einer Konzentration von 28 mM nicht mehr möglich.

3.4.2.2 Untersuchung des *cop*-Operons durch RT-PCR und *real-time* qPCR

Da mit dem *cop*-Operon aus *C. acidurici* 9a ein vollständiges Homeostasis-System identifiziert wurde und aufgrund der Wachstumsversuche mit CuCl_2 eine Verbindung zwischen dem Wachstumsverhalten und der Funktionsweise des *cop*-Operons vermutet wurde, sollte dieses genauer betrachtet und weitere Untersuchungen zu der Transkription seiner Gene durchgeführt werden. **Abbildung 21** zeigt die Organisation des *cop*-Operons in *C. acidurici* 9a.



Abb. 21: Organisation des *cop*-Operons in *C. acidurici* 9a.

Dargestellt ist die Organisation des *copAZ-csoR*-Lokus von *C. acidurici* 9a. Die Orientierung der Gene ist durch die Pfeilrichtung angegeben. Beteiligt sind folgende Gene: *copA*, welches für eine Kupfer P-Typ ATPase kodiert (blau), das für das Kupfer Chaperon kodierende *copZ*-Gen (grün) und das Gen *csoR* für den transkriptionellen Repressor (rot) des Operons. Benachbarte Gene sind in grau angedeutet.

Wie bereits erwähnt, kodiert *copA* für die Kupfer P-Typ ATPase CopA, welche für den Export von Cu^+ aus der Zelle heraus verantwortlich ist. Die Cu^+ -Ionen werden dabei von dem Chaperon CopZ angeliefert. Es bindet die in die Zelle eintretenden Cu^+ -Ionen fest an sich und eskortiert sie

zum Zielprotein CopA. Die Transkription des Operons wird durch den transkriptionellen Repressor CsoR reguliert. CsoR-Typ Repressoren sind innerhalb der Clostridien die vorherrschende Art von *cop*-Repressoren. Zuerst entdeckt wurden sie in *Mycobacterium tuberculosis* (Liu et al, 2007) und später auch in *B. subtilis* (Smaldone & Helmann, 2007).

Da das Wachstum von *C. acidurici* 9a in Medium mit CuCl₂ mehrere Wachstums- und Plateauphasen aufwies, sollte überprüft werden, ob dieses Verhalten auf die Funktionsweise des Kupfer-Homeostasis-Systems zurückzuführen ist. Zunächst sollte mit Hilfe von RT-PCR untersucht werden, ob sich während der verschiedenen Wachstumsphasen Änderungen der Transkription der involvierten drei Gene einstellen. Dazu wurde *C. acidurici* 9a in Harnsäure-Medium einmal mit 2 mM CuCl₂ und zum Vergleich mit 6 mM CuCl₂ angezogen. Als Kontrolle wurde in Harnsäure-Medium ohne CuCl₂ inokuliert. Den verschiedenen Wachstums- und Plateauphasen entsprechend wurden Proben von Kulturen mit 2 mM CuCl₂ nach 3, 5, 8, 13, und 18 h Proben genommen, bei Kulturen mit 6 mM CuCl₂ nach 3, 7, 10, 15, 18 und 25 h. Aus der Referenzkultur wurden zu jedem Zeitpunkt der Probennahme aus den anderen Kulturen parallel Proben entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren. Das Wachstum wurde photometrisch nebenher überprüft. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass in jeder Konzentration jeweils Proben aus den Wachstumsphasen und der jeweiligen Plateauphase vorlagen.

Aus allen Proben wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe **2.3.3**) und danach in cDNA umgeschrieben (siehe **2.4.9**). Anschließend wurde für die Transkriptionsanalyse eine semi-quantitative PCR mit 24 Zyklen mit der cDNA durchgeführt (siehe **2.5.1**). Dazu wurden spezifische Oligonukleotide für *copA* (cau803/cau804), *copZ* (cau807/cau808) und *csoR* (cau813/cau814) eingesetzt (**A.I., Tab. 13**). Als Positivkontrolle diente das *housekeeping*-Gen *rpoA* (cau827/cau828), welches für die alpha-Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert und sich durch eine gleichbleibende Transkription zu verschiedenen Zeiten auszeichnet. Die PCRs wurden auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen, da die Produkte eine Größe von maximal 300 bp aufweisen sollten und somit eine bessere Auftrennung möglich war. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 22** dargestellt.

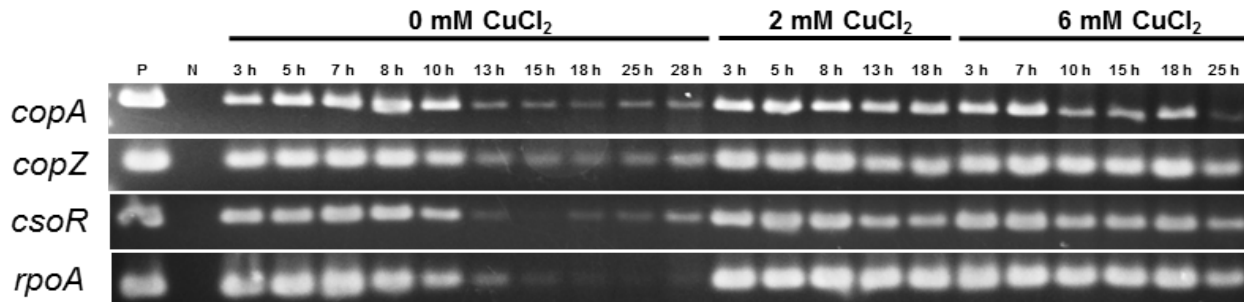


Abb. 22: Semi-quantitative RT-PCR zur Transkriptionsanalyse des *cop*-Operons von *C. acidurici* 9a.

Dargestellt sind die Produkte der RT-PCR mit Oligonukleotiden für *copA*, *copZ*, *csoR* und *rpoA* basierend auf verschiedenen Konzentrationen an CuCl_2 (0 mM, 2 mM und 6 mM) und Wachstumphasen. Als *template* wurde die umgeschriebene cDNA eingesetzt. Aus der Kultur mit 2 mM CuCl_2 wurden nach 3, 5, 8, 13 und 18 h Proben entnommen, aus der mit 6 mM nach 3, 7, 10, 15, 18, und 25 h. Dies sollte jeweils einer Probe aus der Wachstumsphase und der folgenden Plateauphase entsprechen. Aus der Referenzkultur wurden parallel zu allen Zeitpunkten ebenfalls Proben entnommen. Die Positivkontrolle (P) bestand aus der PCR mit den jeweiligen Oligonukleotiden mit DNA als *template*, die Negativkontrolle (N) mit RNA als *template*.

Bei einem Wachstum in Medium ohne CuCl_2 sind überall Produkte zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle Gene des *cop*-Operons während der exponentiellen Wachstumsphase konstitutiv transkribiert werden. Ab etwa 8-10 h befinden sich die Zellen in der stationären Phase (Vergleich **Abb. 20**) und die Transkription wird schwächer. Betrachtet man die Ergebnisse für das Wachstum mit 2 mM CuCl_2 , so fällt auf, dass für alle Gene kaum Unterschiede in der Transkriptionsstärke festzustellen sind. Lediglich bei *copZ* und *csoR* war die Transkription nach 13 h und 18 h ein wenig abgeschwächt. Die Transkription von *copA* blieb über den vollständigen Zeitraum gleich. Die Ergebnisse für das Wachstum mit 6 mM CuCl_2 fielen ähnlich aus. Besonders *copZ* wies eine durchgängig hohe Transkription auf. Bei *csoR* fielen nur leichte Unterschiede auf. Am Anfang des Wachstums nach 3 h und 7 h wurde das Gen stark transkribiert. Nach 10 h in der ersten Plateauphase war eine leichte Abschwächung zu erkennen, die nach 15 h und besonders nach 18 h (Ende der zweiten Wachstumsphase bzw. zweite Plateauphase) wieder rückläufig wurde und eine stärkere Transkription erfolgte. Nach 25 h in der dritten Wachstumsphase fiel die Transkription am schwächsten aus. Die deutlichsten Unterschiede waren bei der Transkription von *copA* zu erkennen. Obwohl dieses Gen einer durchgängigen Transkription unterlag, schien diese doch nach 7 h besonders stark auszufallen (Ende erster Wachstumsphase) und ebenfalls nach 18 h (zweite Plateauphase). Zu den Zeitpunkten dazwischen (10, 15 und 25 h) flachte die Transkription etwas ab.

Allgemein gesehen, ließen diese Ergebnisse keinen wirklichen Schluss auf das Transkriptionsverhalten der Gene des *cop*-Operons zu, da keine augenscheinlichen Unterschiede zu erkennen waren. Um nun deutlichere Ergebnisse zu bekommen sollte eine Transkriptionsanalyse auf der Basis einer *real-time* qPCR durchgeführt werden. Hierfür wurden die gleichen Proben vom Wachstum mit 6 mM CuCl₂ wie auch schon für die RT-PCR verwendet. Die cDNA wurde in verschiedenen Stufen verdünnt und danach unverdünnt bzw. 1:5, 1:25, 1:50, 1:125 oder 1:250 verdünnt als *template* für die Reaktion der *real-time* qPCR eingesetzt (siehe **2.11.1**). Ct-Werte (*threshold cycle values*) und Standardabweichungen wurden automatisch von der „iQ5 Optical System Software“ berechnet. Eine kurze Zusammenfassung der verwendeten Werte ist im Anhang zu finden (**A.XI., Tab. 23, 24, 25, 26**). Die Spezifität der Oligonukleotidpaare wurde anhand der Schmelzkurve ermittelt, welche für alle Oligonukleotidpaare klare Einzel-Peaks zeigte, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass keine unspezifischen Produkte gebildet worden waren, die die Ergebnisse verfälschen könnten (**A.XII., Abb. 39**). Die Berechnung der Effizienz (E) der einzelnen Nukleotidpaare (**A.XI., Tab. 27**) erfolgte auf der Basis der Auftragung der Ct-Werte, gegen den log₁₀ der Konzentration durch lineare Regression (**A.XI., Abb. 35, 36, 37, 38** und **2.11.1**). Da die Oligonukleotidpaare unterschiedliche Effizienzen aufwiesen, wurde für die relative Quantifizierung der Änderung der Transkriptionsrate (R) die Methode von Pfaffl verwendet (Pfaffl, 2001). **Abbildung 23** gibt eine Übersicht über die Änderungsraten für die Transkription der Gene des Kupfer-Homeostasis-Systems in *C. acidurici* 9a zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums auf 6 mM CuCl₂ im Verhältnis zu Wachstum ohne CuCl₂.

Für *csor* ist zu beobachten, dass zu Beginn des Wachstums während der lag-Phase keine bedeutende Änderung der Transkriptionsrate vorliegt. Nach 7 h und 25 h während der Wachstumsphasen steigt die Transkriptionsrate um das 5- bzw. 2-fache an. Während der Plateauphasen, also nach 10 h und 18 h, sinkt sie wieder ab. Das gleiche gilt für *copA*. Im Gegensatz zu *csor* wird hier allerdings deutlich, dass die Rate bereits in der lag-Phase nach 3 h um das 3-fache erhöht ist. Nach 7 h während der ersten Wachstumsphase steigt sie noch weiter an und nach 25 h, während der letzten Wachstumsphase ist die Rate sogar um das 45-fache erhöht. Die Änderungsrate für *copZ* verhält sich zu Beginn sehr ähnlich wie für *copA*, aber während der letzten Wachstumsphase nach 25 h bleibt die Rate niedrig. Die Werte für die Wachstumsphase nach 15 h fallen für alle drei Gene aus dem Schema, da hier keine Erhöhung der Rate wie bei den anderen Wachstumsphasen zu beobachten ist, sondern die Änderungsrate niedrig bleibt.

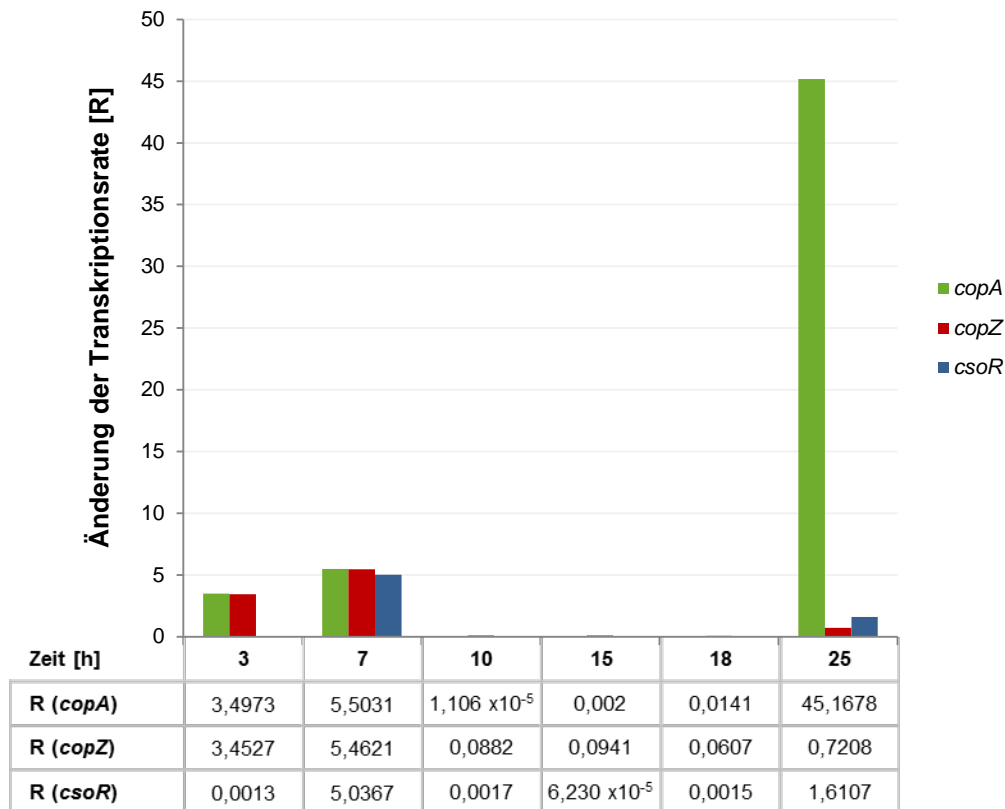


Abb. 23: Änderung der Transkriptionsrate R der Gene des *cop*-Operons.

Eine Kultur von *C. acidurici* 9a wurde in Harnsäure-Medium mit 6 mM CuCl_2 über einen Zeitraum von 28 h bei 37 °C inkubiert. Proben wurden jeweils innerhalb der Wachstumsphasen und Plateauphasen nach 3 h, 7 h, 10 h, 15 h, 18 h und 25 h genommen. Die Änderung der Transkriptionsrate R der *cop*-Gene wurde nach einer *real time*-qPCR auf der cDNA mit der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001) berechnet (siehe 2.11.1). Als Balken dargestellt sind die Änderungen der Transkriptionsraten von *copA* (grün), *copZ* (rot) und *csoR* (blau) zu den verschiedenen beprobten Zeitpunkten. Die genauen Werte sind unter dem jeweiligen Zeitpunkt aufgeführt. Als Referenz zur Berechnung von R wurden Zellen aus Harnsäure-Medium ohne Zusatz von CuCl_2 verwendet.

3.5 Untersuchungen zur genetischen Zugänglichkeit

Neben den natürlichen Eigenschaften eines Organismus ist für die Biologie auch stets seine genetische Zugänglichkeit von Interesse. Die Möglichkeit der Einbringung von DNA und der damit verbundenen Veränderung des Organismus eröffnet nicht nur eine Erweiterung der Methoden zur Untersuchung, sondern auch neue Perspektiven zur weiteren Nutzung in Bereichen der Biotechnologie. Obwohl *C. acidurici* 9a durch seinen spezialisierten Stoffwechsel eventuell auch für die Biotechnologie interessant sein könnte, wurde in dieser Arbeit in erster Linie die genetische Zugänglichkeit untersucht, um später durch DNA-Transfermethoden wie die

Elektroporation oder Konjugation bessere Einblicke in diesen Organismus zu bekommen. Für sämtliche Versuche dieser Art wurde in dieser Arbeit das Plasmid pKV12 verwendet. Dieses Plasmid wurde bereits sowohl zur Elektroporation als auch zur Konjugation in diversen Gram-positiven Organismen erfolgreich eingesetzt, unter anderem in *Acetobacterium woodii* DSM 1030, *Bacillus subtilis* DSM 402 und *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 (Strätz et al, 1994). Eine vollständige Karte dieses Plasmids ist in **Abbildung 24** dargestellt.

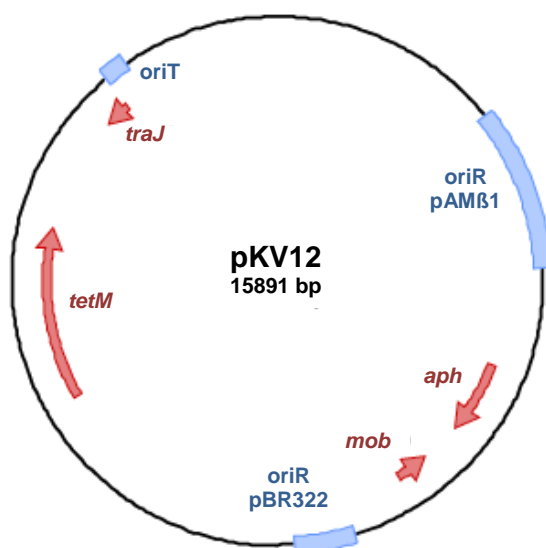


Abb. 24: Übersichtskarte des Plasmids pKV12.

Die Karte wurde modifiziert nach Michael Rachinger (Rachinger 2010). Rote Pfeile stellen die Gene ihrer Orientierung nach dar, blaue Kästchen die Ursprünge für Replikation (oriR) und Konjugation (oriT).

3.5.1 Transformation von *C. acidurici* 9a durch Elektroporation

Die Elektroporation wird in vielen Organismen, Gram-positiv wie auch Gram-negativ, als äußerst schnelle und effiziente Methode eingesetzt, um DNA zu transferieren. Für die Transformation von DNA in *C. acidurici* 9a wurde zunächst ein Protokoll zur Elektroporation von *C. ljungdahlii* der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Dürre am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm eingesetzt (Köpke et al, 2010). Hierzu wurden Zellen von *C. acidurici* 9a eingesetzt, die bereits über mehrere Tage hinweg gutes Wachstum zeigten. Der Elektroporations-Kultur wurde gleich nach der Inokulation 40 mM DL-Threonin hinzugefügt, um die Zellwand

direkt zu schwächen und eine höhere Aufnahmefähigkeit bzw. Durchlässigkeit für die DNA zu erzielen (McDonald et al, 1995). In der zweiten Hälfte der exponentiellen Phase, was einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 entsprach, wurden die Zellen abzentrifugiert und anaerob in eiskaltem SMP-Puffer gewaschen. Schließlich wurde das Zellpellet in SMP-Puffer resuspendiert und direkt zur Elektroporation verwendet. Laut Protokoll sollte mindestens 1 μ g Plasmid eingesetzt werden, da geringere Mengen meist zu nur sehr wenigen bis gar keinen Transformanten führt. Plasmid und Zellen wurden in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,4 mm auf Eis inkubiert und anschließend wie in **2.8.2** beschrieben elektroporiert. Eine anschließende Erholung der Zellen wurde in Harnsäure-Medium durchgeführt, bis ein Wachstum wieder sichtbar war, was meist nach 2-3 h der Fall war. Die Selektion auf Transformanten sollte in Harnsäure-Medium supplementiert mit Kanamycin erfolgen, da *C. acidurici* 9a von Natur aus sensitiv gegenüber diesem Antibiotikum reagiert und so nur Zellen, die das Plasmid mit dem enthaltenen Resistenzgen aufgenommen haben, überleben können. Da Kulturen von *C. acidurici* 9a normalerweise nach 6-7 h nach der Inokulation ihren Wachstumshöhepunkt erreichten, wurde eine erste Überprüfung des Wachstums innerhalb dieser Zeitspanne vorgenommen. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Wachstum sichtbar war, wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C inkubiert. Da nach 24 h, 48 h und auch 72 h immer noch kein Wachstum erfolgt war, wurde der Versuch als nicht erfolgreich abgebrochen. Es wurden noch weitere Anpassungen des Protokolls vorgenommen und unter anderem Elektroporationsküvetten mit kleinerem Elektrodenabstand (0,1-0,2 mm), unterschiedlichen Konzentrationen an DL-Threonin (20-60 mM) und ein anderes Antibiotikum zur Selektion (Tetracyclin) verwendet. Keine der Modifikationen führte zum Erfolg und es konnten keine Transformanten erhalten werden.

3.5.2 Konjugation von *C. acidurici* 9a mit *E.coli* S17-1

Als Donorstamm für die Konjugation wurde der Stamm *E. coli* S17-1 (Simon et al, 1983) verwendet. Dieser trägt bereits im Chromosom integriert alle Gene, die für eine Konjugation benötigt werden. Das Plasmid pKV12 war bereits in diesem Organismus enthalten. Es besitzt zwei Replikationsursprünge, oriR pAM β 1 und oriR pBR322, die es ihm ermöglichen als *Shuttle*-Vektor bei einer Konjugation zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Organismen zu

fungieren (**Abb. 24**). Der oriR pBR322 stammt dabei ursprünglich aus dem *E. coli*-Plasmid pBR322 und oriR pAM β 1 aus dem Plasmid pAM β 1, welches unter anderem zur Replikation in *Bacillus*- und *Clostridium*-Spezies sowie anderen Gram-Positiven befähigt ist. Zusätzlich trägt es Resistenzgene gegen Kanamycin (*aph*) und Tetracyclin (*tetM*), wie bereits in **3.5.1** erwähnt. Für den eigentlichen Konjugationsvorgang besitzt es einen Ursprung für konjugativen Transfer (oriT). Hier wird im Endeffekt der Einzelstrangbruch initiiert, der als Ursprung für die Konjugation dient (Pansegrau et al, 1994). Der oriT ist in pKV12 mit dem Gen *traJ* assoziiert, dessen Genprodukt bei der Initiation des späteren DNA-Transfers involviert ist.

Für die Konjugation wurden verschiedene Protokolle getestet und modifiziert (siehe **2.8.3**) (Bertram et al, 1991; Rachinger, 2010; Strätz et al, 1994). Allen Methoden gemein war zunächst die Anzucht beider Organismen. Da *E. coli* S17-1 genauso in der Lage ist anaerob zu wachsen, wurde dessen Anzucht ebenfalls unter anaeroben Bedingungen vollzogen, da alle späteren Schritte, in die beide Organismen zusammen involviert waren ebenfalls anaerob stattfinden mussten, da *C. acidurici* 9a nur unter strikt anaeroben Bedingungen langfristig überleben konnte. Beide wurden in ihrem bevorzugten Grundmedium angezogen (siehe **2.2.1** und **2.2.2**) und jeweils bis zur zweiten Hälfte der exponentiellen Phase wachsen gelassen. Nach mehrmaligem Zentrifugieren und Waschen im eigenen Medium wurde dann zunächst nach der Methode von Rachinger (Rachinger 2010) vorgegangen und beide Stämme als vermischtes Pellet in 200 μ l Harnsäure-Medium in einem Hungate-Röhrchen unter anaeroben Bedingungen bei 30 °C für 15-16 h inkubiert und anschließend zur Selektion in Harnsäure-Medium supplementiert mit Polymyxin B gegen die restlichen *E. coli*-Zellen und Kanamycin gegen Zellen von *C. acidurici* 9a ohne Plasmid überführt und weiter inkubiert bei 30 °C. Da auch nach 48 h keine Trübung des Mediums zu beobachten war, wurde die Methode zunächst dahingehend verändert, dass Harnsäure-reduziertes Medium mit 3 mM Harnsäure statt den normalen 12 mM eingesetzt worden ist, da die Vermutung bestand, dass der Stoffwechsel von *E. coli* S17-1 eventuell nicht mit so hohen Konzentration funktioniert und sich die benötigten Proteine nicht ausbilden konnten. Als diese Änderung auch keine Ergebnisse erzielte, wurden weitere Veränderungen getestet wie Tetracyclin als Antibiotikum, andere Mengen an Medium zur Resuspension (50-500 μ l) oder unterschiedliche Inkubationszeiten (5-20 h). Da auch diese Modifikationen keine Transkonjuganten hervorbrachten, wurde das Protokoll gewechselt und nach Bertram et al. (1991) und Strätz et al. (1994) vorgegangen. Diese beinhalteten die Benutzung eines sterilen Papierfilters als Oberfläche für die Konjugation. Die in jeweils so wenig Medium wie möglich

resuspendierten Pellets von Donor und Akzeptor wurden unter anaeroben Bedingungen übereinander auf das Filterpapier getropft und in einer Petrischale in einem Anaerobentopf inkubiert. Anschließend wurde das Filterpapier in ein Hungate-Röhrchen mit Harnsäure-Medium mit Polymyxin B und Kanamycin überführt und weiter inkubiert. Auch hier wurde als Variation wie schon oben beschrieben Tetracyclin als Selektionsmittel eingesetzt. Auch diese Methode führte zu keinen Transkonjuganten, so dass im Rahmen dieser Arbeit keine Methode gefunden werden konnte, um *C. acidurici* 9a genetisch zugänglich zu machen.

4. Diskussion

4.1 Das Genom von *C. acidurici* 9a

Wie schon erwähnt, wurden bereits viele Genome von Vertretern der Gattung *Clostridium* sequenziert, die die verschiedensten Substrate verwerten, wie *C. beijerinckii*, der hauptsächlich auf Zuckern wächst, *C. sticklandii*, der seine Energie aus der gemeinsamen Vergärung mehrerer Aminosäuren bezieht oder der Pathogene *C. difficile*, welcher zu den proteolytischen Bakterien zählt. Das Genom eines rein purinolytisches *Clostridium*s, welches Purine wie Harnsäure als alleinige Quelle für Kohlenstoff, Stickstoff und Energie nutzt, wurde bisher allerdings noch nicht sequenziert. Mit dem Genom von *C. acidurici* 9a konnte in dieser Arbeit das erste eines solchen Vertreters sequenziert und annotiert werden und als Grundlage für die Sequenzierung der Genome weiterer Vertreter und weiterführende Experimente dienen.

4.1.1 Allgemeine Eigenschaften des Genoms

Durch einen allgemeinen Vergleich der Genome verschiedener Vertreter der Gattung *Clostridium* bzw. verwandter Organismen mit dem Genom von *C. acidurici* 9a (siehe **Tab. 7**) wurde deutlich, dass sich dieser Organismus gut in den Durchschnitt einpasst. Die Genomgrößen variieren in dieser Gattung stark von kleineren von etwa 2,5 Mb wie bei *C. spiroforme* DSM 1552 oder *C. novyi* NT bis hin zu größeren von 6,6 Mb wie bei *C. hathewayi* DSM 13479. *C. acidurici* 9a gehört in diesem Sinne mit einem Genom von 3,1 Mb eher zu den kleineren Vertretern. Dies könnte zum Teil daran liegen, dass *C. acidurici* 9a ein recht eingeschränktes Substratspektrum aufweist und dementsprechend weniger Gene zum Umsetzen der Substrate in Energie und Zellmasse braucht. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass nach einer COG-Analyse nur 3,1% der kodierenden Gene in *C. acidurici* 9a der Kategorie „Kohlenhydrattransport und –metabolismus“ zugeordnet werden konnten, während der Durchschnitt allgemein in

Clostridien bei ca. 7,2% liegt (siehe **3.1.2**). Das saccharolytische Bakterium *C. beijerincki* NCIMB 8052 weist dagegen ein breiteres Substratspektrum auf und der Anteil an Genen, die für Proteine des Kohlenstofftransportes und –metabolismus kodieren beläuft sich auf 11,54%. Mit einer Genomgröße von etwa 6 Mb gehört dieser Organismus wiederum zu den größeren Vertretern.

Der G+C-Gehalt variiert im Gegensatz zur Genomgröße im Allgemeinen weniger stark. *Clostridium* gehört zu den Niedrig-G+C-Organismen mit einem G+C-Gehalt, der in den meisten Fällen zwischen 27% wie bei *C. botulinum* B Erklund 17B und 39% wie bei *C. thermocellum* DSM 2360 liegt, so dass *C. acidurici* 9a mit einem G+C-Gehalt von 30% im unteren Drittel anzusiedeln ist. Allerdings gibt es auch hier einige Ausnahmen wie etwa *C. asparagiforme* DSM 15981 oder *C. methylpentosum* R2 DSM 5476, deren G+C-Gehalt bei 56% bzw. 52% liegt.

Durch eine genomweite Analyse des flexiblen und des *core*-Genoms von *C. acidurici* 9a (siehe 3.1.3.2) fielen vier Regionen besonders auf, die Anhäufungen von Genen ohne Orthologe in anderen Clostridien zeigten (Region I-IV, siehe **Abb. 3**). In Region III finden sich zum Teil über 40 Gene in einem Cluster, die nur vereinzelt durch andere Gene unterbrochen werden, welche unter anderem für Acetyltransferasen (Curi_c14540, Curi_c14610), aber auch für ein Phagen-Terminaseprotein (Curi_c14970) kodieren. Region IV besteht einzig und allein aus 17 aufeinanderfolgenden Genen, die für hypothetische Proteine kodieren. Da die meisten Gene in diesen Regionen keine Orthologen in den anderen untersuchten Clostridien aufweisen und diese Gene in großen Clustern organisiert sind, wäre es möglich, dass sich hier für *C. acidurici* 9a einzigartige Gene befinden, deren Erforschung interessant sein könnte. Eine Deletion der Bereiche könnte erste Aufschlüsse über ihre Funktion geben, sofern sich phänotypische Auffälligkeiten daraus ergeben.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass mindestens 50% der Gene in *C. acidurici* 9a keine Orthologen in den anderen untersuchten Organismen aufwiesen. Vergleicht man dies mit ähnlichen vorangegangenen Analysen innerhalb der Gattung *Bacillus* (Rachinger, 2010; Wollherr, 2010), fällt diese Zahl vergleichsweise gering aus. Ein Vergleich ausgehend von *B. licheniformis* 9945A zu *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* erbrachte beispielsweise einen Anteil von maximal 35% an Genen, die keine Orthologe aufwiesen (Rachinger, 2010). Mit den Genen des *core*-Genoms verhält es sich ähnlich. Lediglich ein Set von 195 Genen konnte ausgemacht werden, das allen Clostridien gemein war (siehe 3.1.3.2). Dies entspricht nur etwa 7% des gesamten Genoms von *C. acidurici* 9a. Bei der

Bestimmung des *core*-Genoms von *B. licheniformis* DSM13, *B. cereus biovar. anthracis* CI und *B. amyloliquefaciens* FZB42 konnte hingegen ein Set an Genen ausgemacht werden, das in etwa 67% des Gesamtgenoms ausmachte (Wollherr, 2010). Es ist zwar zu beachten, dass die Anzahl an Genen des *core*-Genoms mit einer steigenden Zahl an berücksichtigten Genomen statistisch gesehen abnimmt, jedoch erbrachten komparativen Studien mit einer höheren Anzahl berücksichtigter *Bacillus*-Genome trotzdem höhere Werte für das *core*-Genom (Alcaraz et al, 2010). Hier wiesen 20 *Bacillus*-Spezies, inklusive marinen Bacillen, ein Set von 814 *core*-Genen auf, was aus Sicht des größten Vertreters *B. cereus* ATCC 10987 immer noch 13% des Gesamtgenoms ausmacht. Hier wird die allgemeine Heterogenität innerhalb der Clostridien deutlich.

Die meisten Orthologe zu *C. acidurici* 9a besaß *C. sporogenes*, gefolgt von *C. beijerinckii*, einigen Stämmen von *C. botulinum* und *A. oremlandii*, jedoch wies letzterer die größte Anzahl an Genen mit einer Proteinsequenz-Identität von über 70% auf (siehe 3.1.3.2). Durch phylogenetische Analysen anhand der 16S-rRNA-Gene (siehe **Abb. 5**) einerseits und der *core*-Proteine (siehe **Abb. 6**) andererseits, wurde *A. oremlandii* auch als am engsten verwandt zu *C. acidurici* 9a bestätigt. Ein weiterer 16S-rRNA-Gen-basierter Stammbaum mit Typstämmen der Clostridien, der auch nicht sequenzierte Genome inklusive weitere Vertreter der purinolytischen Clostridien enthielt (siehe **Abb. 4**). *A. oremlandii* clusterte hier zusammen mit *E. acidaminophilum* DSM 3953, so dass sie wahrscheinlich von dem gleichen Vorfahren wie *C. acidurici* 9a und *C. purinilyticum* DSM 1384 abstammen. Letzterer wurde als nächster Verwandter von *C. acidurici* 9a identifiziert, was aufgrund der Tatsache, dass beide purinolytische Clostridien sind, zu erwarten war. Daher verwundert es eher, dass das dritte bisher identifizierte purinolytische *Clostridium* (*C. cylindrosporum*) nicht in derselben Gruppe zu finden ist. Bereits Champion und Rabinowitz (Champion & Rabinowitz, 1977) und Tanner et al. (Tanner et al, 1982) wiesen auf einen überraschenden genotypischen Unterschied hin, während diese beiden Organismen sich phänotypisch so ähnlich sind. Es wurde viel spekuliert, ob dieser Unterschied das Ergebnis konvergenter oder divergenter Evolution ist. Champion und Rabinowitz glaubten eher an Divergenz, hauptsächlich, da andere Organismen wie *Peptococcus aerogenes* oder *Veillonella alcalescens*, die nicht zu den Clostridien zählen, auch die Möglichkeit zum anaeroben Purinabbau entwickelten, die sich aber vollständig von dem Abbauweg der purinolytischen Clostridien unterscheidet (Vogels & Van der Drift, 1976). Den gravierenden Unterschied zwischen Genotyp und Phänotyp erklärten sie mit einer unterschiedlichen

Evolutionenrate beider, d.h. während die molekulare Evolution mit einer konstanten Rate voranschreitet, verläuft die Evolution auf Organismenebene mit unterschiedlichen Raten (King & Wilson, 1975). Später wurde allerdings nachgewiesen, dass zumindest *P. aerogenes* in Selenit-haltigem Medium den clostridialen Imidazol-Weg zum Purin-Abbau nutzt und umgekehrt konnte in *C. purinilyticum* die Fermentation von Purinen über Pyrimidinderivate gezeigt werden, wie es auch zum Teil für *P. aerogenes* vorgeschlagen wurde (Schiefer-Ullrich et al, 1984). Zusammengenommen sind die Fakten jedoch zu spärlich, um auf Konvergenz oder Divergenz schließen zu können.

4.1.2 Fremdgene und *genomic islands* in *C. acidurici* 9a

Als Fremdgene bezeichnet man solche Gene, die durch horizontalen Gentransfer von einer Spezies in eine andere übertragen worden sind und diese sich im Chromosom des neuen Organismus integrieren. Allgemeiner bezeichnet man sie auch als Fremd-DNA bzw. *genomic islands*, da auch ganze Plasmide, große Bereiche oder nur DNA-Fragmente übertragen werden können. Horizontaler Gentransfer kann auf viele Art und Weisen geschehen und setzt einen engen Kontakt zwischen der DNA des Donors und dem Empfänger voraus und die Möglichkeit des Empfängers, die DNA aufzunehmen. Konjugation ist eine solche Möglichkeit des DNA-Transfers zwischen Organismen. In vielen Spezies der Gattung *Bacillus*, wie z.B. *Bacillus subtilis* (Dubnau, 1991), ist aber auch die Aufnahme „nackter“ DNA direkt aus der Umgebung möglich, da diese Organismen zum Teil über Gene verfügen, die ihnen natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme vermitteln. Anders als bei der Übertragung durch Konjugation erfordert dieser Mechanismus keine lebenden Donorzellen. Es ist eher so, dass durch den Tod von Bakterienzellen ihre DNA frei wird und diese dann von anderen, natürlich kompetenten, Bakterien aufgenommen werden kann. Obwohl es bis jetzt keine verzeichneten Beispiele von natürlicher Kompetenz in Clostridien gibt (Glen et al, 2005) und auch im Genom von *C. acidurici* 9a keine entsprechenden Gene gefunden wurden, scheint horizontaler Gentransfer stattzufinden, da 91 kb des Genoms von *C. acidurici* 9a als potentielle Fremd-DNA identifiziert wurden. Unter diesen Fremdgenen befanden sich auch solche, die für ein Vancomycin-Resistenz-

System kodieren. Dies ist ein gutes Beispiel für die Vermittlung von neuen bzw. nützlichen Eigenschaften durch die Aufnahme von Fremd-DNA.

Typische Fremdgene, die oft identifiziert werden kodieren für Prophagen und Restriktions-Modifikations-Systeme (Mrázek & Karlin, 1999). Sie kommen oft in Clustern vor, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nicht nur einzelne Gene, sondern mehrere auf einmal aufgenommen werden können. Interessanterweise wurden die zwei Gene für das *Sau96I*-Restriktions-Modifikationssystem (RM-System) in *C. acidurici* 9a nicht als Fremdgene erkannt, obwohl diese sehr oft von anderen Organismen übernommen werden, da sie selbst eine Art mobiles epigenetisches Element darstellen können (Furuta & Kobayashi, 2011). Sie können sich auch auf anderen mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Phagen oder Transposons befinden und so in den nächsten Wirt gelangen. Sehr oft findet man dann in direkter Nachbarschaft solcher Gene andere Mobilitäts-assoziierte Elemente wie Transposasen, Resolvasen oder Integrasen. Laut Furuta und Kobayashi (Furuta & Kobayashi, 2011) können die mobilen Elemente selbst verloren gehen im Genom und sich durch das Tragen eines Typ II RM-Systems und postsegregationale Vernichtung möglicherweise stabil ins Genom integrieren. In anderen Fällen, wenn die RM-Systeme direkt selbst als mobiles Element auftreten, integrieren sie sich im Wirtsgenom oft durch rekombinatorische Prozesse, die mit der DNA-Restriktionsfunktion des Systems zu tun haben könnten, in eine operonartige Struktur. Auch ein bereits vorhandenes RM-System kann durch das neu eintretende System durch eine einfache Substitution ersetzt werden, wie es z.B. bei *Helicobacter pylori* der Fall ist (Nobusato et al, 2000). Ob dies auch bei *C. acidurici* 9a so geschehen ist oder ob sich das RM-System mit Hilfe eines anderen mobilen Elements wie ein Plasmid oder ein Phage in das Genom integriert hat, ist nicht genau festzustellen. Es wurde jedoch ca. 18 kb stromabwärts eine Region identifiziert, die Fremdgene beinhaltet, unter anderem ein Resolvase-Gen. Es wäre denkbar, dass diese gesamte Region mit Hilfe eines Transposons in das Genom von *C. acidurici* 9a gelangt ist. Ein Grund, warum diese Gene nicht als GIs erkannt wurden liegt eventuell daran, dass sich das RM-System schon sehr lange im Genom von *C. acidurici* 9a befinden könnte. Programme wie IslandViewer und COLOMBO, die auf der Erkennung von Sequenzabweichungen beruhen, haben den Nachteil, dass sie meist nur Fremd-DNA erkennen, die in jüngerer Zeit durch horizontalen Gentransfer übertragen worden sind, da sich der G+C-Gehalt und die Benutzung der Codons im Laufe der Zeit dem Wirtsorganismus anpassen (Langille et al, 2008; Langille & Brinkman, 2009).

4.2 Das kryptische Plasmid pCuri3

Bereits 1987 wurde ein screening nach Plasmiden in 150 Stämmen aus 75 verschiedenen clostridialen Spezies durchgeführt (Lee et al, 1987). Dabei konnten in 26 der Stämme (in 21 Spezies) Plasmide identifiziert werden. Unter anderem wurden auch die purinolytischen Clostridien *C. acidurici*, vertreten durch fünf Stämme inklusive Typstamm 9a, *C. cylindrosporum* mit sechs Stämmen und *C. purinilyticum* mit weiteren sechs Stämmen untersucht. Plasmide konnten hier jedoch nur in zwei Stämmen von *C. acidurici* ausgemacht werden. Interessanterweise war der Typstamm nicht darunter. Im Stamm MBJ2 wurden zwei Plasmide identifiziert und im Stamm 13 sogar vier. Die Größen reichten von 4 kb bis 12,5 kb. Allgemein konnten Plasmide mit Größen im Bereich von 3 kb bis über 100 kb detektiert werden. In der Genom-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>, Stand: 16.10.2012) sind bislang 46 sequenzierte Plasmide aus insgesamt 35 Stämmen der Gattung *Clostridium* zu finden. Viele sind den Pathogenen *C. botulinum* und *C. perfringens* zugeordnet, es wurden aber auch Plasmide in den nicht-pathogenen Vertretern *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* entdeckt. Die Größen der Plasmide variieren von 2.450 bp (pMCF-1 aus *Clostridium* sp. MCF-1) bis 270.022 bp (pCLJ aus *C. botulinum* Ba4 str. 657). Mit einer Größe von 2.913 bp konnte damit aus *C. acidurici* 9a neben pMCF-1 aus *Clostridium* sp. MCF-1 eines der kleinsten bis jetzt sequenzierten clostridialen Plasmid isoliert werden. Viele Plasmide in Clostridien erreichen Größen von 50-200 kb. In Pathogenen kodieren sie oft Toxine wie das Tetanustoxin in *C. tetani* E88 oder das Botulinumtoxin in diversen Stämmen von *C. botulinum* wie z.B. *C. botulinum* B Eklund 17B. Zusätzlich finden sich bei sowohl pathogenen als auch nicht-pathogenen Vertretern oft Gene auf den Plasmiden, die Resistenzen gegen Antibiotika wie z.B. Tetracyclin (pCW3 aus *C. perfringens* CW92) vermitteln. Aufgrund seiner geringen Größe weist das Plasmid pCuri3 aus *C. acidurici* 9a nur drei potentielle ORFs auf. In einem liegt ein für die Replikation des Plasmids benötigtes Gen, welches mit 55% Übereinstimmung die größten Ähnlichkeiten zu dem Gen *repB* aus *C. butyricum* (pCB101) und mit 51% zu dem aus *Clostridium* sp. (pMCF-1) zeigt (**Abb. 25**). Eine etwa 25%ige Sequenzübereinstimmung konnte zu dem *repB* aus *C. acetobutylicum* (pSOL1) nachgewiesen werden.

```

C. acid  --MTNVSKPIVITGDIINLKVIENRKHNGVIINYYEKFTQEFINITTINKYSGHVTKINNNTGVELDSYFSEDVYIERIFQSNSSDIISKERDSYIDTINN
C. buty  MSLKDSLKKAIEDKDLLKDIINNIEYNKTIKYYERFSKESSIVFKN-----TIIDEN
C. sp.   -----MVFSRPD-----VEK
C. acet  ---MDFENETLEKMEQKRIDYRKYANWYKQMSKDMQEKHLAYAET-----KK

C. acid  RIHNKKKCNQFNLIDKYEKQRIRKDVKNRNLGRD--KFCNSCKKVTQAVRMAYIPEIQQIDGR---LHHLTLTLPNVSGEDLRGIVKHMACEFAKILIRYLS
C. buty  KRDSISFCNKYNLLDKYEKHKIKDFKKTNLCHD--KFCNSCKKVKQASRMAYIPEIQEQKGG---LYHLTLTLPNCSNDLRLTIKHMASKCBLRIVQFID
C. sp.   WKKRLDLCKYWLMDKYEMQKIKDFQKTNLCLD--KFCNCKKVKQASRMAYIPEIPEYREN---LYHLTLTLPNCTGVELRYTYDKAKAKRILRYLT
C. acet  KGERKSKSMNINLWDTIRANKLLDLQKVRRCMNRFCPCNCRKFNLSCAIHNKKPNDLLLDGYYPYLVPLTIPNVLKELKRIIEKMNKAKKIFGAYS

C. acid  GNAK---IHDIDFSSWGYEGAIRSLEVTFNNYRDKIYHPHYHVALVNLN--NDVLSKKNIEKNSYDFRSCSPELRNLFKSEEILLIOKIWRLLIDGKRNKE
C. buty  GRKK---IRGINFG-QAFQGAIRSLEVTFK---NDNYHPHYHVALVNLN--NFKMTDKKYKNKYSYNNKHGKELTRLFSAEELLIOKIWYLLINNITVTRQ
C. sp.   GNLE---WKGLESNWGYKGSVRSLEVTFK---GDSYHPHFHVALLTGTQNFLEGEYENTNVYSYDFRNGFGLKQLFCEQEILLIOKIWYLLNGQKVTKD
C. acet  YDLQGGTTGPKDRLICFEGALKVLEIITYNE-ESNTYHDPHFCLFFSQQYDQELFIKNTPGFESNKRNSYN---FYSLLDQIMKLTIMYFKEIRVNEK

C. acid  NIDNLEIC--YTCVMDKFKENDYAELEFKVLTLEVDENKRIFTYENFKALYHGLYRVKQIQGYGVLYRIKDAINEEFNSKYDEFIPELLGQEKFPSSVST
C. buty  NIEALKDC--YSOCMEKFSENDYAELEFKVMTAVTGEDGFTLYENFVALYGLYRIKQIQGYGVLYNITDDGDLEKLEEEYENYIEQLKQKESPVASYTA
C. sp.   SIDSILKLC--YSCILHQFIDSIDYKQLLST-----
C. acet  VYNNTKLQDCFIDIREMDSAGIVEVLKVTFTDIDIKS---DVFYKKNIELAISNKRIRQGYGILYLNKLEDDADGKLSLEEFNLNES-EVPSLLVVRRI

C. acid  PEDILSDDKYLILSRKSDFEHLKEILFSD
C. buty  PQDLIKDTEYMLLSRKSFKYLINE-----
C. sp.   -----
C. acet  KELLTSYRDYKKLSRQKVVHEDIKI-----

```

Abb. 25: Aminosäure-Alignment des Replikationsinitiationsproteins RepB.

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenz-Alignment des Replikationsinitiationsproteins RepB aus pCuri3 in *C. acidurici* 9a (*C. acid*) mit den Orthologen aus pCB101 in *C. butyricum* DSM 10702 (*C. buty*), pMCF-1 in *Clostridium sp.* MCF-1 (*C. sp.*) und pSOL1 in *C. acetobutylicum* ATCC 824 (*C. acet*). Blau hinterlegte Aminosäuren sind in allen vier Organismen konserviert, grün hinterlegte nur in zwei weiteren neben *C. acidurici* 9a und gelbe in nur einem weiteren. Die Sequenz aus *C. butyricum* DSM 10702 stimmt zu 55% mit der von *C. acidurici* 9a überein, die von *Clostridium sp.* MCF-1 zu 51% und die von *C. acetobutylicum* ATCC 824 zu 25%.

Die zwei weiteren Gene kodieren für hypothetische Proteine, die keine Ähnlichkeiten zu Proteinen in anderen Organismen zeigten. Auch eine Domänensuche blieb erfolglos, so dass kein Rückschluss auf eventuelle Funktionen geschlossen werden kann. Diese sogenannten kryptischen Plasmide, welche anscheinend keinen erkennbaren Einfluss auf den Wirt ausüben, kommen in vielen Bakterien vor. Das Plasmid pCuri3 in *C. acidurici* 9a liegt sehr stabil in der Zelle vor, da auch vielfaches Überimpfen des Stammes keinen Verlust des Plasmids zur Folge hatte. Des Weiteren konnte für die Gene Curi_p00020 und Curi_p00030, welche für die hypothetischen Proteine kodieren, mittels RT-PCR eine konstitutive Transkription nachgewiesen werden (siehe 3.3.2). Zusammengefasst spricht einiges dafür, dass dieses Plasmid zwar vielleicht keine für den Organismus notwendige Funktion beherbergt, wohl aber zumindest einen Vorteil erbringen könnte. 2011 wurde von Srivastava et al. eine Studie zu Wirt-Plasmid-Interaktionen in *Corynebacterium renale* veröffentlicht, ein Bakterium, welches vier kryptische Plasmide (pCR1-pCR4) trägt (Srivastava et al, 2011). Eine Kurierung des Organismus von allen seinen Plasmiden resultierte in einer verminderten Zellgröße und einer verlangsamten Wachstums- und Atmungsrate.

Alle Symptome konnten durch die Transformation des kurierten Stammes mit den vier eigenen Plasmiden gemindert und der Ursprungszustand zumindest zum Teil wieder hergestellt werden. Später fand man dann heraus, dass allein das Plasmid pCR2 (3.153 bp) ausreichte, um die Wachstumsrate wieder zu erhöhen. Die Effekte der anderen drei Plasmide waren zu gering, um unter Laborbedingungen offensichtlich zu werden. Obwohl keine Gene identifiziert wurden, deren Genprodukte wirtsbeeinflussende Funktionen erbringen könnten, schlossen sie daraus eine Art Abhängigkeit zwischen Wirt und Plasmid voneinander, die im Laufe der Coevolution beider entstanden sein könnte. Es wäre daher interessant, *C. acidurici* 9a von seinem eigenen Plasmid zu kurieren und herauszufinden, ob eine ähnliche Abhängigkeit wie bei *C. renale* besteht.

In jüngster Zeit sind kryptische Plasmide ins Licht der Öffentlichkeit im Zusammenhang mit Gentherapie im Kampf gegen Krebs gerückt. Das in der natürlichen menschlichen Darmflora vorkommende Bakterium *Bifidobacterium longum* wurde mit Hilfe seines eigenen kryptischen Plasmids dahingehend verändert, dass es als sicheres und stabiles Liefersystem für Anti-Krebs-Gene in Kombination mit niedrig dosierten chemotherapeutischen Arzneimitteln in der Krebstherapie eingesetzt werden kann (Hu et al, 2009; Xu et al, 2006). Da, wie oben bereits erwähnt, auch Vertreter der Gattung *Clostridium* mittlerweile erfolgreich auf ihre Eignung für die Gentherapie bei Krebs hin getestet wurden, wären kryptische Plasmide wie das aus *C. acidurici* 9a auch hier möglicherweise ein guter Ansatzpunkt. Dabei berücksichtigt werden müsste allerdings die Plasmidkopienzahl, damit eine richtige Dosierung stattfinden kann. Das Plasmid pCuri3 wurde im Zuge dieser Arbeit als ein *low-copy*-Plasmid identifiziert mit einer Kopienzahl von etwa 9 (\pm 1) pro Chromosom (siehe 3.2.1). Diese Zahl wurde allerdings für Zellen gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 5 h Wachstum) bestimmt. Lee et al. zeigten, dass während der Batch-Fermentierung von *E. coli* DH5 α , welcher das Plasmid NS3 trug, die Plasmidkopienzahl abhängig von der Wachstumsphase variierte (Lee et al, 2006). Startete die Kultur noch mit einer hohen Plasmidkopienzahl, so sank sie während der *lag*-Phase auf ihr Minimum, um dann während des exponentiellen Wachstums wieder anzusteigen. Das Maximum konnte in der späten stationären Wachstumsphase bestimmt werden. Sie vermuteten, dass die niedrigere Kopienzahl während der exponentiellen Phase im Vergleich zur stationären Phase darauf zurückzuführen sein könnte, dass während des rapiden Wachstums in der exponentiellen Phase mehrere Chromosomen parallel in der Zelle vorliegen könnten und so die Rate von Plasmid zu Chromosom verfälschten. Es ist möglich, dass dies auch in *C. acidurici* 9a der Fall ist und in verschiedenen Phasen des Wachstums unterschiedliche Kopienzahl gemessen werden

würden. Jedoch würde dies nichts an der Tatsache ändern, dass es sich bei pCuri3 um ein *low-copy*-Plasmid handelt.

4.3 Glycin als Intermediat und Substrat

Die Aminosäure Glycin ist eine Grundkomponente nahezu aller Proteine und spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus aller Organismen. Sie kann sowohl zur Energiegewinnung als auch als wichtige Quelle für C1-Einheiten zur Biosynthese verschiedener Substanzen wie Purinen, Häm-Vorstufen oder Glutathion verwendet werden. Glycin kommt auch derivatisiert in Form von Betain (N, N, N-Trimethylglycin), Sarkosin (N-Methylglycin), Dimethylglycin und Kreatin vor (Karlson, 1974). Untersuchungen zum anaeroben Glycinabbau konzentrierten sich zunächst eher auf die gemeinsame Verwertung mit einem Aminosäurepartner in einer Stickland-Reaktion, bei der Glycin meist reduziert wird, während der andere Partner oxidiert wird (Stickland, 1934). Spätere Untersuchungen brachten dann den Glycin-Serin-Pyruvat-Weg (Sagers et al, 1961; Sagers & Gunsalus, 1961) und den Glycin-Reduktase-Weg (Stadtman, 1958; Stadtman, 1978) zur anaeroben Degradation von Glycin hervor. Die Rolle von Glycin in anaeroben acetogenen Bakterien und seine Verwertung zu Acetat wurde besonders in den purinolytischen Clostridien *C. acidurici*, *C. cylindrosporum* und *C. purinilyticum* untersucht (Barker & Beck, 1941; Dürre et al, 1981; Dürre & Andreesen, 1982b; Dürre & Andreesen, 1983). In *C. acidurici* 9a stellt Glycin ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Verwertung von Purinen zu Acetat dar (Vogels & Van der Drift, 1976). Generell wurde immer angenommen, dass *C. acidurici* genau wie *C. cylindrosporum* und *C. purinilyticum* neben dem Glycin-Serin-Pyruvat-Weg zum Abbau dieser Aminosäure auch über den energetisch günstigeren Glycin-Reduktase-Weg verfügt (Dürre & Andreesen, 1983). Für *C. purinilyticum* und *C. cylindrosporum* konnte eindeutig gezeigt werden, dass Glycin über die Glycin-Reduktase direkt zu Acetat reduziert werden kann (Dürre & Andreesen, 1983; Stadtman, 1978). Dies geschah zum einen durch die Messung der Aktivität der Glycin-Reduktase mit Hilfe von C¹⁴-Markierungstests und die Überprüfung der Bildung von ATP. Für *C. purinilyticum* wurde eine Aktivität von 0,09 U/mg ermittelt, für *C. cylindrosporum* von 0,03 U/mg. Im Gegensatz dazu konnte für *C. acidurici* keine Aktivität gemessen werden. Dies wurde hauptsächlich mit einer größeren Instabilität des Enzyms in *C. acidurici* und nicht

optimalen Versuchsbedingungen begründet. Zum anderen wurde radioaktiv markiertes Glycin als Substrat in Kombination mit unmarkierter Harnsäure verwendet, um nach der Fermentation das Markierungsmuster der C-Atome im Acetat zu überprüfen. Dabei kann sehr gut zwischen der Verwendung der Glycin-Reduktase oder des Glycin-Serin-Pyruvat-Systems unterschieden werden, da im Falle des Glycin-Serin-Pyruvat-Weges eine Positionsverschiebung des entsprechenden C-Atoms durch die Kondensation von Glycin mit Methylen-THF und der anschließenden Decarboxylierung stattfindet. Theoretisch entsteht bei der Verwendung des Glycin-Serin-Pyruvat-Systems durch den Einsatz von 1-¹⁴C-Glycin zu 100% 2-¹⁴C-Acetat und durch den Einsatz von 2-¹⁴C-Glycin zu ca. 75% 1-¹⁴C-Acetat und zu ca. 25% 2-¹⁴C-Acetat (Dürre, 1981). Bei der Verwendung der Glycin-Reduktase ist es andersherum. Durch den Einsatz von 1-¹⁴C-Glycin entsteht zu 100% 2-¹⁴C-Acetat und durch den Einsatz von 2-¹⁴C-Glycin zu 100% 1-¹⁴C-Acetat. Für *C. purinilyticum* wurde bei einer Verwendung von 2-¹⁴C-Glycin eine Markierung von 94,3% des 2-¹⁴C-Acetats ermittelt (Dürre, 1981). Für *C. cylindrosporum* eine von 93,7% (Dürre & Andreesen, 1983). Auch hier fällt *C. acidurici* aus der Reihe, da unter Verwendung von 2-¹⁴C-Glycin nur 78,1% 2-¹⁴C-Acetat entstand. Zusätzlich konnte eine 30% geringere CO₂-Ausbeute als in *C. cylindrosporum* erhalten werden. Prinzipiell würde dies trotzdem eher für die Verwendung der Glycin-Reduktase sprechen als des Glycin-Serin-Pyruvat-Systems, da bei der Verwendung dieses Systems, wie schon erwähnt nur etwa 25% 2-¹⁴C-Acetat, dafür aber 75% 1-¹⁴C-Acetat entstehen sollten. Da in *C. acidurici* 9a keine potentiellen Gene für eine Glycin-Reduktase (und auch für keine Reduktase der Derivate Betain oder Sarkosin) identifiziert wurden, spricht dies eher für die Verwendung des Glycin-Serin-Pyruvat-Weges, dessen benötigte Gene alle im Genom vorhanden waren. Zusätzlich gelten die theoretischen Umsetzungswerte von 2-¹⁴C-Glycin zu 1-¹⁴C-Acetat nur, wenn Austauschreaktionen keine große Rolle spielen. Waber und Wood führten 1979 ähnliche Experimenten mit markiertem ¹⁴CO₂ und ¹⁴CH₂-THF statt 2-¹⁴C-Glycin durch (Waber & Wood, 1979). Damals war die Existenz der Glycin-Reduktase in purinolytischen Clostridien und ihre Abhängigkeit von Selen noch nicht bekannt. Als Bestandteil der Selenoproteine A und B, beides Untereinheiten der Glycin-Reduktase, wird Selen bzw. Selenit benötigt, um eine funktionsfähige Glycin-Reduktase zu erhalten (Andreesen, 1994a). Daher stellten sie durch die Markierungsexperimente eine Verwendung des Glycin-Serin-Pyruvat-Weges fest, da dem Medium kein Selenit zugefügt worden war. Radioaktivität wurde mit ¹⁴CO₂ hauptsächlich im C-1 des Glycins gemessen und mit ¹⁴CH₂-THF im C-2. Trotzdem konnte auch bei ¹⁴CO₂ eine markante Markierung im C-2 des

Glycins festgestellt werden. Sie erklärten dies mit Austauschreaktionen von Glycin und CO₂. Es wäre denkbar, dass eben solche Austauschreaktionen doch eine größere Rolle in *C. acidurici* 9a spielen und deshalb die theoretische Verteilung der Markierungen anders zu betrachten ist. Ein weiterer Hinweis zur Verwendung des Glycin-Serin-Pyruvat-Weges stellt die Abwesenheit eines Thioredoxin-kodierenden Gens in der Genomsequenz von *C. acidurici* 9a dar, welches der natürliche Elektronenakzeptor der Glycin-Reduktase ist. Allerdings ist Thioredoxin nicht nur für dieses Enzym von Wichtigkeit, sondern spielt normalerweise auch in anderen Vorgängen der Zelle eine wichtige Rolle. Es dient generell als eine Protein-Disulfid-Oxidoreduktase durch die reversible Oxidation von zwei Cystein-Thiolgruppen zu Disulfid unter Transfer von zwei Elektronen und Protonen (Tan et al, 2010). Trotz des Fehlens eines offensichtlichen Thioredoxins, wurde ein Gen im Genom von *C. acidurici* 9a identifiziert, welches für eine Thioredoxin-Reduktase (Curi_c10870) kodiert. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System als Alternative zum Glutathion/Glutaredoxin-System bei bestimmten Vorgängen funktionieren kann (Tan et al, 2010). Da entsprechende Gene, die Glutathion und Glutaredoxin kodieren im Genom von *C. acidurici* 9a gefunden wurden, wäre es denkbar, dass diese andersherum auch Aufgaben vom Thioredoxin übernehmen könnten. Alternativ wurde im Genom auch ein Gen identifiziert, welches für ein Thioredoxin-ähnliches Protein kodiert, das Ähnlichkeiten mit einem Thiol:Disulfid-Austausch-Protein aus *E. coli* zeigt. Prinz et al. vermuteten ein alternatives Thioredoxin in *E. coli*, da Mutanten, denen sowohl eine Thioredoxin-Reduktase als auch eine Glutathion-Reduktase oder Glutathion fehlten in der Lage waren mit einer normalen Rate zu wachsen (Prinz et al, 1997). Auch hier wäre es denkbar, dass in *C. acidurici* 9a ein alternatives Thioredoxin vorliegt. Weiterhin für den Glycin-Serin-Pyruvat-Weg spricht die Entdeckung von Lebertz (Lebertz, 1984), dass *C. acidurici* 9a, anders als *C. purinilyticum*, beim Wachstum auf Glycin/Harnsäure weniger auf Selenit angewiesen war und der Glycinumsatz in Abwesenheit von Selenit im Medium mitunter sogar etwas höher ausfiel als beim Vorhandensein von Selenit. Da die Glycin-Reduktase ein Selenit-abhängiges Selenoprotein ist, kann sie nur in Anwesenheit von Selenit aktiv werden (Dürre & Andreesen, 1982b).

Um Glycin als Substrat verwenden zu können, muss gleichzeitig auch ein Purin wie Harnsäure als Co-Substrat anwesend sein, damit das Glycin umgesetzt werden kann (Barker & Beck, 1941; Dürre, 1981). Dies könnte man einerseits darauf zurückführen, dass purinolytische Clostridien die Fähigkeit verloren haben Purine de novo zu synthetisieren. Andererseits vermutete Chen

bereits 1972, dass die Purine als Co-Substrat zum Energiegewinn notwendig sind, um das Glycin überhaupt erst in die Zelle transportieren zu können (Chen, 1972). Diese Hypothese wird durch die Identifizierung eines Glycin/Betain ABC-Transportsystems in dieser Arbeit unterstützt (siehe 3.3.3). ABC-Transporter sind Membranproteine, denen eine ATP-bindende Kasette gemeinsam ist (englisch: *ATP-binding cassette*, ABC). Sie koppeln die Hydrolyse von ATP mit dem Import oder Export von spezifischen Substraten durch die Zellmembran (Davidson & Chen, 2004). Für diesen Vorgang muss dementsprechend Energie aufgewendet werden. Mit Glycin als alleiniges Substrat kann keine Energie produziert werden, da *C. acidurici* 9a erst Purine benötigt, um diese zu generieren, und das Glycin anschließend in die Zelle zu transportieren. Zusätzlich muss sich der Organismus erst an die Verwendung von Glycin von außerhalb gewöhnen. Dies wird anhand von Wachstumsversuchen mit nicht-adaptierten und adaptierten Zellen sichtbar, die in Glycin/Harnsäure-Medium inokuliert wurden (siehe 3.3.3.1). Das Wachstum der nicht-adaptierten Zellen wies eine wesentlich längere lag-Phase auf als das Wachstum von nicht-adaptierten Zellen, die in reines Harnsäure-Medium inokuliert worden waren. Auch die maximal erreichte OD_{600nm} kam nicht an die von Zellen in Medium ohne Glycin heran. Dies war zu erwarten, da von Glycin bekannt ist, dass es in höheren Konzentrationen durch die Inkorporation anstelle des Alanin in das Peptidoglycan der Zellwand die Biosynthese stört und dadurch inhibitorisch wirken kann (Andreesen, 1994b). Dieser Effekt blieb bei adaptierten Zellen, die bereits mehrere Male in Glycin-haltiges Medium überimpft worden waren, aus und das Wachstumsverhalten unterschied sich nicht von Zellen, die in reinem Harnsäure-Medium angezogen worden waren. Eine Transkriptionsanalyse von Genen, die in den Abbau von Glycin durch den Glycin-Serin-Pyruvat-Weg involviert sind zeigte, dass die Transkriptionsstärke von Genen des Glycin-Serin-Pyruvat-Zweiges durch die Zugabe von Glycin erhöht war, während die Transkription der Gene für die Formiat-Dehydrogenase, also des Formimino-THF-Formiat-CO₂-Zweigs, abgeschwächt war (siehe 3.3.3.2). Es wurden zwar keine Untersuchungen zum Transkriptionsstart unternommen, jedoch konnte mit Hilfe des *web*-basierten Programms Rfam 10.1 (<http://rfam.sanger.ac.uk/>) eine *riboswitch*-Struktur (Curi_c00731) ermittelt werden, die unmittelbar vor den Genen des Glycin-Decarboxylase/Synthase-Systems lokalisiert ist. *Riboswitche* sind mRNA-Sekundärstrukturen, die niedermolekulare Metabolite binden und durch eine damit verbundene Konformationsänderung die Expression der Gene des entsprechenden Transkripts regulieren (Nudler & Mironov, 2004). Die Sequenz des in *C. acidurici* 9a identifizierten *riboswitches* weist hohe Ähnlichkeiten zu dem in der Rfam-Datenbank gelisteten

Glycin-*riboswitch* in *E. acidaminophilum* auf (Poehlein, 2008). Es konnten die nach Kwon und Strobel charakteristischen und stark konservierten Sequenzmotive für den Glycin-*riboswitch* ermittelt werden, durch welche sich die typische Tandem-artige Sekundärstruktur ausbilden kann (Kwon & Strobel, 2008). Die Funktionsweise des Glycin-*riboswitches* wurde zuerst in *B. subtilis* entschlüsselt (Mandal et al, 2004), wo er ebenfalls direkt vor den Genen des Glycin-Decarboxylase/Synthase-Systems lokalisiert ist. Er ist der einzige *riboswitch*, welcher sich durch eine Tandem-artige Struktur auszeichnet und die Transkription der Gene downstream durch eine kooperative Bindung von Glycin reguliert (Mandal et al, 2004). Die Bindung von Glycin an Aptamer I bewirkt eine signifikante Steigerung der Affinität von Aptamer II gegenüber weiteren Glycinmolekülen. Dadurch entsteht eine hohe Sensibilität bei Schwankungen der Metabolit-Konzentrationen (Kwon & Strobel, 2008; Mandal et al, 2004). Dies ist nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass Glycin nicht nur als Substrat für Enzyme wie die Glycin-Decarboxylase oder Glycin-Reduktase dient, sondern auch in nahezu allen Proteinen vorkommt und ein wichtiger Bestandteil dieser ist und somit eine strenge Regulierung benötigt wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit ermittelte erhöhte Transkriptionsstärke für das Gen *gcvPB* der Glycin-Decarboxylase durch die zusätzliche Aufnahme von Glycin aus dem Medium und somit der erhöhten Bindung von Glycin am *riboswitch* bewirkt wird. Durch das aus der Harnsäure entstehende Glycin ist zwar eine grundsätzliche Beanspruchung des *riboswitch* gegeben, jedoch wird zusätzliches Glycin auch von außen in die Zelle transportiert, so dass dies den äußerst sensitiven *riboswitch* noch stärker ansprechen könnte. Die dazu gegensätzliche Verminderung der Transkriptionsstärke der Formiat-Dehydrogenase-kodierenden Gene könnte damit zusammenhängen, dass die Zelle nur zu Beginn auf das über Purine gebildete Glycin angewiesen ist und erst später nach dem Abbau der Purine auf das externe Glycin zugreift. Frühere Aufnahmestudien hatten ergeben, dass gerade bei geringen Konzentrationen an Harnsäure (2-4 mM) als CO-Substrat die Umsatzrate von Harnsäure bis zu viermal höher ausfiel als die von Glycin, was darauf hindeutete, dass in der ersten Phase der Inkubation der Schwerpunkt auf den Umsatz von Harnsäure gelegt wird, da diese ein leichter verwertbares Substrat darstellt und dieses Bakterium die Fähigkeit verloren hat, Purine selber zu synthetisieren (Lebertz, 1984). Der Umsatz von Glycin spielte dabei zunächst eher eine untergeordnete Rolle. Erst später würde das externe Glycin verwertet werden, so dass daraus resultierend im Formiat-Zweig des Purinabbaus weniger 5-Formimino-THF gebildet werden würde und entsprechend auch weniger Formiat und CO₂, was einen geringeren Bedarf an Formiat-Dehydrogenase zu Folge hätte.

4.4 Energiekonservierung durch Rnf-Komplex und Elektronenbifurkation

Mit Hilfe der Annotation konnten in *C. acidurici* 9a die Gene eines vollständigen Rnf-Komplexes identifiziert werden. Der Rnf-Komplex wurde zuerst in *Rhodobacter capsulatus* entdeckt und ist dort als NADH-Oxidoreduktase für den Elektronentransport zur Nitrogenase zuständig, um Wasserstoff fixieren zu können (Kumagai et al, 1997). Besonders intensiv untersucht wird dieser Komplex in dem Homoacetogenen *A. woodii* (Biegel et al, 2011). Er besteht aus den sechs Untereinheiten RnfA, RnfB, RnfC, RnfD, RnfE und RnfG (Abb. 26), deren kodierende Gene in einem Operon organisiert sind.

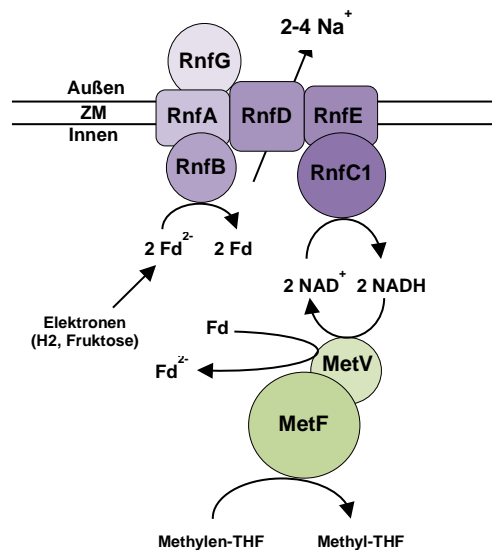


Abb. 26: Der Rnf-Komplex in *A. woodii*.

Dargestellt ist die Lage der sechs Untereinheiten des Komplexes RnfA/B/C/D/E/G (violett) innerhalb der Zellmembran (ZM) und seine indirekte Kopplung über NADH+H⁺ zur Methylen-THF-Reduktase (Untereinheiten MetF und MetV, grün) als Elektroneninput-Modul. Die Abbildung wurde modifiziert nach Poehlein et al. (Poehlein et al, 2012). Fd = Ferredoxin.

Es handelt sich dabei um eine Eisen-Motiv-Elektronentransportkette, die das zelluläre Ferredoxin energetisch mit dem Pyridin-Nukleotid-Pool verbindet. Für *A. woodii* wurde gezeigt, dass dieser Vorgang anders als in *C. ljungdahlii* nicht an den Transport von H⁺ gekoppelt ist (Köpke et al, 2010), sondern an der Translokation von Natrium-Ionen entlang der Membran (Schmidt et al, 2009). Die Natrium-Ionen werden dann wiederum zur Bildung von ATP durch eine Na⁺-abhängige F₁F₀-ATPase genutzt. Untersuchungen zur Na⁺-Abhängigkeit wurden in *C. acidurici*

9a im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht durchgeführt, jedoch wurde zuvor eine gesteigerte Aufnahme von Glycin in Anwesenheit von Na^+ festgestellt (Chen, 1972). Die maximalen Aufnahmeraten konnten dabei durch die Zugabe von 5 mM Na^+ erzielt werden. Lebertz vermutete später aufgrund von weiter gesteigerten Aufnahmeraten selbst bei einer suboptimalen Versorgung mit Na^+ ein sehr effektives Aufnahmesystem bzw. eine intrazelluläre Speicherung dieser Ionen in *C. acidurici* (Lebertz, 1984). Außerdem konnten in dieser Arbeit in *C. acidurici* 9a Aminosäure-Motive identifiziert werden, wie sie typisch sind für eine Na^+ -abhängige F_1F_0 -ATPase (Rahlfs & Müller, 1999). Zusätzlich konnten weitere Na^+ -abhängige Proteine im Genom identifiziert werden, insbesondere Aminosäure-Symporter (Curi_c04120, Curi_c05370, Curi_c19410, Curi_c23520, Curi_c2686) und Efflux-Systeme zur Entgiftung (Curi_c00840, Curi_c03820). Dies deutet alles auf eine wichtige Rolle von Natrium-Ionen in der Zelle an und die Gewinnung von ATP verläuft in *C. acidurici* 9a vermutlich ähnlich zu der in *A. woodii* über die Kopplung von Rnf-Komplex und Na^+ -getriebener F_1F_0 -ATPase. Bei diesem Mechanismus handelt es sich wahrscheinlich um einen sehr alten, der sich relativ früh in der Geschichte der Erde entwickelt hat, da bei einer Verwendung von Na^+ als koppelndes Ion die Membranen undurchlässiger für Na^+ als für H^+ sein müssen (Poehlein et al, 2012). Dies ist eine essentielle Eigenschaft von Organismen, die in Ökosystemen mit hohen Konzentrationen an organischen Säuren leben, die als Protonenüberträger dienen können und so Protonen den Rückeintritt in die Zelle ermöglichen, was die Zerstörung der ohnehin schon geringen zur Verfügung stehenden Kraft zur Betreibung der ATPase zur Folge hätte.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil in diesem System stellt im Falle von *A. woodii* die aus fünf Untereinheiten bestehende Eisen-Hydrogenase dar. Für die Funktion des Rnf-Komplexes wird reduziertes Ferredoxin als Elektronenüberträger benötigt. Dieses kann durch lösliche Elektronenbifurkationssysteme wie der Eisen-Hydrogenase gebildet und die Elektronenbarriere so überwunden werden (Poehlein et al, 2012). Der ganze Metabolismus dieses Organismus ist darauf ausgelegt, so viel reduziertes Ferredoxin wie möglich zur Betreibung des Rnf-Komplexes zu gewinnen. In *C. acidurici* 9a wurden drei Gene identifiziert, die für Untereinheiten einer solchen Eisen-Hydrogenase kodieren (siehe 3.3.5). Diese zeigen starke Ähnlichkeiten zu der ebenfalls trimerischen Hydrogenase aus *Thermotoga maritima* (Schut & Adams, 2009) und den Untereinheiten HydA, HydB und HydC aus *A. woodii*. Ein Vergleich dieser Hydrogenasen und ein hypothetisches Modell der Hydrogenase in *C. acidurici* 9a sind in **Abbildung 27** dargestellt.

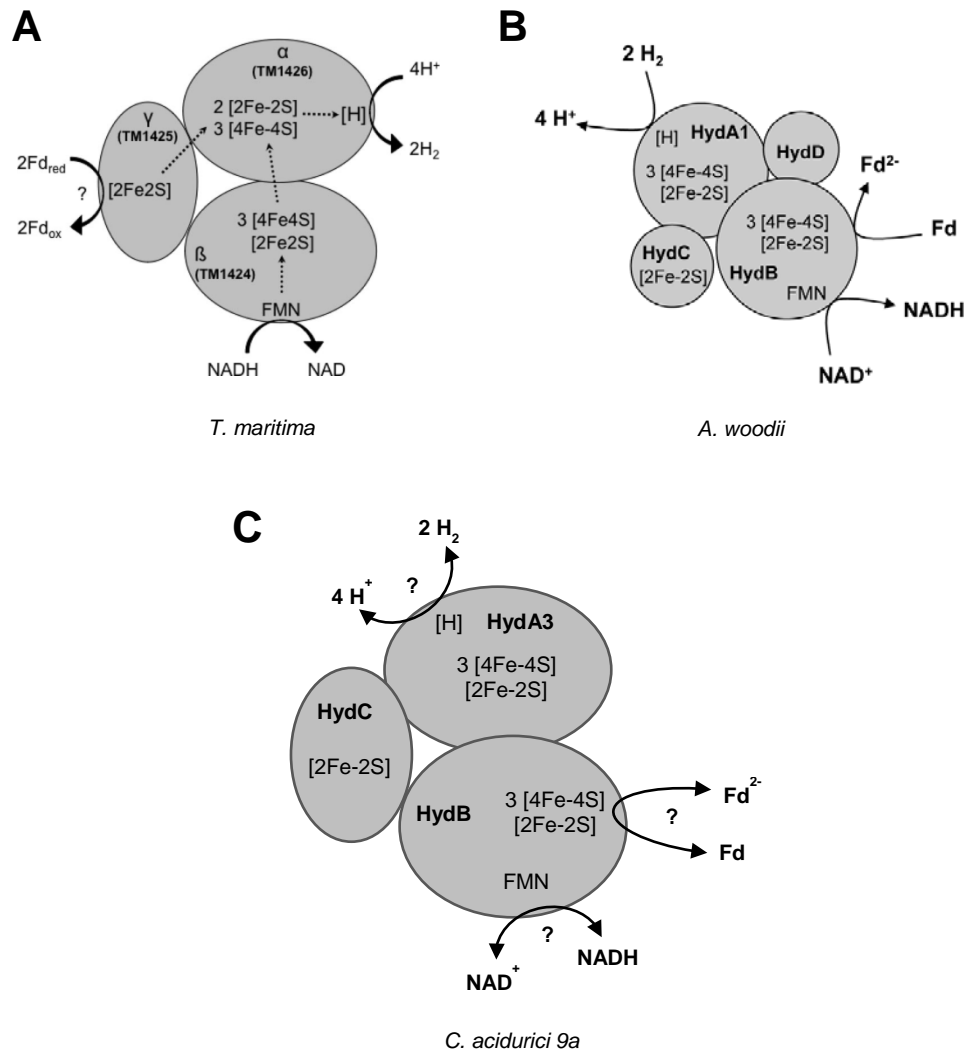
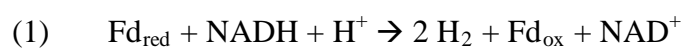


Abb. 27: Vergleichende Darstellung der Eisen-Hydrogenasen aus *T. maritima* (A), *A. woodii* (B) und *C. acidurici 9a* (C).

Die Abbildungen für *T. maritima* und *A. woodii* wurden jeweils aus Schut et al. (Schut & Adams, 2009) und Poehlein et al. (Poehlein et al., 2012) entnommen. Die Abbildung für *C. acidurici 9a* ist hypothetisch. Fragezeichen symbolisieren hier, dass die Richtung der Reaktion unbekannt ist.

Für *T. maritima* wurde folgende energetische Reaktionsgleichung aufgestellt (Schut & Adams, 2009):



Aufgrund der Ähnlichkeit der Hydrogenase aus *A. woodii* zu *T. maritima* wurde für diesen Organismus eine ähnliche Gleichung aufgestellt, die jedoch genau in die entgegengesetzte Richtung verläuft (Poehlein et al, 2012):



Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass zellfreie Extrakte von *A. woodii*, die auf Fruktose gewachsen waren die Wasserstoff-abhängige Reduktion von NAD^+ nur nach der Zugabe von FMN und Ferredoxin aus *C. pasteurianum* katalysieren (Poehlein et al, 2012). Da aus Zeitmangel keine solchen Untersuchungen in *C. acidurici* 9a durchgeführt werden konnten, bleibt die Richtung der Reaktion für diesen Organismus zunächst unbekannt. Für Gleichung (2), also dem Mechanismus wie in *A. woodii* würde allerdings die Tatsache sprechen, dass keine Produktion von Wasserstoff in diesem Organismus festgestellt werden konnte, was stets ein kleines Mysterium war, da Ferredoxin-produzierende Bakterien auch gleichzeitig meist als Wasserstoff-Produzenten bekannt sind (Vogels & Van der Drift, 1976). Interessanterweise wurde keine bzw. nur geringe Aktivität einer Hydrogenase gemessen, was jedoch möglicherweise in den Wachstumsbedingungen begründet liegt.

4.5 Resistenzmechanismen in *C. acidurici* 9a

4.5.1 Antibiotika-Resistenzen

Durch die Annotation des Genoms von *C. acidurici* 9a wurden diverse Gene identifiziert, die für Proteine kodieren, welche in Resistenzmechanismen gegen verschiedene Antibiotika bzw. antimikrobielle Substanzen involviert sind. Die Resistenzen konnten durch Wachstumstests in Flüssigmedium mit entsprechenden Konzentrationen an Antibiotikum nachgewiesen werden (siehe 3.4.1). Die Ergebnisse unterschieden sich dabei zum Teil von vorangegangenen Studien durch Schiefer-Ullrich et al. (Schiefer-Ullrich et al, 1984). Die Versuche wurden in dieser Arbeit in flüssigem Standardmedium durchgeführt anstelle der 1984 verwendeten Antibiotikaplättchen

auf einem Bakterienrasen. Auf diese Methode wurde zurückgegriffen, da *C. acidurici* 9a auf Festmedium kein verlässliches reproduzierbares Wachstum zeigte, in Flüssigmedium dafür aber kontinuierlich anwuchs. Ähnlich zu den Ergebnissen von Schiefer-Ullrich et al. konnte eine schwache Resistenz gegen Vancomycin festgestellt werden. Vancomycin gehört zu den Glykopeptid-Antibiotika, das weithin gegen multiresistente Gram-positive Bakterien, vor allem Staphylococcen, eingesetzt wird, wenn alle anderen Mittel keine Wirkung mehr zeigen. Durch seine Bindung an die terminalen L-Lys-D-Ala-D-Ala Aminosäurereste des Zellwandbausteins Murein inhibiert es die Vernetzung des Peptidoglykans innerhalb der Bakterienzellewand, wodurch diese dem hohen osmotischen Druck nicht mehr standhalten kann und platzt. In Vertretern der Enterococcen sind mittlerweile sechs Typen an Vancomycin-Resistenz bekannt (Courvalin, 2006). Alle funktionieren auf ähnliche Weise, indem (1) der C-terminale D-Alanin-Rest in einem modifizierten Peptidoglykanvorläufer durch D-Lactat oder D-Serin ersetzt wird, damit Vancomycin keine Bindung eingehen kann und (2) der normal produzierte Vorläufer mit dem D-Alanin-Rest, dem Ansatzpunkt für das Vancomycin, eliminiert wird (Arthur et al, 1996). Da ein Gen identifiziert wurde, dessen Genprodukte die größte Ähnlichkeit zu dem Vancomycin B/G-Typ Resistenzprotein VanW und der D-Alanin-D-Serin Ligase VanG aufwiesen, wird für *C. acidurici* 9a unter Berücksichtigung der Ergebnisse von McKessar et al. in *Enterococcus faecalis* (McKessar et al, 2000) eine Vancomycin-Resistenz des G-Typs angenommen. Zusätzlich sind laut McKessar in *Enterococcus* G-Typ Resistenzsysteme bekannt dafür, nur mäßige oder leichte Resistenz gegen Vancomycin (MIC = 16 µg/ml) zu vermitteln. Dies konnte in *C. acidurici* 9a bestätigt werden. Die minimale inhibitorische Konzentration an Vancomycin lag bei etwa 20 µg/ml, so dass eine G-Typ-Resistenz wahrscheinlich ist.

Obwohl leichte Unterschiede zu Ergebnissen von Schiefer-Ullrich et al. auch für die Antibiotika Ampicillin und Erythromycin festzustellen sind, können diese eventuell im Zusammenhang mit den unterschiedlichen verwendeten Testsystemen stehen. Der Test von 1984 mit Antibiotikaplättchen auf einem Rasen von *C. acidurici* 9a zeigte eine Sensitivität gegen diese beiden Antibiotika. In dieser Arbeit wurde jedoch mäßiges Wachstum und somit nur eine geringe Sensitivität festgestellt. Die spontane Entstehung einer resistenten Mutante ist eher unwahrscheinlich, da die Tests aus unabhängigen Kulturen in Triplikaten durchgeführt wurden. Weiterhin spricht die Entdeckung von Resistenzgenen gegen diese Antibiotika bei der Annotation von *C. acidurici* 9a für die Ergebnisse dieser Arbeit.

Die größten Unterschiede zu den Ergebnissen von Schiefer-Ullrich et al. zeigten sich bei dem Antibiotikum Bacitracin. Auch gegen dieses Antibiotikum wurde in Versuchen eine Sensitivität festgestellt, während *C. acidurici* 9a in dieser Arbeit eine hohe Toleranz gegenüber diesem Antibiotikum zeigte und auch in höheren Konzentrationen konnte keine Verminderung des Wachstums festgestellt werden. Auch hier konnten resistenzvermittelnde Gene in Form eines ABC-Transporters ermittelt werden, welche die Ergebnisse stützen.

Es gab zwar Probleme mit der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen bei einem Wachstum von *C. acidurici* 9a auf Festmedium, weswegen auf die Alternative in Flüssigmedium zurückgegriffen wurde, aber ob die Unterschiede in den Ergebnissen allein mit den verschiedenen Testsystemen erklärt werden können, bleibt fraglich. Da die Zellen die ganze Zeit über in Reinkultur gehalten worden waren, wäre auch eine Veränderung des Stammes über die Jahre hinweg mit einer einhergehenden Resistenz gegenüber mehrerer Antibiotika als eher unwahrscheinlich einzustufen.

4.5.2 Metall-Resistenzen

Mit klassischen Wachstumsversuchen wurde überprüft, wie *C. acidurici* 9a sich mit zunehmender Konzentration an Metallsalzen im Medium verhält. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum mit steigenden Konzentrationen an Kupfer und Zink zunehmend gehemmt wurde. Ursprünglich sollte die Toleranzgrenze von *C. acidurici* 9a gegenüber diesen beiden Metallen festgestellt werden. Diese Grenze wird als MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) bezeichnet, also als die geringste Konzentration, die benötigt wird, um das Wachstum vollständig zu inhibieren. Das Anzuchtmedium für *C. acidurici* 9a enthält standardmäßig das Reduktionsmittel Thioglykolsäure, welches in der Lage ist Chelate mit Metallionen einzugehen und sie so zu binden (Soliman et al, 2002). Dies bedeutet, dass die errechnete Konzentration an Zink und Kupfer im Harnsäuremedium von *C. acidurici* 9a nicht mehr gegeben wäre und die Bestimmung des MIC verfälschen würde. Für Kupfer stellte sich eine vollständige Hemmung des Wachstums bei 12 mM CuCl_2 ein, für Zink bei 28 mM ZnCl_2 , jedoch können diese Werte dementsprechend nicht als MIC angesehen werden. Dies zeigt sich auch in einem Vergleich mit anderen Organismen. Während für Vertreter der Gram-negativen Gattung *Acinetobacter* (Dhakephalkar &

Chopade, 1994) oder dem Gram-positiven *B. niacini* (Abou-Shanab et al, 2007) ebenfalls hohe Toleranzen gegenüber Kupfer nachgewiesen werden konnten und der MIC in mehreren Fällen bei über 10-15 mM CuCl₂ lag, erschien die Toleranzgrenze von 28 mM ZnCl₂ doch recht hoch. In den schon oben zum Vergleich herangezogenen Referenzen konnte höchstens eine Toleranz von 20 mM ZnCl₂ erreicht werden und dies auch nur, weil einige der Organismen aus Böden isoliert wurden, die von vorn herein eine hohe Metallbelastung aufwiesen (Abou-Shanab et al, 2007), so dass eine Anpassung der Bakterien an die Umgebung denkbar erscheint. Wollte man einen realistischen MIC für Kupfer und Zink in *C. acidurici* 9a bestimmen, müsste zunächst ein anderes Reduktionsmittel eingesetzt werden. Da die gängigen und für *C. acidurici* 9a erfolgreich verwendeten Reduktionsmittel wie L-Cystein oder H₂S jedoch hoch reaktive schwefelige Seitengruppen (Thiolgruppen etc.) besitzen, die ebenfalls mit den Metallsalzen reagieren würden (Grobosch et al, 2006) erweist sich die Suche nach einem geeigneten Reduktionsmittel als schwierig, zumal alle anderen Experimente ebenfalls in diesem Medium durchgeführt werden müssten, um vergleichbare Bedingungen herzustellen. Deshalb wurde für die folgenden Versuche zur Bestimmung der Wirkungsweise des Kupfer-Homeostasisystems weiterhin auf Thioglycolsäure zurückgegriffen, da eine grundlegende Inhibierung gegeben war und der Mechanismus und seine Wirkungsweise prinzipiell dadurch nicht gestört oder verändert werden sollten.

4.5.2.1 Das *cop*-Operon von *C. acidurici* 9a und seine Wirkungsweise

Da mit dem *cop*-Operon aus *C. acidurici* 9a ein vollständiges Homeostasis-System identifiziert wurde, wie es als Homolog auch in anderen Organismen vorkommt, sollte es genauer untersucht werden. **Abbildung 28** zeigt die Organisation des *cop*-Operons in *C. acidurici* 9a im Vergleich zu Homologen des Operons aus anderen Organismen. In den meisten Organismen kodiert *copA* für die Kupfer P-Typ ATPase, welche für den Export von Cu⁺ aus der Zelle heraus verantwortlich ist. In *B. subtilis* ist mit *copB* ein weiteres ATPase-kodierendes Gen im selben Operon kodiert, welches ebenfalls den Export von Cu⁺-Ionen unterstützt (Gaballa & Helmann, 2003). Das Chaperon CopZ ist allen Organismen gemein. Es bindet die in die Zelle eintretenden Cu⁺-Ionen fest an sich und eskortiert sie zu ihren Zielproteinen wie z.B. CopA.

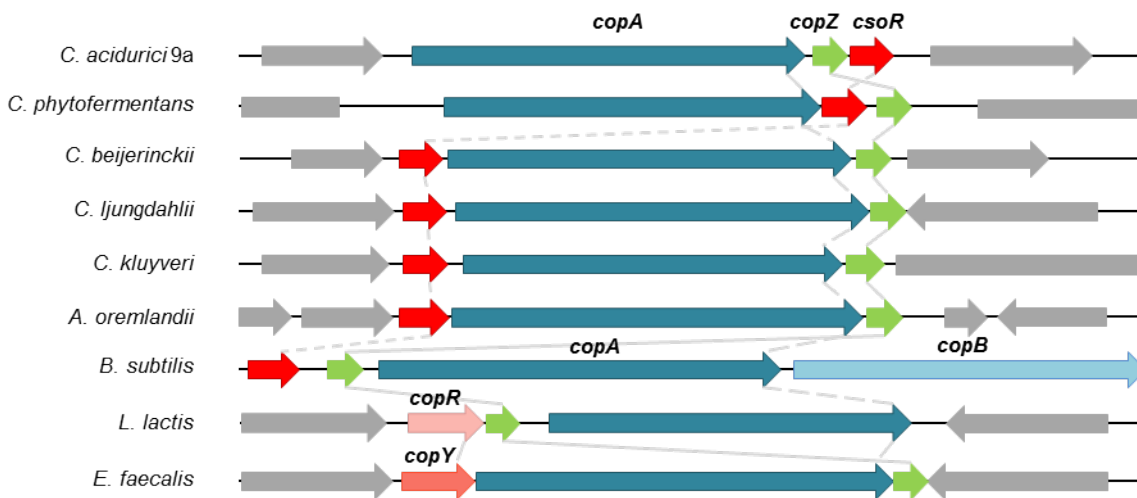


Abb. 28: Organisation des *cop*-Operons in *C. acidurici* 9a im Vergleich zu Homologen aus anderen Organismen.

Dargestellt ist die Organisation des *copAZ-csoR*-Lokus von *C. acidurici* 9a im Vergleich zu den Kupfer-Homeostasis-Systemen von *Clostridium phytofermentans* ISDg, *Clostridium beijerinckii* DSM 791, *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528, *Clostridium kluyveri* DSM 555, *Alkaliphilus oremlandii* OhILAs, *Bacillus subtilis* 168, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 und *Enterococcus faecalis* 62. Die Gene *copA* und *copB*, welche für Kupfer P-Typ ATPasen kodieren sind in blau oder hellblau dargestellt, die für das Kupfer Chaperon kodierenden *copZ*-Gene in grün und die Gene für die verschiedenen Typen von transkriptionellen Repressoren in Rottönen. Benachbarte Gene sind in grau angedeutet.

In *Enterococcus faecalis* und *Lactococcus lactis* ist die Transkription des *cop*-Operons durch die transkriptionellen Repressoren CopY und CopR reguliert, die beide zu den sogenannten CopY-Typ Repressoren gehören. Bei niedrigen Konzentrationen an Cu^+ ist im Zentrum des Homodimers dieser Art von Repressoren ein einzelnes Zn^{2+} -Ion gebunden. Der Repressor selber ist an die Operator-Promotor-Region des *cop*-Operons gebunden, dem sogenannten *cop*-Box-Motiv. Steigt die Konzentration an Cu^+ in der Zelle an, eskortiert CopZ Cu^+ -Ionen zu CopY (bzw. CopR) und das gebundene Zn^{2+} -Ion wird durch das Cu^+ -Ion ausgetauscht. Dies verursacht eine Konformationsänderung und die Bindung an das *cop*-Box-Motiv lockert sich, so dass der Repressor von der DNA dissoziiert und die Transkription des *cop*-Operons initiiert werden kann (Cobine et al, 2002). *Bacillus subtilis* und Clostridien wie *C. acidurici* 9a besitzen eine andere Art von transkriptionellem Repressor, den sogenannten CsoR-Typ. Diese Repressoren sind tetramerisch mit zwei Monomeren, die jeweils ein stabiles Homodimer bilden, das eine antiparallele Vier-Helix-Bündel-Architektur annimmt. Jedes Homodimer bindet zwei Cu^+ -Ionen, die so eine Brücke zwischen den beiden Untereinheiten bilden. Zwei dieser Tetramere binden

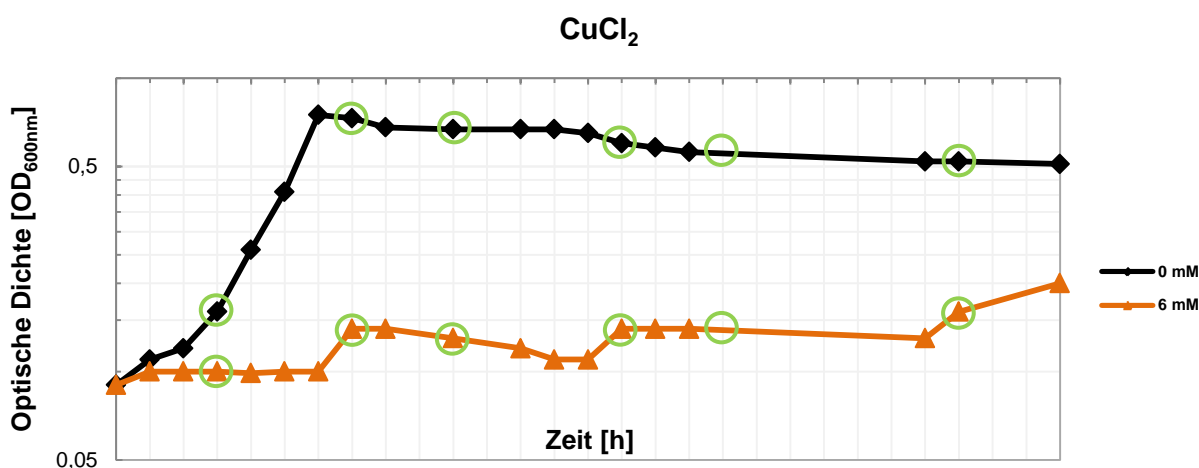
wiederum an eine 30 bp-umfassende Region stromaufwärts des *cop*-Operons, die den Promotor überlappt und verhindern so die Transkription der *cop*-Gene. Durch die Bindung weiterer Cu^+ -Ionen wird eine Konformationsänderung ausgelöst und CsoR dissoziiert von der DNA, so dass eine Transkription erfolgen kann (Liu et al, 2007; Ma et al, 2009; Smaldone & Helmann, 2007).

Auffällig ist hierbei die Tatsache, dass die Lokalisation des Repressor-Gens in *C. acidurici* 9a unterschiedlich ist im Vergleich zu allen anderen Organismen. Während es sonst üblicherweise direkt am Anfang des Operons lokalisiert ist, befindet es sich in diesem Organismus am Ende des Operons. Einzig *C. phytofermentans* weist ebenfalls eine abweichende Organisation auf. Wie auch bei *C. acidurici* 9a ist die ATPase am Anfang des Clusters lokalisiert. Jedoch folgt darauf, anders als bei *C. acidurici* 9a, zunächst der Repressor *csor* und das Chaperon bildet den Schluss.

Die Wachstumskurven von *C. acidurici* 9a zeigten bei der Zugabe von CuCl_2 einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf, der mehrere Wachstums- und Plateauphasen aufwies. Es wurde vermutet, dass diese wechselnden Phasen mit der Funktionsweise des *cop*-Operons verbunden sein könnten. Es wurde angenommen, dass während der Plateauphasen die Gene *copA* und *copZ* stärker transkribiert werden als während der Wachstumsphasen, so lange, bis die Konzentration an intrazellulärem Kupfer wieder in einem für die Zelle akzeptablem Bereich liegt und Wachstum stattfinden kann. Während der Wachstumsphasen würde die Transkription absinken und wieder Kupfer in die Zelle gelangen, was das Wachstum nach einiger Zeit hemmen und in eine weitere Plateauphase resultieren würde. Während dieser Phase sollte die Transkription des Regulators *csor* absinken, wodurch wiederum eine stärkere Transkription von *copA* und *copZ* ausgelöst würde und Kupfer aus der Zelle gepumpt werden kann. Um dies zu überprüfen wurden zunächst semi-quantitative Transkriptionsanalysen der involvierten Gene des *cop*-Operons mit Hilfe von RT-PCR durchgeführt (siehe 3.4.2.2). Da hieraus jedoch keine klaren Ergebnisse gewonnen werden konnten, da keine expliziten Unterschiede in den Transkriptionsstärken nachweisbar waren, wurde ein sensitiveres System basierend auf *real-time* qPCR verwendet (siehe 3.4.2.2).

Mit Hilfe dieses Systems war es möglich Unterschiede in der Transkriptionsstärke der Gene des *cop*-Operons zu unterschiedlichen Wachstumsphasen nachzuweisen. Die Transkriptionsrate der Gene *copA* und *copZ*, welche die prinzipielle Arbeit bei der Anwesenheit von Kupfer-Ionen verrichten, d.h. diese binden und aus der Zelle pumpen, war von Anfang des Wachstums an leicht erhöht im Vergleich zur Transkription dieser Gene in Abwesenheit von Kupfer, während sich die Transkriptionsrate für *csor*, den Repressor des Operons, nicht änderte. Erst nach 7 h Wachstum, also innerhalb der ersten Wachstumsphase, steigt die Transkription sowohl für *csor* als auch für

copZ und *copA* an. In der nächsten Plateauphase, also nach 10 h, fällt sie wieder ab. Von dort an bleibt sie bei allen Genen niedrig im Vergleich zum Normalzustand, egal, ob es sich um eine Plateau- oder Wachstumsphase handelt. Erst nach 25 h ist ein erneuter Anstieg zu verzeichnen, insbesondere bei *copA*. Dem Muster folgend, sollte normalerweise auch nach 15 h in der nächsten Wachstumsphase bereits ein Anstieg stattfinden, was hier nicht der Fall war. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass die Proben zu Zeitpunkten genommen wurden, die sich aus vorangegangenen Wachstumsversuchen heraus als günstig erwiesen hatten. Nach 15 h sollte demnach eine Wachstumsphase erreicht sein. Eine Rekonstruktion der Wachstumskurve während der Probennahme (Abb. 29) zeigt jedoch, dass zum Zeitpunkt 15 h bereits das Ende der Wachstumsphase, eventuell sogar schon der Anfang einer neuen Plateauphase erreicht war und somit die Transkription der Gene bereits wieder heruntergefahren wurde.



<i>copA</i> [R]	3,4973	5,5031	1,1064 x 10 ⁻⁵	0,0020	0,0141	45,1678
<i>copZ</i> [R]	3,4527	5,4621	0,0882	0,0941	0,0607	0,7208
<i>csoR</i> [R]	0,0013	5,0367	0,0017	6,2304 x 10 ⁻⁵	0,0015	1,6107

Abb. 29: Verfolgung des Wachstums von *C. acidurici* 9a mit CuCl₂ und Zeitpunkte der Probennahme.

Für die Probennahme für die RT-PCR und *real-time* qPCR wurde *C. acidurici* 9a in Harnsäure-Medium mit 6 mM (orange) CuCl₂ angezogen. Harnsäure-Medium ohne CuCl₂ diente als Referenz (schwarz). Die Zeitpunkte der Probennahme sind durch grüne Kreise markiert. Die Zeitpunkte wurden so festgelegt, dass jeweils in den Wachstumsphasen und in den Plateauphasen zumindest eine Probe vorhanden war. Aus der Referenzkultur wurden parallel zu jedem Zeitpunkt ebenfalls Proben genommen.

Um diese Vermutung zu überprüfen und den Versuch zu wiederholen war leider nicht genug Zeit gegeben. Ausgehend von ihrer Richtigkeit kann jedoch gesagt werden, dass die

Transkriptionsrate jedesmal erhöht ist, wenn sich der Organismus in einer Wachstumsphase befindet und herunterfährt, sobald wieder eine Plateauphase erreicht ist. Dementsprechend scheint die Vermutung vom Anfang, dass die Transkriptionsrate während der Plateauphasen erhöht ist und die überschüssigen Ionen aus der Zelle gepumpt werden, nur zum Teil den Tatsachen zu entsprechen. Vielmehr scheint es so zu sein, dass während der Wachstumsphasen die produzierte Energie genutzt wird, um die Transkription anzukurbeln. Die Konzentration an Kupfer-Ionen steigt vermutlich während dieser Phase in der Zelle an, so lange, bis die normalen Vorgänge in der Zelle durch die überschüssigen Kupfer-Ionen derart gestört sind, dass kein Wachstum mehr stattfinden kann, da die benötigte Energie in den Efflux der Ionen investiert wird. Erst wenn eine akzeptable Ionen-Konzentration wieder erreicht ist, kann wieder Wachstum stattfinden, während dessen wieder genug Energie zur Erhöhung der Transkriptionsrate der *cop*-Gene zur Verfügung steht. Nicht ganz in diese Theorie passen die parallel verlaufenden Transkriptionsratenänderungen von *csor* und den restlichen Genen des Operons. Die erhöhte Transkription eines Repressors sollte eher in eine niedrigere Transkription der dadurch regulierten Gene führen, d.h. es wäre zu erwarten gewesen, dass die Transkription des Repressorgens während der Wachstumsphasen nachlässt und gegensätzlich zur Transkription der restlichen Gene verläuft. Da eine Promotorsuche im Bereich des *cop*-Operons von *C. acidurici* 9a anders als bei *B. subtilis* (Smaldone & Helmann, 2007) lediglich einen Promotor direkt vor *copA*, jedoch nicht vor *csor* zeigte (Abb. 30), macht eine parallele Änderung der Transkriptionsrate wiederum Sinn. Obwohl keine konkreten Hinweise darauf vorliegen, wäre es trotzdem denkbar, dass die Regulation des Repressors daher auf einer zusätzlichen Ebene wie der Translation stattfindet.

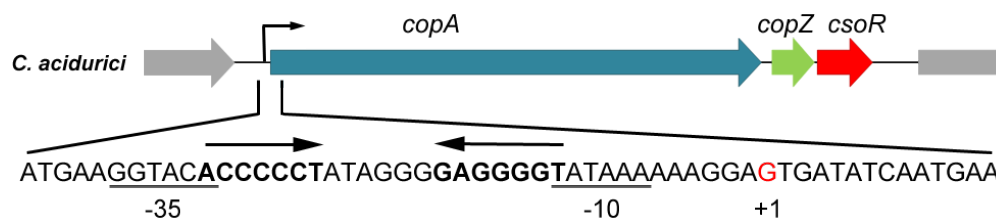


Abb. 30: Schematische Darstellung des *copAZ-csoR* Lokus und seine vorhergesagte Promotor-Region.

Die Sequenz der Promotor-Region des *copAZ-csoR*- Operons in *C. acidurici* 9a wurde herausgestellt, um die verschiedenen vorhergesagten Promotor-Elemente darzustellen: die -35 und -10 Regionen sind unterstrichen, die +1 Stelle ist in Rot dargestellt und die Nukleotide in Fettschrift repräsentieren die vermuteten GC-reichen pseudoinvertierten *Repeats*, die als Bindemotiv für CsoR dienen.

Zusätzlich konnte anhand von Referenzorganismen das mutmaßliche Bindemotiv von CsoR, ein GC-reicher pseudoinvertierter *repeat* (Smaldone & Helmann, 2007), innerhalb der Promotor-Region ausgemacht werden (**Abb. 30**), so dass anzunehmen ist, dass die Funktionsweise des in *C. acidurici* 9a kodierten CsoR der in anderen Organismen wie *B. subtilis* (Ma et al, 2009; Smaldone & Helmann, 2007) und *M. tuberculosis* (Liu et al, 2007) entspricht.

Nichtsdestotrotz kann im Rahmen dieser Ergebnisse über die genaue Funktionsweise des *cop*-Operons in *C. acidurici* 9a und dem Zusammenhang zum Wachstumsverhalten dieses Organismus in Gegenwart von Kupfer nur spekuliert werden, so dass weitere Untersuchungen notwendig wären. Insbesondere sollte die Probennahme wiederholt werden, so dass sichergestellt ist, dass mindestens eine, besser zwei Proben zu jeder Wachstums- und Plateauphase vorhanden sind und die *real-time* qPCR mit diesen Proben erneut durchgeführt werden kann. Eine Untersuchung direkt auf Proteinebene, z.B. durch Western Blot Analysen könnte nähere Informationen über die Regulation des Repressors bringen.

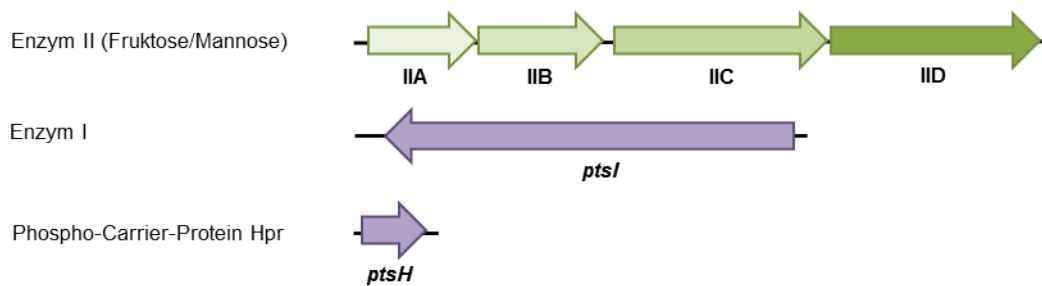
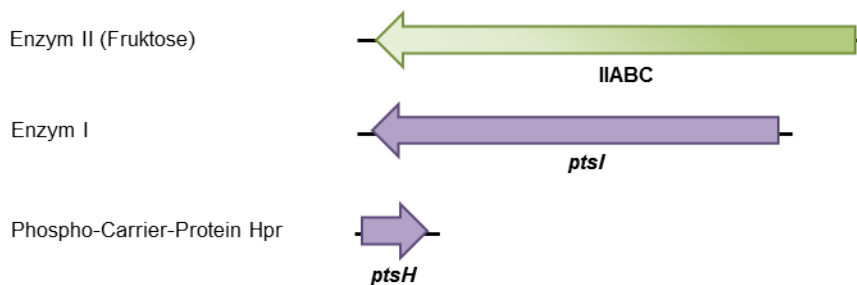
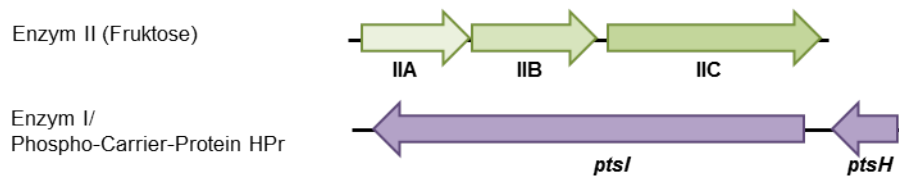
4.6 Genetische Zugänglichkeit und DNA-Transfer in *C. acidurici* 9a

Zur weiteren Untersuchung eines Organismus oder einer eventuellen Nutzung in der Industrie wird es früher oder später notwendig, diesen genetisch zugänglich zu machen und Methoden des DNA-Transfers zu etablieren, um z.B. gerichtet Mutagenese betreiben zu können. Die Hauptmotivation dahinter war die Überlegung, ob dieser Organismus mit einem clostridialen Phosphotransferasesystem ausgestattet werden kann, um dann in der Lage zu sein, Zucker als Substrat zu verwenden (vgl. 3.3.4). *C. acidurici* 9a verfügt über die komplette genetische Ausstattung, um Glykolyse betreiben zu können, jedoch fehlt es ihm an Genen, die für ein vollständiges Phosphotransferasesystem kodieren. Es wurden potentielle Gene für ein Phospho-Carrier-Protein und eine mögliche EIIC-Komponente identifiziert (siehe 3.3.4.1), jedoch keine Kandidaten, die für weitere Untereinheiten des Enzyms II oder Enzym I kodieren. Die Vermutung lag nahe, dass dies einer der Gründe ist, weswegen Zucker nicht verwertet werden können, da sie gar nicht erst oder nur in sehr geringen Mengen in die Zelle gelangen. Chen fand in früheren Untersuchungen jedoch heraus, dass neben Purinen zumindest auch Fruktose den energieaufwendigen Transport von Formiminoglycin in die Zelle unterstützen kann, während

Glukose keine Wirkung zeigte und ungeeignet erschien (Chen, 1975). Zwar erfolgte der Transport mit Hilfe von Fruktose mit einer um etwa 54% niedrigeren Rate als mit Hilfe von Harnsäure, aber irgendwie muss es dem Organismus gelungen sein, genug Energie aus der Fruktose zu gewinnen, dass Formiminoglycin in die Zelle transportiert werden kann, d.h. grundsätzlich scheint *C. acidurici* in der Lage zu sein, Fruktose zur Energieverwendung zu verwerten. Ob die Verwertung dann jedoch nicht so weit geht, das Wachstum möglich ist, oder lediglich nicht genug Fruktose in die Zelle gelangt, durch z.B. bisher unbekannte ineffektive Transportsysteme, bleibt dabei offen. Aufgrund dieser Tatsachen würden die Fruktose-spezifischen PTS aus *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. ljungdahlii* DSM 13528 oder *C. difficile* 630 (**Abb. 31**) mögliche Kandidaten für den Transfer in *C. acidurici* 9a darstellen.

Zunächst müsste allerdings ein System zum DNA-Transfer etabliert werden, damit besagtes PTS exprimiert werden könnte. Natürliche Kompetenz wie sie unter anderem in *Bacillus subtilis* vorkommt (Kunst et al, 1997; Solomon & Grossman, 1996), konnte bei Clostridien bis jetzt noch nicht festgestellt werden, weshalb bei der Etablierung eines DNA-Transfer-Systems hauptsächlich auf solche Methoden gesetzt werden muss, die eine Veränderung der Zellhülle beinhalten. Dabei sollten Methoden wie Transformation durch Elektroporation mit entsprechend ausgestatteten Plasmiden angewendet werden, da diese im Gegensatz zu komplizierten und zeitaufwendigen Methoden wie der Protoplasten-Transformation eine schnelle und effiziente Möglichkeit des DNA-Transfers bieten.

Eine weitere natürliche Methode wie es auch die natürliche Kompetenz darstellt bietet die Konjugation, die ähnlich zur Transformation durch Elektroporation relativ unkompliziert vonstattengeht und den Einsatz eines Plasmids erfordert. Es wurde daher versucht, Protokolle für diese beiden Methoden zu etablieren. Als zu transferierende DNA wurde zunächst der für beide Methoden geeignete Vektor pKV12 verwendet, der in früheren Studien sowohl für Elektroporation als auch für die Konjugation erfolgreich bei Clostridien und anderen Gram-positiven eingesetzt worden war (Strätz et al, 1994). Für die Transformation des Plasmids durch Elektroporation wurde ein modifiziertes Protokoll angewendet, welches ursprünglich für die Elektroporation mit *C. ljungdahlii* entwickelt wurde (Köpke et al, 2010). Es konnten allerdings auch mit verschiedenen weiteren Modifikationen keine Transformanten erhalten werden. Für eine erfolgreiche Transformation müssten daher weitere Parameter verändert und das Protokoll weiter modifiziert werden, was aus Zeitgründen zur Zeit der Arbeit nicht mehr möglich war.

A *C. acetobutylicum***B** *C. ljungdahlii***C** *C. difficile***Abb. 31: Kandidatengene zur Klonierung von Fructose-spezifischen Phosphotransferase-Systemen.**

Dargestellt ist die Organisation der Genloci der einzelnen Komponenten von (Fructose-spezifischen) Phosphotransferase-Systemen aus (A) *C. acetobutylicum* ATCC 824, (B) *C. ljungdahlii* DSM 13528 und (C) *C. difficile* 630. Die Untereinheiten des substratspezifischen Enzyms II werden entweder von separaten Genen kodiert (IIA, IIB, IIC, IID) oder von einem einzigen Gen mit verschiedenen Domänen (IIABC). Das Gen *ptsI* kodiert jeweils für das substratspezifische Enzym I und *ptsH* für das Phospho-Carrier-Protein I.

Ein nicht zu unterschätzender Faktor stellt bei der Methode der Elektroporation die Osmolarität der Puffer und Medien dar. Xue *et al.* (Xue et al, 1999) fanden 1999 heraus, dass für die Grampositiven Organismen *B. subtilis* und *B. licheniformis* eine höhere Osmolarität zu einer gesteigerten Effizienz der Transformation führte. In dem für die Elektroporation von *C. acidurici*

9a verwendeten Protokoll wurde lediglich dem SMP-Elektroporationspuffer eine osmotisch aktive Substanz in Form von Saccharose zur Stabilisierung der Zellen hinzugefügt (siehe **2.8.2**). Für mehrere Gram-positive Organismen wurde beobachtet, dass die Zugabe von osmotisch stabilisierenden Substanzen wie Saccharose oder Sorbitol bereits im Anzuchtmedium zur Erlangung von Elektrokompetenz zusammen mit Zellwand-schwächenden Substanzen wie DL-Threonin oder Glycin und einer zusätzlichen osmotisch aktiven Substanz hinterher im Regenerationsmedium einen bedeutenden Unterschied erbrachte und Organismen, die mit den herkömmlichen Protokollen nicht zu elektroporieren waren, mit dieser Methode Erfolg zeigten (Luchansky et al, 1988; Rachinger, 2010; Wei et al, 1995). Dies würde eine gute Möglichkeit der Modifikation des Elektroporationsprotokolls für *C. acidurici* 9a bieten, da der Organismus so während des gesamten Prozesses der Elektroporation osmotisch stabilisiert wäre, denn die Integrität der Zellwand wird während des ganzen Vorgangs stark beeinträchtigt, was zum Zelltod führen kann (Tsong, 1991). Auch der Zeitpunkt der Ernte der kompetenten Zellen spielt eine wichtige Rolle. So wurde für *C. perfringens* (Jirásková et al, 2005) und *B. subtilis* (McDonald et al, 1995) gezeigt, dass die Verwendung von Zellen aus der früheren exponentiellen Wachstumsphase effizienter elektroporiert und DNA transferiert werden konnte als in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Die Zellen von *C. acidurici* 9a wurden für die Elektroporation protokollgemäß bei einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 geerntet, was bereits der mittleren bis späten exponentiellen Wachstumsphase entsprach. Die Zellen könnten demnach auch schon früher bei einer OD_{600nm} von etwa 0,3 geerntet werden, um die Chance auf Erfolg zu erhöhen.

Eine weitere Möglichkeit, warum der DNA-Transfer in *C. acidurici* 9a mit Hilfe von Elektroporation nicht möglich war, könnte der Vektor pKV12 selbst sein. Er besitzt zwar alle Eigenschaften, um in Gram-positiven Bakterien zu replizieren und trägt auch resistenzvermittelnde Markergene, aber da er gleichzeitig auch für die Konjugation verwendet werden sollte, besitzt er noch weitere Gene, die dafür notwendig sind, um als Shuttlevektor zu dienen. Deshalb beläuft sich die Gesamtgröße dieses Vektors auf knapp 16 kb (siehe **3.5**), was recht groß ist und bei der Elektroporation eventuell hinderlich. Je geringer die Größe der zu transferierenden DNA, desto besser lässt sie sich durch Elektroporation übertragen, d.h. mit ansteigender Größe des Plasmids, verringert sich die Effizienz der Elektroporation (Ohse et al, 1995). Ein anderer Vektor mit geringerer Größe oder eine modifizierte Version des Vektors pKV12 ohne die für die Konjugation erforderlichen Faktoren sollten deshalb für weitere Versuche eingesetzt werden. Eine gute Möglichkeit bietet hier das in 2009 von Heap et al.

speziell für Clostridien entwickelte modulare Shuttle-Vektor-System pMTL80000 (Heap et al, 2009), das aus fünf Vektoren mit untereinander kombinierbaren Eigenschaften besteht und somit vielfältige Möglichkeiten der Anpassung an den jeweiligen *Host*-Organismus ermöglicht. Es kann in vier Modulen unter fünf verschiedenen Gram-positiven Replikons, vier Resistenzmarkern, zwei Gram-negativen Replikons und fünf applikationsspezifischen Elementen, die z.B. eine multiple *Cloning Site* und Promotor- oder Reportergene enthalten können, gewählt werden. Durch die Möglichkeit den Gram-negativen Replikatoren jeweils zusätzlich ein *tra*-Gen mitzugeben, kann dieses Plasmid sowohl für die Elektrotransformation als auch Konjugation verwendet werden.

Die Konjugation bietet eine gute Alternative zu Methoden des DNA-Transfers durch Elektroporation oder auch chemische Stimuli, da es sich um eine natürliche Methode handelt, die ohne Einwirkung von äußeren Einflüssen von den Bakterien selbst durchgeführt wird. Dieser Prozess benötigt engen Kontakt zwischen den Zellen und sowohl einen *cis*-aktiven Konjugationsursprung zur Initiierung des Einzelstrangbruchs als auch damit assoziierte *trans*-aktive Funktionen, welche für die Paarung, die DNA-Prozessierung und die Übertragung des konjugativen Plasmids benötigt werden.

Ähnlich wie bei der Elektrotransformation wurden in dieser Arbeit verschiedene Protokolle getestet (Bertram et al, 1991; Rachinger, 2010; Strätz et al, 1994), die jedoch auch nach mehrfacher Modifikation nicht zum gewünschten Erfolg führten. Alternativ zum DNA-Transfer durch konjugative Plasmide besteht noch die Möglichkeit der Übertragung durch konjugative Transposons. Sie kommen in Gram-positiven Bakterien häufiger vor, als konjugative Plasmide (Scott, 1992) und es wird vermutet, dass diese Art der Konjugation auch eine große Rolle bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in Bakterien spielt (Davis et al, 2005). Konjugative Transposons sind größere mobile genetische Elemente im Chromosom von Bakterien, die selbst alle Funktionen kodieren, die sie für ihren Transfer benötigen. Ihre Transposition beruht auf der Bildung eines kovalent geschlossenen zirkulären DNA-Intermediates, welches entweder wieder im Chromosom der gleichen Zelle integrieren kann oder durch konjugativen Transfer in das eines Rezipienten. Es existieren eine Reihe von konjugativen Transposons, die auch in Clostridien vorkommen, wie z.B. Tn4451 oder Tn4452 aus *C. perfringens* (Abraham & Rood, 1987). Ein anderes bekanntes, nicht-clostridiales Beispiel stellt Tn916 aus *E. faecalis* dar (Franke & Clewell, 1981). Dieses Transposon wurde bereits erfolgreich genutzt, um DNA in das Chromosom von *C.*

tetani (Volk et al, 1988) oder auch *C. difficile* (Mullany et al, 1991) zu integrieren, so dass dies eine Alternative in *C. acidurici* 9a zur Konjugation mit einem Plasmid bieten könnte.

Ein weiteres Hindernis bei sowohl Elektroporation als auch Konjugation stellt oft das Vorhandensein eines sequenzspezifischen endogenen Restriktionsmodifikationssystems (RM-System) dar. Diese Systeme kommen häufig in Clostridien vor und ihr Zweck ist es, fremde DNA zu degradieren und sich so zu schützen, also genau das Gegenteil von dem, was man in diesem Fall möchte. Deshalb sollte auch unbedingt eine Methylierung der Plasmid-DNA in Betracht gezogen werden. Bis jetzt wurden fünf verschiedene Arten von RM-Systemen entdeckt, die ihrem Entdeckungsdatum nach Typ I, Typ II, Typ IIs, Typ III und Typ IV genannt wurden. In mehrere Clostridien wie z.B. *C. perfringens* Stamm 13 (Scott & Rood, 1989) oder *C. difficile* CD630 (Herbert et al, 2003) bereiteten RM-Systeme keine Probleme bei dem Transfer von DNA. In allen konnte zwar zumindest eine Typ II Methylase identifiziert werden, jedoch keine dazugehörige Endonuklease. Im Gegensatz dazu existieren mindestens genauso viele Beispiele, in denen beides identifiziert werden konnte, so dass der DNA-Transfer ohne einen geeigneten methylierten Vektor nicht möglich war, wie z.B. in *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Mermelstein & Papoutsakis, 1993), *C. difficile* CD3 (Purdy et al, 2002) und *C. cellulolyticum* ATCC 35319 (Jennert et al, 2000). Da im Genom von *C. acidurici* 9a zwei Gene identifiziert wurden, die für ein *Sau96I* Typ II RM-System kodieren, scheint dies der wahrscheinlichste Grund zu sein, weswegen sowohl Elektrotransformation als auch Konjugation zu keinem Ergebnis in diesem Organismus führten. Das Gen *sau96IM* (Curi_c08000) kodiert dabei für die Methyltransferase und *sau96IR* (Curi_c08010) für die Endonuklease. Typisch für die Typ II Endonukleasen ist, dass sie die DNA direkt innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz schneiden (Roberts et al, 2003). Die Erkennungssequenz der *Sau96I* Endonuklease ist 5'...G^NGNCC...3', wobei N eine variable Base darstellt. Bei der Methyltransferase handelt es sich um eine C⁵-Cytosin-Methyltransferase (Dcm), das heißt die Methylierung findet am Cytosin statt und es entsteht dadurch 5-Methylcytosin. Um das Plasmid, welches man in *C. acidurici* 9a einbringen möchte, gegen dieses System zu schützen, müsste die *Sau96I* Methyltransferase zunächst in das Plasmid kloniert werden, damit sie vom Plasmid aus exprimiert werden kann und dieses so nicht mehr als Fremd-DNA angesehen wird, da es das wirtseigene Methylierungsmuster trägt. Um sicher zu gehen, dass das RM-System richtig identifiziert wurde, sollte das Cytosin-Methylierungsmuster mit der sogenannten Bisulfit-Methode nach Hayatsu et al. (Hayatsu et al, 2001) experimentell bestimmt werden. Durch die Inkubation der methylierte DNA mit Bisulfit

findet eine Konversion aller Cytosine, die nicht methyliert sind zu Uracil statt. Mit Hilfe von Sequenzierung und dem Vergleich zur ursprünglichen Sequenz kann die Umwandlung nachvollzogen und die Erkennungssequenz bestimmt werden. Sollte *C. acidurici* 9a jemals für die Biotechnologie genutzt werden, wäre die Deletion der *Sau96I* Endonuklease einer der ersten Schritte, damit eine bessere Handhabung beim DNA-Transfer gewährleistet wäre. Dies könnte z.B. mit dem kürzlich speziell für Clostridien entwickelten Clostron-System von Heap et al. (Heap et al, 2010; Heap et al, 2007) verwirklicht werden, welches durch die Verwendung von Gruppe II Introns eine direkte Mutagenese von spezifischen Genen ermöglicht.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die vollständige Genomsequenz des Purinverwerfers *C. acidurici* 9a ermittelt werden, welche die erste aus der Gruppe der purinolytischen Clostridien darstellt und somit als Grundlage für weitere Analysen und Vergleiche mit anderen sequenzierten Clostridiengenomenen, besonders anderer Purinverwerfer wie *C. cylindrosporum* und *C. purinilyticum*, dienen kann. Als nächster Schritt würde die Sequenzierung dieser beiden Organismen mit einem anschließenden genomweiten Vergleich Sinn machen. Da die genotypische Distanz zwischen *C. acidurici* 9a und *C. cylindrosporum* schon früh erkannt worden ist, wäre es interessant zu wissen, wie weit die Ausmaße dieser Distanz tatsächlich sind. Weiter wäre eine Untersuchung in Hinblick auf die Glycin-Reduktase interessant. Da für *C. purinilyticum* und *C. cylindrosporum* Aktivitäten für dieses Enzym nachgewiesen werden konnten, während es in *C. acidurici* nicht möglich war (Dürre & Andreesen, 1983), sollten die für die Kodierung der Glycin-Reduktase notwendigen Gene aufgrund von Sequenzhomologien zu anderen Organismen im Genom dieser beiden Organismen zu identifizieren sein. Sollten sich keine Orthologe finden, könnte es sich bei den purinolytischen Clostridien um ein alternatives System handeln, welches zwar die Eigenschaften einer Glycin-Reduktase wie sie z.B. in *E. acidaminophilum* vorkommt besitzt, jedoch von anderen Genen kodiert wird.

Eine weitere interessante Möglichkeit würde sich mit einer detaillierten Transkriptomanalyse bieten (*transcriptomics*), die mittlerweile relativ unkompliziert mittels Pyrosequenzierung durchgeführt werden kann anstelle der aufwendigeren Microarray-Technik. In *C. acidurici* 9a

würden hier z.B. die großen Gen-Cluster, welche ausschließlich für hypothetische Proteine kodieren, mögliche Ziele abgeben. Auch die Zwei-Komponenten-Systeme bieten interessante *targets*, da *C. acidurici* 9a zwar immer als Bodenbewohner beschrieben wird, aber auch aus den Exkrementen von Vögeln isoliert werden kann und somit in der Lage sein muss im System dieser Organismen überleben zu können. Die Frage ist, ob es bestimmte Faktoren wie die bereits genannten Zwei-Komponenten-Systeme oder Oberflächenproteine gibt, die es dem Bakterium ermöglichen zu erkennen in welcher Umgebung es sich aufhält und dadurch andere Mechanismen des Überlebens zu aktivieren.

Da es über kurz oder lang in jedem Organismus wichtig ist, ein geeignetes System zum DNA-Transfer zu entwickeln, egal ob eine industrielle Nutzung angestrebt oder weitere Grundlagenforschung betrieben wird, sollten in diese Richtungen weitere Anstrengungen unternommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits diverse Möglichkeiten diskutiert, um diesem Ziel näher zu kommen, wobei die Methylierung des verwendeten Shuttlevektors, die Methode erster Wahl sein sollte, da die im Genom von *C. acidurici* 9a identifizierte Endonuklease des *Sau96I*-RM-Systems den wahrscheinlichste Grund des Scheiterns bei der Entwicklung geeigneter Protokolle darstellt.

Des Weiteren wäre es interessant weitere Untersuchungen in Richtung Metall-Toleranz zu betreiben, da z.B. Gene identifiziert wurden, die für eine Resistenz gegen Cadmium sprechen. Wachstumsversuche und die Bestimmung der genauen minimalen inhibitorischen Konzentration könnten zu interessanten Ergebnissen führen. Dafür müsste jedoch zunächst das Medium angepasst werden und ein alternatives Reduktionsmittel etabliert werden, da Thioglycolat Chelate mit Metall-Ionen eingehen kann und somit die angestrebte Endkonzentration nicht mehr gegeben ist.

Auch das identifizierte Plasmid pCuri3 könnte interessante Ansatzpunkte bieten. Da es von geringer Größe ist und außer dem benötigten Replikationsinitiationsprotein-kodierenden Gen (*repB*) nur zwei weitere Gene mit unbekannter Funktion trägt wäre es hervorragend geeignet, um es zu einem Klonierungs- bzw. Shuttlevektor weiterzuentwickeln, der für den DNA-Transfer in andere Clostridien verwendet werden könnte. Dazu müsste ähnlich wie bei dem pMTL80000-System von Heap et al. noch ein resistenzvermittelndes Gen hinzugefügt werden und ein Replikationsursprung für Gram-negative Bakterien, falls es als Shuttlevektor dienen soll. Da das Genprodukt des *repB*-Gens Ähnlichkeiten zu Homologen in *C. butyricum* und *C. acetobutylicum*

zeigt, und für beide schon etablierte Protokolle des DNA-Transfers existieren, wäre es denkbar, dass das Plasmid pCuri3 in der Lage wäre direkt in diesen Organismen zu replizieren.

Insgesamt bieten die Ergebnisse dieser Arbeit eine gute Grundlage für weitere Forschungen auf dem weiten Gebiet der Clostridien.

5. Zusammenfassung

1. Das Genom von *C. acidurici* 9a wurde vollständig sequenziert und annotiert. Es besteht aus einem Chromosom mit einer Größe von 3.105.335 bp und einem Plasmid mit einer Größe von 2.913 bp. Durch die Annotation und Vergleiche zu anderen Clostridien konnten der Stoffwechsel und die metabolischen Fähigkeiten dieses Organismus weitgehend rekonstruiert werden. Eine Analyse der Cluster orthologer Gruppen zeigte dabei eine Unterrepräsentation von Genen in *C. acidurici* 9a im Vergleich zu anderen Clostridien, die für Proteine des Kohlenhydrattransports und –metabolismus kodieren. Dies hängt vermutlich mit dem eingeschränkten Substratspektrum dieses Organismus zusammen.
2. Ein phylogenetischer Stammbaum basierend 16S rRNA-Gen-Sequenzen bestätigte den Purinverwerter *C. purinilyticum* als nächsten Verwandten von *C. acidurici* 9a. Das dritte purinolytische *Clostridium*, *C. cylindrosporum*, clusterte dagegen näher an Organismen der Gruppe I wie *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri*. Ebenfalls als nah verwandt wurde *Alkaliphilus oremlandii* eingestuft, was durch eine bidirektionale BLAST-Analyse bestätigt wurde.
3. Durch Genomvergleiche konnten insgesamt acht Regionen im Genom von *C. acidurici* 9a identifiziert werden, die von anderen Clostridien abwichen. Vier davon zeigten eine Anhäufung von Genen, die als Fremd-DNA erkannt wurden. Die anderen vier Regionen wiesen keine Orthologen zu anderen auf. Besonders kamen hier Clusterungen von Genen vor, die für hypothetische Proteine kodieren.
4. Mit dem kryptischen Plasmid pCuri3 konnte im Rahmen dieser Arbeit eines der bis jetzt kleinsten clostridialen Plasmide sequenziert werden. Es beherbergt drei Gene, wovon eines für das Replikationsprotein kodiert und die anderen für hypothetische Proteine. Es zeigt starke Ähnlichkeit zu dem Plasmid MCF-1 aus *Clostridium* sp. MCF-1. Anhand von

real-time qPCR konnte pCuri3 als *low-copy*-Plasmid mit einer Kopienzahl von $9 (\pm 1)$ identifiziert werden.

5. Durch die Annotation konnte der Abbau von Purinen als Substrat rekonstruiert und neu bewertet werden. Es konnten alle Gene identifiziert werden, die für die Nutzung des Glycin-Serin-Pyruvat-Weges benötigt werden. Es fehlen jedoch Gene, welche für Proteine der Glycin-Reduktase kodieren, die als eines der wichtigsten Enzyme bei der Umsetzung von Glycin in purinolytischen Clostridien gilt. *C. acidurici* 9a steht damit nur der Glycin-Serin-Pyruvat-Weg zur Energiegewinnung zur Verfügung.
6. Mit Glycin als Substrat und niedrigen Konzentrationen an Harnsäure im Medium konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von *C. acidurici* 9a abhängig von der Harnsäurekonzentration ist. Da der Organismus auf die Fermentation von Purinen spezialisiert ist und diese nicht selber synthetisiert, muss der Stoffwechsel bei Wachstum auf Glycin erst umgestellt werden. Dies zeigte sich vorallem in der Änderung der Transkriptionsrate von Genen der verschiedenen Zweige des Glycinabbaus.
7. Trotz der Identifikation aller Schlüsselenzyme der Glykolyse, war *C. aciurici* 9a nicht in der Lage Zucker als Substrat zu verwerten. Durch RT-PCR konnte allerdings gezeigt werden, dass diese Gene konstitutiv bereits während des Wachstums auf Harnsäure transkribiert werden. Es konnte jedoch kein vollständiges Phosphotransferase-System identifiziert werden, um einen Transport des Zuckers in die Zelle zur Verwertung zu ermöglichen.
8. Die Energiekonservierung und -gewinnung von *C. acidurici* 9a erfolgt wahrscheinlich unter Beteiligung eines Rnf-Komplexes, der mit einer Na^+ -abhängigen F_1F_0 -ATPase gekoppelt ist. Desweiteren konnten Gene identifiziert werden, die für drei Untereinheiten einer Eisen-Hydrogenase kodieren, welche einen Elektronenbifurkationsmechanismus ähnlich zu dem in *Acetobacterium woodii* ermöglichen könnte.
9. Durch die Annotation und anschließende Wachstumsversuche konnten bereits bekannte Antibiotika-Resistenzen von *C. acidurici* 9a bestätigt und weitere identifiziert werden. Dabei wurde eine hohe Resistenz gegenüber Acriflavin und 4-Azaleudin festgestellt sowie eine höhere als bisher angenommene gegen Bacitracin. Mit dem *cop*-Operon

konnten Gene für einen Resistenzmechanismus gegen überschüssiges Kupfer in der Zelle identifiziert und durch Wachstumsversuche bestätigt werden. Auch gegen Zink konnte eine Toleranz festgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass Kupfer einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *C. acidurici* 9a hat. Dieser äußert sich in einer mehrstufigen Wachstumskurve.

11. Es wurden erste Voruntersuchungen zum DNA-Transfer in *C. acidurici* 9a gemacht. Dabei wurden verschiedene Protokolle zur Transformation und Konjugation getestet und das Genom hinsichtlich Limitierungen dieser Methoden untersucht. Damit konnte eine Grundlage zur Etablierung geeigneter Methoden geschaffen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abou-Shanab RA, van Berkum P, Angle JS (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* **68**: 360-367
- Abraham LJ, Rood JI (1987) Identification of Tn4451 and Tn4452, chloramphenicol resistance transposons from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **169**: 1579-1584
- Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L, Olmedo G (2010) Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* **11**: 332
- Andreesen JR (1994a) Acetate via glycine: a different form of acetogenesis. In *Acetogenesis*, Drake HL (ed), pp 568-629. New York: Chapman and Hall
- Andreesen JR (1994b) Glycine metabolism in anaerobes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 223-237
- Andreesen JR (2005) Degradation of heterocyclic compounds. In *Handbook on Clostridia*, Dürre P (ed), pp 221-237. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group
- Argoudelis AD, Herr RR, Mason DJ, Pyke TR, Zieserl JF (1967) New amino acids from *Streptomyces*. *Biochemistry* **6**: 165-170
- Arthur M, Molinas C, Courvalin P (1992) The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* **174**: 2582-2591
- Arthur M, Reynolds PE, Depardieu F, Evers S, Dutka-Malen S, Quintiliani R, Courvalin P (1996) Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *J Infect* **32**: 11-16

- Badger JH, Olsen GJ (1999) CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 512-524
- Barker HA, Beck JV (1941) The fermentative decomposition of purines by *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporum*. *J Biol Chem* **141**: 3-27
- Barker HA, Beck JV (1942) *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporum*, organisms fermenting uric acid and some other purines. *J Bacteriol* **43**: 291-304
- Barker HA, Peterson WH (1944) The nutritional requirements of *Clostridium acidurici*. *J Bacteriol* **47**: 307-308
- Barker HA, Ruben S, Beck JV (1940) Radioactive carbon as an indicator of carbon dioxide reduction: IV. The synthesis of acetic acid from carbon dioxide by *Clostridium acidurici*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **26**: 477-482
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712
- Beck JV, Sagers RD (1956) Studies on the formation of formate, glycine, serine, pyruvate and acetate from purines by *Clostridium acidurici*. *J Bacteriol* **72**: 199-208
- Beck JV, Sagers RD, Morris LR (1957) Intermediary metabolism of *Clostridium acidurici*. I. Formation of pyruvate from glycine. *J Bacteriol* **73**: 465-469
- Bertram J, Strätz M, Dürre P (1991) Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **173**: 443-448
- Biegel E, Schmidt S, González JM, Müller V (2011) Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cell Mol Life Sci* **68**: 613-634
- Biegel E, Schmidt S, Müller V (2009) Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Environ Microbiol* **11**: 1438-1443

- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**: 2551-2561
- Bromberg PA, Gutman AB, Weissman B (1957) The purine bases of human urine. II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation. *J Biol Chem* **224**: 423-43
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **45**: 198-207
- Brüggemann H, Gottschalk G (2008) Comparative genomics of clostridia: link between the ecological niche and cell surface properties. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 73-81
- Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25**: 119-120
- Cato EP, George WL, Finegold SM (1986) Genus: *Clostridium* Prazmowski 1880, 23AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JGe (eds), Vol. 2, pp 1141-1200. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- Champion AB, Rabinowitz JC (1977) Ferredoxin and formyltetrahydrofolate synthetase: comparative studies with *Clostridium acidurici*, *Clostridium cylindrosporium*, and newly isolated anaerobic uric acid-fermenting strains. *J Bacteriol* **132**: 1003-1020
- Chen C-S (1972) Glycine metabolism in purine-fermenting clostridia. Dissertation Thesis, Berkeley (CA), Berkeley (CA), USA
- Chen C-S. (1975) Formiminoglycine transport systems in *Clostridium acidi-urici*. *Bot Bull Academia Sinica*, Vol. 16, pp. 1-9.
- Chou C-H, Han C-L, Chang J-J, Lay J-J (2011) Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* **36**: 13972-13983
- Cobine PA, George GN, Jones CE, Wickramasinghe WA, Solioz M, Dameron CT (2002) Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY: metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry* **41**: 5822-5829

- Coleman JE (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* **61**: 897-946
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JA (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 812-826
- Collins MD, Rodrigues UM, Dainty RH, Edwards RA, Roberts TA (1992) Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: Description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* **96**: 235-239
- Courvalin P (2006) Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* **42 Suppl 1**: S25-34
- Cronan JE, La Porte D (1996) Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, Cronan JE, La Porte D (eds). Washington DC: ASM Press, American Society for Microbiology
- Das SP, Ravindran R, Ahmed S, Das D, Goyal D, Fontes CM, Goyal A (2012) Bioethanol production involving recombinant *C. thermocellum* hydrolytic hemicellulase and fermentative microbes. *Appl Biochem Biotechnol*
- Davidson AL, Chen J (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268
- Davis IJ, Carter G, Young M, Minton NP (2005) Gene cloning in clostridia. In *Handbook on Clostridia*, Dürre P (ed). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group
- Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res* **27**: 4636-4641
- Dhakephalkar PK, Chopade BA (1994) High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. *Biometals* **7**: 67-74
- Dubnau D (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews* **55**: 395-424

- Duffus JH (2002) Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality. *Ann Occup Hyg* **46**: 269-270
- Dürre P (1981) Selenabhängige Vergärung von Purinen und Glycin durch *Clostridium purinolyticum* und *Peptococcus glycinophilus*. PhD Thesis, Georg-August-University Göttingen,
- Dürre P (2005) *Handbook on Clostridia*, Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Dürre P, Andersch W, Andreesen JR. (1981) Isolation and characterization of an adenine-utilizing, anaerobic sporeformer, *Clostridium purinolyticum* sp. nov., *Int J Syst Bacteriol*, Vol. 31, pp. 184-194.
- Dürre P, Andreesen JR (1982a) Pathway of carbon dioxide reduction to acetate without a net energy requirement in *Clostridium purinolyticum*. *FEMS Microbiol Lett* **15**: 51-56
- Dürre P, Andreesen JR (1982b) Selenium-dependent growth and glycine fermentation by *Clostridium purinolyticum*. *J Gen Microbiol* **128**: 1457-1466
- Dürre P, Andreesen JR (1983) Purine and glycine metabolism by purinolytic clostridia. *J Bacteriol* **154**: 192-199
- Fedorcsák I, Ehrenberg L (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* **20**: 107-112
- Ferris JP, Joshi PC, Edelson EH, Lawless JG (1978) HCN: a plausible source of purines, pyrimidines and amino acids on the primitive earth. *J Mol Evol* **11**: 293-311
- Fonknechten N, Chaussonnerie S, Tricot S, Lajus A, Andreesen JR, Perchat N, Pelletier E, Gouyvenoux M, Barbe V, Salanoubat M, Le Paslier D, Weissenbach J, Cohen GN, Kreimeyer A (2010) *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics* **11**: 555
- Forbes NS (2010) Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **10**: 785-794

- Franke AE, Clewell DB (1981) Evidence for conjugal transfer of a *Streptococcus faecalis* transposon (Tn916) from a chromosomal site in the absence of plasmid DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **45 Pt 1**: 77-80
- Friedmann HC, Cagen LM (1970) Microbial biosynthesis of B12-like compounds. *Annu Rev Microbiol* **24**: 159-208
- Furuta Y, Kobayashi I. (2011) Restriction-modification systems as mobile epigenetic elements. *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bioscience; 2000-, Austin (TX).
- Gaballa A, Helmann JD (2003) *Bacillus subtilis* CPx-type ATPases: characterization of Cd, Zn, Co and Cu efflux systems. *Biometals* **16**: 497-505
- Gariboldi RT, Drake HL (1984) Glycine synthase of the purinolytic bacterium, *Clostridium acidurici*. Purification of the glycine-CO₂ exchange system. *J Biol Chem* **259**: 6085-6089
- Glen C, Nigel M, Ian D, Mike Y (2005) Gene cloning in clostridia. In *Handbook on Clostridia*, pp 37-52. CRC Press
- Gottschalk G (1968) The stereospecificity of the citrate synthase in sulfate-reducing and photosynthetic bacteria. *Eur J Biochem* **5**: 346-351
- Gottschalk G, Bahl H (1981) Feasible improvements of the butanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Basic Life Sci* **18**: 463-471
- Grobosch T, Schilde U, Tiersch B (2006) Abtrennung von Arsen und anderer Schwermetalle mit imprägnierten Adsorberpolymeren – Teil 2: Abtrennung von Blei, Kupfer, Nickel und Zink. *Chemie Ingenieur Technik* **78**: 769-775
- Guo FB, Ou HY, Zhang CT (2003) ZCURVE: a new system for recognizing protein-coding genes in bacterial and archaeal genomes. *Nucleic Acids Research* **31**: 1780-1789
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005) A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Comput Biol* **1**: e60

- Hassan S, Laryea D, Mahteme H, Felth J, Fryknäs M, Fayad W, Linder S, Rickardson L, Gullbo J, Graf W, Pålman L, Glimelius B, Larsson R, Nygren P (2011) Novel activity of acriflavine against colorectal cancer tumor cells. *Cancer Sci* **102**: 2206-2213
- Hatheway CL (1990) Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev* **3**: 66-98
- Hayatsu H, Shiraishi M, Negishi K (2001) Bisulfite modification for analysis of DNA methylation. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- He Q, Hemme CL, Jiang H, He Z, Zhou J (2011) Mechanisms of enhanced cellulosic bioethanol fermentation by co-cultivation of *Clostridium* and *Thermoanaerobacter* spp. *Bioresource Technology* **102**: 9586-9592
- Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, Cartman ST, Cooksley CM, Scott JC, Minton NP (2010) The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J Microbiol Methods* **80**: 49-55
- Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP (2007) The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* **70**: 452-464
- Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP (2009) A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods* **78**: 79-85
- Henderson JF (1980) Inhibition of microbial growth by naturally-occurring purine bases and ribonucleosides. *Pharmacol Ther* **8**: 605-627
- Herbert M, O'Keeffe TA, Purdy D, Elmore M, Minton NP (2003) Gene transfer into *Clostridium difficile* CD630 and characterisation of its methylase genes. *FEMS Microbiology Letters* **229**: 103-110
- Hodson ME (2004) Heavy metals: geochemical bogey men? *Environ Pollut* **129**: 341-343
- Hsiao W, Wan I, Jones SJ, Brinkman FSL (2003) IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. *Bioinformatics* **19**: 418-420

- Hu B, Kou L, Li C, Zhu LP, Fan YR, Wu ZW, Wang JJ, Xu GX (2009) *Bifidobacterium longum* as a delivery system of TRAIL and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther* **16**: 655-663
- Hungate RE (1969) Chapter IV: A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In *Methods in Microbiology*, Ribbons JRNaDW (ed), Vol. Volume 3, Part B, pp 117-132. Academic Press
- Jana S, Deb J (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 140-150
- Jennert KCB, Tardif C, Young DI, Young M (2000) Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology* **146**: 3071-3080
- Jirásková A, Vitek L, Fevery J, Ruml T, Branny P (2005) Rapid protocol for electroporation of *Clostridium perfringens*. *Journal of Microbiological Methods* **62**: 125-127
- Kalhoefer D, Thole S, Voget S, Lehmann R, Liesegang H, Wollher A, Daniel R, Simon M, Brinkhoff T (2011) Comparative genome analysis and genome-guided physiological analysis of *Roseobacter litoralis*. *BMC Genomics* **12**: 324
- Karlson P (1974) *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 9. neubearbeitete Auflage edn. Stuttgart: Georg-Thieme Verlag.
- King MC, Wilson AC (1975) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* **188**: 107-116
- Knoop V, Müller K (2006) *Gene und Stammbäume - Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kumagai H, Fujiwara T, Matsubara H, Saeki K (1997) Membrane localization, topology, and mutual stabilization of the *rnfABC* gene products in *Rhodobacter capsulatus* and implications for a new family of energy-coupling NADH oxidoreductases. *Biochemistry* **36**: 5509-5521
- Kumar A, Lindberg U (1972) Characterization of messenger ribonucleoprotein and messenger RNA from KB cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 681-685

- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denizot F, Devine KM, Dusterhoft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, Haiech J, Harwood CR, Henaut A, Hilbert H, Holsappel S, Hosono S, Hullo MF, Itaya M, Jones L, Joris B, Karamata D, Kasahara Y, Klaerr-Blanchard M, Klein C, Kobayashi Y, Koetter P, Koningstein G, Krogh S, Kumano M, Kurita K, Lapidus A, Lardinois S, Lauber J, Lazarevic V, Lee SM, Levine A, Liu H, Masuda S, Mauel C, Medigue C, Medina N, Mellado RP, Mizuno M, Moestl D, Nakai S, Noback M, Noone D, O'Reilly M, Ogawa K, Ogiwara A, Oudega B, Park SH, Parro V, Pohl TM, Portetelle D, Porwollik S, Prescott AM, Presecan E, Pujic P, Purnelle B, Rapoport G, Rey M, Reynolds S, Rieger M, Rivolta C, Rocha E, Roche B, Rose M, Sadaie Y, Sato T, Scanlan E, Schleich S, Schroeter R, Scoffone F, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Serror P, Shin BS, Soldo B, Sorokin A, Tacconi E, Takagi T, Takahashi H, Takemaru K, Takeuchi M, Tamakoshi A, Tanaka T, Terpstra P, Tognoni A, Tosato V, Uchiyama S, Vandebol M, Vannier F, Vassarotti A, Viari A, Wambutt R, Wedler E, Wedler H, Weitzenegger T, Winters P, Wipat A, Yamamoto H, Yamane K, Yasumoto K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa HF, Zumstein E, Yoshikawa H, Danchin A (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256
- Kwon M, Strobel SA (2008) Chemical basis of glycine riboswitch cooperativity. *RNA* **14**: 25-34
- Köpke M, Held C, Hujer S, Liesegang H, Wiezer A, Wollherr A, Ehrenreich A, Liebl W, Gottschalk G, Dürre P (2010) *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 13087-13092
- Langille M, Hsiao W, Brinkman F (2008) Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinformatics* **9**: 329
- Langille MG, Brinkman FS (2009) IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics* **25**: 664-665

- Lebertz H (1984) Selenabhängiger Glycin-Stoffwechsel bei anaeroben Bakterien und vergleichende Untersuchungen zur Glycin-Reduktase und zur Glycin-Decarboxylase. Dissertation Thesis, Georg-August-Universität, Göttingen,
- Lee CK, Dürre P, Hippe H, Gottschalk G (1987) Screening for plasmids in the genus *Clostridium*. *Arch Microbiol* **148**: 107-114
- Lee CL, Ow DS, Oh SK (2006) Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods* **65**: 258-267
- Liu T, Ramesh A, Ma Z, Ward SK, Zhang L, George GN, Talaat AM, Sacchettini JC, Giedroc DP (2007) CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* **3**: 60-68
- Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* **25**: 0955-0964
- Luchansky JB, Muriana PM, Klaenhammer TR (1988) Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Molecular Microbiology* **2**: 637-646
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lüssmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363-1371
- Ma Z, Cowart DM, Scott RA, Giedroc DP (2009) Molecular insights into the metal selectivity of the copper(I)-sensing repressor CsoR from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **48**: 3325-3334
- Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* **306**: 275-279

- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-380
- Markowitz VM, Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IM, Chu K, Kyrpides NC (2009) IMG ER: a system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics* **25**: 2271-2278
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 200-214
- McDonald IR, Riley PW, Sharp RJ, McCarthy AJ (1995) Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology* **79**: 213-218
- McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC (2000) Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3224-3228
- Meier T, Ferguson SA, Cook GM, Dimroth P, Vonck J (2006) Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. *J Bacteriol* **188**: 7759-7764
- Mengesha A, Dubois L, Chiu RK, Paesmans K, Wouters BG, Lambin P, Theys J (2007) Potential and limitations of bacterial-mediated cancer therapy. *Front Biosci* **12**: 3880-3891
- Mermelstein LD, Papoutsakis ET (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. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1077-1081
- Mrázek J, Karlin S (1999) Detecting alien genes in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **870**: 314-329
- Mullany P, Wilks M, Tabaqchali S (1991) Transfer of Tn916 and Tn916 delta E into *Clostridium difficile*: demonstration of a hot-spot for these elements in the *C. difficile* genome. *FEMS Microbiol Lett* **63**: 191-194
- Needleman SB, Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **48**: 443-453
- Nobusato A, Uchiyama I, Ohashi S, Kobayashi I (2000) Insertion with long target duplication: a mechanism for gene mobility suggested from comparison of two related bacterial genomes. *Gene* **259**: 99-108
- Nudler E, Mironov AS (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. In *Trends Biochem Sci* Vol. 29, pp 11-17. England
- Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Gtc Sequencing Center Production Finishing aBT, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4823-4838
- Oh-hama T, Stolowich NJ, Scott AI (1988) 5-Aminolevulinic acid formation from glutamate via the C5 pathway in *Clostridium thermoaceticum*. *FEBS Lett* **228**: 89-93
- Ohse M, Takahashi K, Kadowaki Y, Kusaoke H (1995) Effects of plasmid DNA sizes and several other factors on transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with plasmid DNA by electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **59**: 1433-1437
- Osborn AM, Boltner D (2002) When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. In *Plasmid* Vol. 48, pp 202-212. United States

- Overbeek R, Larsen N, Walunas T, D'Souza M, Pusch G, Selkov E, Liolios K, Joukov V, Kaznadzey D, Anderson I, Bhattacharyya A, Burd H, Gardner W, Hanke P, Kapatral V, Mikhailova N, Vasieva O, Osterman A, Vonstein V, Fonstein M, Ivanova N, Kyrpides N (2003) The ERGO genome analysis and discovery system. *Nucleic Acids Res* **31**: 164-171
- Pansegrau W, Schröder W, Lanka E (1994) Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *J Biol Chem* **269**: 2782-2789
- Patyar S, Joshi R, Byrav DSP, Prakash A, Medhi B, Das BK (2010) Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science* **17**: 21
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Poehlein A (2008) Das Selenoprotein PrpU als Vermittler zwischen oxidativem und reduktivem Glycin-Metabolismus von *Eubacterium acidaminophilum*. PhD Thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
- Poehlein A, Schmidt S, Kaster A-K, Goenrich M, Vollmers J, Thürmer A, Bertsch J, Schuchmann K, Voigt B, Hecker M, Daniel R, Thauer RK, Gottschalk G, Müller V (2012) An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS One* **7**: e33439
- Pricer WE, Rabinowitz JC (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. V. Formiminoglycine. *J Biol Chem* **222**: 537-554
- Prinz WA, Åslund F, Holmgren A, Beckwith J (1997) The Role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 15661-15667
- Puig S, Thiele DJ (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 171-180
- Purdy D, O'Keeffe TAT, Elmore M, Herbert M, McLeod A, Bokori-Brown M, Ostrowski A, Minton NP (2002) Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli*

- to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Molecular Microbiology* **46**: 439-452
- Rabinovitz M, Finkleman A, Reagan RL, Breitman TR (1969) Amino acid antagonist death in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **99**: 336-338
- Rabinowitz J (1959) Fermentative metabolism. *Ann Rev Microbiol* **13**: 441-464
- Rabinowitz JC, Pricer WE (1956) Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. IV. 4-Ureido-5-imidazolecarboxylic acid. *J Biol Chem* **218**: 189-199
- Rachinger M (2010) Stammdesign in *B. licheniformis*. Dr. rer. nat. Thesis, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttinger Genomlabor, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Rahlf S, Aufurth S, Müller V (1999) The Na(+)-F(1)F(0)-ATPase operon from *Acetobacterium woodii*. Operon structure and presence of multiple copies of atpE which encode proteolipids of 8- and 18-kda. *J Biol Chem* **274**: 33999-34004
- Rahlf S, Müller V (1999) Sequence of subunit a of the Na(+)-translocating F1F0-ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for residues involved in Na+ binding. *FEBS Lett* **453**: 35-40
- Rakosky J, Beck JV (1955) Guanine degradation by *Clostridium acidurici*. I. Evidence for the presence of guanase. *J Bacteriol* **69**: 563-565
- Rakosky J, Zimmerman LN, Beck JV (1955) Guanine degradation by *Clostridium acidurici*. II. Isolation and characterization of guanase. *J Bacteriol* **69**: 566-570
- Riley J, Butler R, Ogilvie D, Finniear R, Jenner D, Powell S, Anand R, Smith JC, Markham AF (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res* **18**: 2887-2890
- Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DTF, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumpfort RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Krüger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M,

- Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JMB, Wilson GG, Xu Sy (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* **31**: 1805-1812
- Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363-365
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944-945
- Sagers RD, Benziman M, Gunsalus IC (1961) Acetate formation in *Clostridium acidi-urici*: acetokinase. *J Bacteriol* **82**: 233-238
- Sagers RD, Gunsalus IC (1961) Intermediary metabolism of *Diplococcus glycinophilus*. I. Glycine cleavage and one-carbon interconversions. *J Bacteriol* **81**: 541-549
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 edn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**: 104-108

- Schiefer-Ullrich H, Wagner R, Dürre P, Andreesen JR (1984) Comparative studies on physiology and taxonomy of obligately purinolytic clostridia. *Arch Microbiol* **138**: 345-353
- Schmidt S, Biegel E, Müller V (2009) The ins and outs of Na(+) bioenergetics in *Acetobacterium woodii*. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 691-696
- Schut GJ, Adams MW (2009) The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *J Bacteriol* **191**: 4451-4457
- Scott JR (1992) Sex and the single circle: conjugative transposition. *J Bacteriol* **174**: 6005-6010
- Scott PT, Rood JI (1989) Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene* **82**: 327-333
- Seedorf H, Fricke WF, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberger J, Li F, Hagemeyer C, Thauer RK, Gottschalk G (2008) The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2128-2133
- Seol JH, Yoo SJ, Shin DH, Shim YK, Kang MS, Goldberg AL, Chung CH (1997) The heat-shock protein HslVU from *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase as well as an ATP-dependent proteinase. *Eur J Biochem* **247**: 1143-1150
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* **57**: 138-163
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Biotech* **1**: 784-791
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1980) Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**: 225-420
- Skulj M, Okrslar V, Jalen S, Jevsevar S, Slanc P, Strukelj B, Menart V (2008) Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb Cell Fact* **7**: 6

- Smaldone GT, Helmann JD (2007) CsoR regulates the copper efflux operon *copZA* in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **153**: 4123-4128
- Soliman EM, Mahmoud ME, Ahmed SA (2002) Reactivity of thioglycolic acid physically and chemically bound to silica gel as new selective solid phase extractors for removal of heavy metal ions from natural water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **82**: 403-413
- Solomon JM, Grossman AD (1996) Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics* **12**: 150-155
- Srivastava P, Singh P, Narayanan N, Deb JK (2011) Physiological and biochemical consequences of host-plasmid interaction – A case study with *Corynebacterium renale*, a multiple cryptic plasmid containing strain. *Plasmid* **65**: 110-117
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* **132**: 115-130
- Stadtman TC (1958) The participation of a quinone in the enzymic reduction of glycine by *Clostridium sticklandii*. *Biochem Z* **331**: 46-48
- Stadtman TC (1978) Selenium-dependent clostridial glycine reductase. *Methods Enzymol* **53**: 373-382
- Stickland LH (1934) Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. *Biochem J* **28**: 1746-1759
- Stolz JF, Perera E, Kilonzo B, Kail B, Crable B, Fisher E, Ranganathan M, Wormer L, Basu P (2007) Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsonic acid) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species. *Environ Sci Technol* **41**: 818-823
- Strätz M, Sauer U, Kuhn A, Dürre P (1994) Plasmid transfer into the homoacetogen *Acetobacterium woodii* by electroporation and conjugation. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1033-1037
- Tan S-X, Greetham D, Raeth S, Grant CM, Dawes IW, Perrone GG (2010) The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function *in vivo* as an alternative system to reduce

- oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 6118-6126
- Tanaka H, Stadtman TC (1979) Selenium-dependent clostridial glycine reductase. Purification and characterization of the two membrane-associated protein components. *J Biol Chem* **254**: 447-452
- Tanner RS, Stackebrandt E, Fox GE, Gupta R, Magrum LJ, Woese CR (1982) A phylogenetic analysis of anaerobic eubacteria capable of synthesizing acetate from carbon dioxide. 127-132
- Tateno Y, Takezaki N, Nei M (1994) Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site. *Molecular Biology and Evolution* **11**: 261-277
- Tech M, Merkl R (2003) YACOP: Enhanced gene prediction obtained by a combination of existing methods. *In Silico Biol* **3**: 441-451
- Tettelin H, Radune D, Kasif S, Khouri H, Salzberg SL (1999) Optimized multiplex PCR: efficiently closing a whole-genome shotgun sequencing project. *Genomics* **62**: 500-507
- Thauer RK (1972) CO₂ Reduction to Formate in *Clostridium acidi-urici*. *J Bacteriol* **114**: 443-444
- Tsong TY (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys J* **60**: 297-306
- Vogels GD, Van der Drift C (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev* **40**: 403-468
- Volk WA, Bizzini B, Jones KR, Macrina FL (1988) Inter- and intrageneric transfer of Tn916 between *Streptococcus faecalis* and *Clostridium tetani*. *Plasmid* **19**: 255-259
- Waack S, Keller O, Asper R, Brodag T, Damm C, Fricke WF, Surovcik K, Meinicke P, Merkl R (2006) Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC Bioinformatics* **7**: 142

- Waber LJ, Wood HG (1979) Mechanism of acetate synthesis from CO₂ by *Clostridium acidurici*. *J Bacteriol* **140**: 468-478
- Wagner R, Andreesen JR (1979) Selenium requirement for active xanthine dehydrogenase from *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporium*. *Arch Microbiol* **121**: 255-260
- Wei M-Q, Rush CM, Norman JM, Hafner LM, Epping RJ, Timms P (1995) An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *Journal of Microbiological Methods* **21**: 97-109
- Wollherr A (2010) Komparative Genomanalyse zur Stammoptimierung produktionsnaher *Bacillus*-Stämme. PhD Thesis, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Xu YF, Zhu LP, Hu B, Fu GF, Zhang HY, Wang JJ, Xu GX (2006) A new expression plasmid in *Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* **14**: 151-157
- Xue G-P, Johnson JS, Dalrymple BP (1999) High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods* **34**: 183-191
- Zdobnov EM, Apweiler R (2001) InterProScan: An integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**: 847-848
- Škulj M, Okrslar V, Jalen S, Jevsevar S, Slanc P, Strukelj B, Menart V (2008) Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb Cell Fact* **7**: 6

7. Anhang

A.I. Verwendete Oligonukleotide

Tab. 13: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Anwendung	Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
PCN-Bestimmung	cau831	TAA CTC AAG CTG TCC GAA TGG
	cau832	CAC CTT CAT ATC CCC AGG AG
	cau825	GAG GAT AGA CTG CGT TCG AGA
	cau826	AGT GCT CCT TCT AGT TCC CTG ATA TT
RT-PCR	cau827	TTC TCT CAG CTG GCA CAT AGC
	cau828	ATT GAT ACG GGT TCG GAA GTG
	cau870	TGA AAT AGC AGG TTT CGC AAG
	cau871	TAC GTC AAA TCC CAT GTC TCC
	cau874	ACA CTA CCT GAC GCA AGC ATT
	cau875	CAT CTT CGA CTA TGG CAG AGC
	cau876	GAT GAA CAA CCA GTC GCA TTT
	cau877	TAT GTC CAG CAC CAG AAA AGG
	cau879	TAT TTT GTC CAC GCA TTG GAT
	cau880	GCC ACA CTA TGG CTT CCA TTA
	cau881	CCT ATG ATT GGA TGG GCT TCT
	cau882	GCG ATG TGT GTT AAA GGG AGA
	cau883	TTG GTT CCT GAT GTG TGT TGA
	cau884	TAA GCC GGG AAC GAA TAT AGC
	cau885	AGC TGG TAA AAC GAC ATC TGC
	cau886	ATG TAC AGG GAG CTT GCG ATA
	cau887	ACG AAG TCA GCG TGT GGT ACT
	cau888	TTA ACT CAC GGA AGC CCT GTA
	cau889	CAT TGT TTG ATG GAA CGC TGT
	cau890	TGA TGC GGT AGG TCA TAG AGT TG
	cau833	TTA TGA CTT TGA GTC TGA TGG TAA AAG
	cau834	TTT ACC TGC TAC TTG TTC GAA CTC T
	cau843	GTC TAA AAA TAA TTC GTT CGT ACT TCC
	cau844	GAA CTA AAA CCA CCT TTA TGT ACT GC
	cau122	GAG ATG CAC CAG GAA TGA AC
	cau123	GCT CCC CTA AGA GTT CCA TC
	cau177	CCT GCG TTT ACT GCC ACT AC
	cau178	GAG GAC TGG GAA GGT TGG
	cau181	TGA GTA TCC CCA CTC GTT ATC

Fortsetzung Tab. 13

	cau182	GCT CAC TCA GAC CCT AGA AGA G
	cau801	ATG CAG AAA CAG AGG CAA ATG
	cau802	TTA CAT TGA AAG TTC CAC ATC TTC
	cau134	CAG TTA CAA CCC TTG CTA CAG G
	cau135	CAT GTG AAA TGG CTG CAT AC
	cau139	GCT CAC TGA ATT ACG AAG AGT TG
	cau140	GGT GGC TAG GGG AGA TTT AG
	cau154	TCC TAA CGA ATA TGA CCC AAG
	cau155	GGA GTT TCA GTT GAG GCA GAG
<i>real-time qPCR</i>	cau803	TGG GGT AAA GCA AGC TAG TG
	cau804	ATA TTT GCT CCC CCA CCT C
	cau807	AAT TGA AGG AAT GAG CTG TGG
	cau808	TTT GTC ATC TAC ATT TTC ACA TTC
	cau813	TCT AAA GGA CAG ATA GAA GCA GTC
	cau814	CAT CTA TCT TTT CAT CGC CTT C
Sonstiges	ABIfor	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG
	ABIrev	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC
	UVkneu	CC GTT CGT ACG AGA ATC GC
	ABPFW	GAA GGA GAG GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC GGA CGA GAG AAG GGA GAG
	ClaI-ABPFW	CG GAA GGA GAG GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC GGA CGA GAG AAG GGA GAG
	ABPRV	GAC TCT CCC TTC TCG AAT CGT AAC CGT TCG TAC GAG AAT CGC TGT CCT CTC CTT C
	ABPRV-PstI	GAC TCT CCC TTC TCG AAT CGT AAC CGT TCG TAC GAG AAT CGC TGT CCT CTC CTT C TGCA
	M13for	GTA AAA CGA CGG CCA G
	M13rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC

A.II. Einteilung clostridialer Gene in COG-Kategorien

Tab. 14: Verteilung der vorhergesagten Gene im Genom von *C. acidurici* 9a und anderer Clostridien auf die verschiedenen COG-Kategorien.

	Gene in COG-Kategorien (Buchstabencode) [%]									
	E	G	D	N	M	H	V	C	S	R
<i>Clostridium acidurici</i> 9a	8.4	3.1	1.3	3.4	4.5	5.4	2.9	4.7	9.5	10.3
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	7.4	8.3	1.2	3.9	6.8	4.4	2.8	4.4	9.0	11.7
<i>Clostridium bartlettii</i> DSM 16795	10.6	6.2	1.1	0.2	4.5	4.5	3.5	5.7	8.4	13.4
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	7.2	11.5	1.0	3.1	4.6	3.6	2.1	6.2	7.7	11.8
<i>Clostridium botulinum</i> F Langeland	8.7	4.7	1.2	2.7	5.4	4.1	3.1	6.5	8.8	11.8
<i>Clostridium difficile</i> 630	8.9	9.1	0.9	1.8	5.2	3.3	2.8	6.1	7.7	10.4
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	9.9	5.1	1.1	3.1	5.9	5.1	2.7	7.0	7.5	10.9
<i>Clostridium hiranonis</i> DSM 13275	8.2	5.6	1.1	0.3	6.4	4.1	2.7	6.4	8.0	12.7
<i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053	9.2	12.9	1.2	1.4	4.6	3.6	3.0	6.5	6.6	11.6
<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	8.7	4.2	1.1	3.1	5.4	4.5	2.9	6.8	8.4	10.4
<i>Clostridium novyi</i> NT	8.0	5.8	1.7	3.5	6.2	5.0	2.4	5.8	7.8	10.7
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	7.6	11.8	1.2	2.5	4.7	3.0	3.4	6.0	7.6	11.4
<i>Clostridium saccharolyticum</i> DSM 2544	8.5	13.7	1.0	1.8	4.7	3.1	2.1	5.3	6.7	11.7
<i>Clostridium sticklandii</i> DSM 519	10.2	4.2	1.6	3.6	4.4	5.1	1.9	6.7	9.2	11.1
<i>Clostridium tetani</i> E88	8.2	4.5	1.3	3.4	6.5	4.4	2.4	6.3	7.9	11.6
<i>Clostridium spiroforme</i> DSM 1552	8.6	7.2	1.4	0.6	7.3	2.9	3.5	4.1	7.9	11.8

	Gene in COG-Kategorien (Buchstabencode) [%]									
	P	U	I	F	O	L	Q	T	K	J
<i>Clostridium acidurici</i> 9a	6.9	2.1	1.9	2.6	3.2	5.3	1.0	8.1	8.3	6.5
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	3.9	1.6	2.5	2.5	2.9	4.5	1.1	6.8	8.9	5.4
<i>Clostridium bartlettii</i> DSM 16795	6.2	1.0	1.6	3.3	3.2	5.2	0.9	4.9	8.5	4.9
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	4.0	1.1	2.4	2.1	2.7	3.9	1.3	8.6	11.2	4.1
<i>Clostridium botulinum</i> F Langeland	5.2	1.4	2.1	2.8	2.8	4.8	1.0	6.8	10.1	6.1
<i>Clostridium difficile</i> 630	4.7	1.8	1.7	2.7	2.3	5.1	1.1	7.8	11.7	4.9
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	4.6	1.3	1.8	2.4	2.5	4.2	1.5	8.4	10.2	4.7
<i>Clostridium hiranonis</i> DSM 13275	4.4	1.2	2.3	3.9	3.4	5.9	1.4	5.2	9.0	8.0
<i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053	3.6	1.2	2.1	2.9	2.4	3.7	1.4	7.1	10.1	5.2
<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	5.1	1.9	2.2	2.2	3.3	6.4	1.8	7.1	5.0	5.2
<i>Clostridium novyi</i> NT	4.2	2.1	2.6	3.2	3.5	6.7	0.7	5.9	6.4	8.0
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	4.5	1.3	1.8	2.5	3.2	4.3	1.2	7.0	9.5	5.5
<i>Clostridium saccharolyticum</i> DSM 2544	4.6	1.5	1.7	3.0	2.6	5.7	1.1	6.8	9.7	4.9
<i>Clostridium sticklandii</i> DSM 519	5.2	2.0	2.1	2.7	2.9	5.3	1.2	7.1	6.5	7.0
<i>Clostridium tetani</i> E88	5.3	1.7	2.7	3.0	2.9	6.8	0.9	6.5	7.6	6.0
<i>Clostridium spiroforme</i> DSM 1552	3.7	0.9	2.3	3.3	2.6	11.5	0.5	4.2	7.7	8.2

E = Aminosäuretransport und -metabolismus
 G = Kohlenhydrattransport und -metabolismus
 D = Zellzykluskontrolle, Zellteilung und Chromosompartitionierung
 N = Zellbeweglichkeit
 M = Zellwand-, Zellmembran- und Zellhüllbiogenese
 H = Coenzymtransport und -metabolismus
 V = Verteidigungsmechanismen
 C = Energieproduktion und -konservierung
 S = Funktion unbekannt
 R = Nur generelle Funktionsvorhersage

P = Anorganischer Ionentransport und -metabolismus
 U = Intrazellulärer Verkehr, Sekretion und vesikulärer Transport
 I = Lipidtransport und -metabolismus
 F = Nukleotidtransport und -metabolismus
 O = Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz und Chaperone
 L = Replication, Rekombination und Reparatur
 Q = Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus
 T = Signaltrensduktionsmechanismen
 K = Transkription
 J = Translation, ribosomale Struktur und Biogenese

A.III. Für die vergleichenden Analysen verwendete Organismen

Tab. 15: Organismen und ihre *accession*-Nummern für die Genomvergleiche und phylogenetischen Analysen. Organismen, die auch für die Erstellung der Stammbäume verwendet wurden, sind in grün dargestellt.

Organismus	<i>accession</i>-Nummer
<i>Clostridium acidurici</i> 9a	CP003326-7
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030	CP002987
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	CP000853
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	AE001437-8
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731	CP002660-2
<i>Clostridium acetobutylicum</i> EA 2018	CP002118-9
<i>Clostridium bartlettii</i> DSM 16795	ABEZ02000001-22
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	CP000721
<i>Clostridium bolteae</i> ATCC BAA 613	ABCC02000001-78
<i>Clostridium botulinum</i> A2 Kyoto	CP001581
<i>Clostridium botulinum</i> A3 Loch Maree	CP000962-3
<i>Clostridium botulinum</i> A ATCC 19397	CP000726
<i>Clostridium botulinum</i> A ATCC 3502	AM412317-8
<i>Clostridium botulinum</i> A Hall	CP000727
<i>Clostridium botulinum</i> B1 Okra	CP000939-40
<i>Clostridium botulinum</i> B Eklund 17B	CP001056-7
<i>Clostridium botulinum</i> Ba4 657	CP001081-3
<i>Clostridium botulinum</i> Bf	ABDP01000001-70
<i>Clostridium botulinum</i> BKT015925	CP002410-5
<i>Clostridium botulinum</i> C Eklund	ABDQ01000001-76
<i>Clostridium botulinum</i> E1 BoNT E Beluga	ACSC01000001-6
<i>Clostridium botulinum</i> E3 Alaska E43	CP001078
<i>Clostridium botulinum</i> F 230613	CP002011-2
<i>Clostridium botulinum</i> F Langeland	CP000728-9
<i>Clostridium botulinum</i> H04402 065	FR773526
<i>Clostridium botulinum</i> NCTC 2916	ABDO02000001-49
<i>Clostridium butyricum</i> E4 BoNT E BL5262	ACOM01000001-13
<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	CP001348
<i>Clostridium cellulovorans</i> 743B	CP002160
<i>Clostridium citroniae</i> WAL-17108	ADLJ01000001-83
<i>Clostridium clariflavum</i> DSM 19732	CP003065
<i>Clostridium clostridioforme</i> 2_1_49FAA	ADLL01000001-148
<i>Clostridium difficile</i> 630	AM180355-6
<i>Clostridium difficile</i> CD196	FN538970
<i>Clostridium difficile</i> NAP07	ADVM01000001-100
<i>Clostridium hathewayi</i> WAL-18680	ADLN01000001-142

Fortsetzung Tab. 15

<i>Clostridium hiranonis</i> DSM 13275	ABWP01000001-101
<i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053	ABYI02000001-167
<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	CP000673-4
<i>Clostridium kluyveri</i> NBRC 12016	AP009049-50
<i>Clostridium lentocellum</i> DSM 5427	CP002582
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	ABCB02000001-22
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	CP001666
<i>Clostridium methylpentosum</i> DSM 5476	ACEC01000001-146
<i>Clostridium papyrosolvans</i> DSM 2782	ACXX02000001-31
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	CP000246
<i>Clostridium perfringens</i> B ATCC 3626	ABDV01000001-98
<i>Clostridium perfringens</i> C JGS1495	ABDU01000001-84
<i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8239	ABDY01000001-55
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	CP000312-5
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	CP000885
<i>Clostridium ramosum</i> DSM 1402	ABFX02000001-16
<i>Clostridium saccharolyticum</i> WM1	CP002109
<i>Clostridium scindens</i> ATCC 35704	ABFY02000001-68
<i>Clostridium</i> sp. 7_2_43FAA	ACDK02000001-58
<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	CP003259
<i>Clostridium</i> sp. HGF2	AENW01000001-60
<i>Clostridium</i> sp. L2-50	AAYW02000001-25
<i>Clostridium</i> sp. M62-1	ACFX02000001-85
<i>Clostridium</i> sp. SS2-1	ABGC03000001-42
<i>Clostridium</i> sp. SY8519	AP012212
<i>Clostridium spiroforme</i> DSM 1552	ABIK02000001-16
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 15579	ABKW02000001-4
<i>Clostridium sticklandii</i> DSM 519	FP565809
<i>Clostridium symbiosum</i> WAL-14163	ADLQ01000001-142
<i>Clostridium tetani</i> E88	AE015927
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	CP000568
<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 1313	CP002416
<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	ABVG02000001-21

A.IV. Bestimmung der Orthologen zu *C. acidurici* 9a

Tab. 16: Orthologe in anderen *Clostridiaceae* zu *C. acidurici* 9a und ihre prozentuale Verteilung unter Berücksichtigung des NW-scores und des e-values.

Die jeweils höchsten und niedrigsten Werte sind in rot markiert. Organismen, die zur Visualisierung in der Gensonne (siehe Abb. 3) verwendet wurden, sind in grün markiert.

Organismus	Orthologe	Orthologe [%]	Orthologe [%]
		(NW>30%, e-value<e-10)	(NW>70%, e-value<e-100)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 15579	1450	51	9,8
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	1427	50	9,3
<i>Clostridium botulinum</i> A2 Kyoto	1421	50	9,7
<i>Clostridium botulinum</i> A3 Loch Maree	1409	50	9,7
<i>Clostridium botulinum</i> B1 Okra	1409	50	9,6
<i>Clostridium botulinum</i> F Langeland	1407	50	9,7
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	1405	49	12,0
<i>Clostridium botulinum</i> A ATCC 3502	1403	49	9,5
<i>Clostridium botulinum</i> NCTC 2916	1401	49	9,5
<i>Clostridium botulinum</i> Ba4 657	1398	49	9,4
<i>Clostridium botulinum</i> A ATCC 19397	1393	49	9,5
<i>Clostridium botulinum</i> H04402 065	1393	49	9,3
<i>Clostridium botulinum</i> Bf	1388	49	9,4
<i>Clostridium botulinum</i> A Hall	1380	49	9,5
<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528	1341	47	8,8
<i>Clostridium botulinum</i> F 230613	1340	47	8,8
<i>Clostridium butyricum</i> E4 BoNT E	1317	46	8,0
<i>Clostridium difficile</i> 630	1310	46	8,9
<i>Clostridium difficile</i> CD196	1304	46	8,8
<i>Clostridium difficile</i> NAP07	1304	46	8,8
<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	1302	46	8,4
<i>Clostridium kluyveri</i> NBRC 12016	1302	46	8,3
<i>Clostridium lentocellum</i> DSM 5427	1287	45	7,0
<i>Clostridium papyrosolvans</i> DSM 2782	1280	45	7,2
<i>Clostridium cellulovorans</i> 743B	1274	45	8,0
<i>Clostridium acetobutylicum</i> EA 2018	1270	45	8,4
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731	1268	45	8,5
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	1267	45	8,4
<i>Clostridium clariflavum</i> DSM 19732	1240	44	8,1
<i>Clostridium</i> sp. 7_2_43FAA	1236	43	8,2
<i>Clostridium botulinum</i> E1 BoNT E	1230	43	8,3
<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	1228	43	7,2
<i>Clostridium botulinum</i> E3 Alaska E43	1222	43	8,2
<i>Clostridium botulinum</i> B Eklund 17B	1195	42	8,2
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	1190	42	6,0

Fortsetzung Tab. 16

<i>Clostridium citroniae</i> WAL-17108	1185	42	4,9
<i>Clostridium bolteae</i> ATCC BAA 613	1177	41	4,4
<i>Clostridium sticklandii</i> DSM 519	1175	41	7,7
<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	1174	41	6,8
<i>Clostridium saccharolyticum</i> WM1	1174	41	5,0
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	1160	41	8,0
<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 1313	1151	40	7,8
<i>Clostridium bartlettii</i> DSM 16795	1143	40	7,4
<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	1135	40	7,6
<i>Clostridium clostridioforme</i> 2_1_49FAA	1129	40	4,6
<i>Clostridium botulinum</i> BKT015925	1127	40	8,4
<i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053	1116	39	4,8
<i>Clostridium symbiosum</i> WAL-14163	1101	39	4,3
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030	1088	38	5,7
<i>Clostridium hathewayi</i> WAL-18680	1087	38	4,8
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	1073	38	7,2
<i>Clostridium scindens</i> ATCC 35704	1059	37	4,6
<i>Clostridium tetani</i> E88	1058	37	7,1
<i>Clostridium botulinum</i> C Eklund	1057	37	7,5
<i>Clostridium perfringens</i> B ATCC 3626	1053	37	7,0
<i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8239	1052	37	7,2
<i>Clostridium perfringens</i> C JGS1495	1049	37	7,1
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	1038	37	7,1
<i>Clostridium</i> sp. M62-1	979	34	4,0
<i>Clostridium</i> sp. SS2-1	955	34	4,3
<i>Clostridium methylpentosum</i> DSM 5476	940	33	3,8
<i>Clostridium hiranonis</i> DSM 13275	938	33	6,7
<i>Clostridium</i> sp. HGF2	924	33	3,0
<i>Clostridium ramosum</i> DSM 1402	895	31	3,4
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	894	31	3,6
<i>Clostridium</i> sp. SY8519	880	31	3,6
<i>Clostridium</i> sp. L2-50	862	30	3,6
<i>Clostridium spiroforme</i> DSM 1552	814	29	3,2

A.V. Gene des *core*-Genoms

Tab. 17: Produkte der Gene des *core*-Genoms und korrespondierende Locus-tags in *C. acidurici* 9a.

Locus-tag	Annotation
Curi_c00010	DnaA:chromosomal replication initiator protein DnaA
Curi_c00020	DnaN:DNA polymerase III subunit beta (2.7.7.7)
Curi_c00040	RecF:DNA replication and repair protein RecF
Curi_c00060	GyrB:DNA gyrase subunit B (5.99.1.3)
Curi_c00070	GyrA:DNA gyrase subunit A (5.99.1.3)
Curi_c01010	RecR:recombination protein RecR
Curi_c01150	PSP1 domain-containing protein
Curi_c01220	MetG:methionyl-tRNA ligase MetG (6.1.1.10)
Curi_c01230	deoxyribonuclease, TatD Mg-dependent
Curi_c01270	KsgA:dimethyladenosine transferase KsgA
Curi_c01370	CopA:copper-translocating P-type ATPase CopA (3.6.3.4)
Curi_c01490	IspE:4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase IspE (2.7.1.148)
Curi_c01780	Fba:fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fba (4.1.2.13)
Curi_c01870	PrfA:peptide chain release factor 1
Curi_c01900	Sua5/YciO/YrdC/YwlC family protein
Curi_c01920	RpiB:ribose 5-phosphate isomerase B (5.3.1.6)
Curi_c01940	CMP/dCMP deaminase zinc-binding protein (3.5.4.12)
Curi_c02260	MetK:methionine adenosyltransferase MetK (2.5.1.6)
Curi_c02340	Fold1:bifunctional 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+)/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase Fold (1.5.1.5;3.5.4.9)
Curi_c02610	SecA:preprotein translocase subunit SecA
Curi_c02630	RNA-binding S1 domain-containing protein
Curi_c02670	putative ATP/GTP hydrolase
Curi_c02690	RimI:ribosomal-protein-alanine acetyltransferase RimI (2.3.1.128)
Curi_c02970	GroEL:60 kDa chaperonin
Curi_c02980	GuaA:GMP synthase GuaA (6.3.5.2)
Curi_c03120	LigA:NAD-dependent DNA ligase LigA (6.5.1.2)
Curi_c03440	ClpP1:ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP (3.4.21.92)
Curi_c05510	PurE:phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit PurE (4.1.1.21)
Curi_c05540	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD-binding protein (1.1.1.-)
Curi_c05650	LonA:ATP-dependent protease LonA (3.4.21.53)
Curi_c06070	ThrS:threonine--tRNA ligase ThrS (6.1.1.3)
Curi_c06400	CadA:cadmium, zinc and cobalt-transporting P-type ATPase CadA (3.6.3.3;3.6.3.5)
Curi_c07020	PyrB:aspartate carbamoyltransferase PyrB (2.1.3.2)
Curi_c07040	PyrC2:dihydroorotase PyrC (3.5.2.3)
Curi_c07060	PyrK:dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit PyrK (1.3.98.1)
Curi_c07070	PyrD:dihydroorotate dehydrogenase PyrD (1.3.5.2)
Curi_c08150	TrpS:tryptophanyl-tRNA ligase TrpS (6.1.1.2)

Fortsetzung Tab. 17

Curi_c08190	Cca:CCA-adding enzyme Cca (2.7.7.72)
Curi_c08220	ValS:Valyl-tRNA ligase ValS (6.1.1.9)
Curi_c08230	FolC:folylpolyglutamate synthetase FolC (6.3.2.17)
Curi_c08440	putative methyltransferase type 12 (2.1.1.-)
Curi_c08460	HslO:33 kDa chaperonin
Curi_c08580	SpoU1:tRNA/tRNA methyltransferase SpoU (2.1.1.-)
Curi_c08590	PheS:phenylalanyl-tRNA ligase alpha subunit PheS (6.1.1.20)
Curi_c08600	PheT:phenylalanyl-tRNA ligase beta subunit PheT (6.1.1.20)
Curi_c08630	peptidase U32
Curi_c08640	MutS1:DNA mismatch repair protein MutS
Curi_c08670	ArgS:arginyl-tRNA ligase ArgS (6.1.1.19)
Curi_c08750	cobalamin B12-binding/radical SAM domain- containing protein
Curi_c09840	ApeA:aminopeptidase M18 family (3.4.11.-)
Curi_c09890	PolA:DNA polymerase I (2.7.7.7)
Curi_c10050	Maf-like protein
Curi_c10060	RadC:DNA repair protein RadC
Curi_c10350	PbpA2:Penicillin-binding protein 1A (2.4.1.-;3.4.-.-)
Curi_c10370	GTP-binding protein
Curi_c10390	putative IMPACT domain-containing protein
Curi_c10440	DNA-binding regulatory protein, YebC/PmpR family
Curi_c10560	RuvA:holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA (3.6.4.12)
Curi_c10570	RuvB:holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB (3.6.4.12)
Curi_c10610	Tgt:queueine tRNA-ribosyltransferase Tgt (2.4.2.29)
Curi_c10640	TrmB:tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase TrmB (2.1.1.33)
Curi_c10850	SpoU2:RNA methyltransferase SpoU (2.1.1.207)
Curi_c10870	TrxB:thioredoxin reductase TrxB (1.8.1.9)
Curi_c10880	GapA:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GapA (1.2.1.12)
Curi_c10910	GpmI:2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase GpmI (5.4.2.1)
Curi_c11790	DapA: dihydrodipicolinate synthase DapA (4.2.1.52)
Curi_c11800	Asd:aspartate-semialdehyde dehydrogenase Asd (1.2.1.11)
Curi_c12200	AroB:3-dehydroquinate synthase AroB (4.2.3.4)
Curi_c12220	AroC:chorismate synthase AroC (4.2.3.5)
Curi_c12830	EngD:GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD
Curi_c12920	Lgt1:prolipoprotein diacylglyceryl transferase Lgt (2.4.99.-)
Curi_c12940	RsmH:ribosomal RNA small subunit methyltransferase H (2.1.1.199)
Curi_c12970	MurE2:UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2, 6- diaminopimelate ligase MurE (6.3.2.13)
Curi_c12980	MraY:phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase MraY (2.7.8.13)
Curi_c13010	MurG:UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N- acetylglucosamine transferase MurG (2.4.1.227)
Curi_c13320	MnmA2:tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA (2.8.1.-)
Curi_c13340	protein of unknown function UPF0118
Curi_c13390	holliday junction resolvase (3.1.-.-)
Curi_c13420	RNA-metabolising metallo-beta-lactamase

Fortsetzung Tab. 17

Curi_c13700	Efp:elongation factor P
Curi_c13840	XseA:exodeoxyribonuclease 7 large subunit XseA (3.1.11.6)
Curi_c13880	putative ribosomal RNA methyltransferase
Curi_c14100	ScpA:segregation and condensation protein A
Curi_c14340	Cmk:cytidylate kinase Cmk (2.7.4.14)
Curi_c15190	MiaA:tRNA Delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase MiaA (2.5.1.75)
Curi_c15400	putative 2',3'-cyclic-nucleotide 2'- phosphodiesterase (3.1.4.16)
Curi_c15450	FtsK:DNA translocase FtsK/SpoIIIE familiy
Curi_c15520	RibF:bifunctional riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase RibF (2.7.1.26;2.7.7.2)
Curi_c15550	RbfA:ribosome-binding factor A
Curi_c15560	InfB:translation initiation factor IF-2
Curi_c15580	NusA:transcription elongation factor NusA
Curi_c15590	RimP:Ribosome maturation factor RimP
Curi_c15630	IspG:4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase IspG (1.17.7.1)
Curi_c15640	putative membrane-associated zinc metalloprotease
Curi_c15660	CdsA:phosphatidate cytidyltransferase CdsA (2.7.7.41)
Curi_c15680	Frr:ribosome recycling factor Frr
Curi_c15690	PyrH:uridylate kinase PyrH (2.7.4.22)
Curi_c15700	Tsf:elongation factor Ts
Curi_c16100	TopA:DNA topoisomerase 1 (5.99.1.2)
Curi_c16170	RnhB:ribonuclease HII (3.1.26.4)
Curi_c16180	RbgA:ribosome biogenesis GTPase A
Curi_c16260	FtsY:signal recognition particle-docking protein FtsY
Curi_c16290	Rnc:ribonuclease III (3.1.26.3)
Curi_c16300	FabF:3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II (2.3.1.179;2.3.1.-)
Curi_c16320	FabG2:3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG (1.1.1.100)
Curi_c16330	FabD:malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase FabD (2.3.1.39)
Curi_c16390	AckA:acetate kinase AckA (2.7.2.1)
Curi_c16620	CoaD:Phosphopantetheine adenylyltransferase CoaD (2.7.7.3)
Curi_c16630	RNA methyltransferase, RsmD family (2.1.1.171)
Curi_c16690	RecG:ATP-dependent DNA helicase RecG (3.6.4.12)
Curi_c16740	ThiN:thiamine pyrophosphokinase ThiN (2.7.6.2)
Curi_c16760	Rpe:ribulose-phosphate 3-epimerase Rpe (5.1.3.1)
Curi_c16770	RsgA:putative ribosome biogenesis GTPase RsgA (3.6.1.-)
Curi_c16780	Sps:serine/threonine-protein kinase Sps (2.7.11.1)
Curi_c16790	PrpC:protein phosphatase-2C (3.1.3.16)
Curi_c16840	Fmt:methionyl-tRNA formyltransferase Fmt (2.1.2.9)
Curi_c16860	PriA:primosome assembly protein PriA (3.6.4.-)
Curi_c16920	FbpA:fibronectin-binding protein FbpA
Curi_c16950	pseudouridine synthase, RluA family (5.4.99.23)
Curi_c17020	putative pyridoxal phosphate enzyme, YggS family
Curi_c17160	EngA:GTP-binding protein EngA

Fortsetzung Tab. 17

Curi_c17280	ThiF2:molybdopterin/thiamine biosynthesis protein ThiF
Curi_c17290	AspS:aspartyl-tRNA synthetase AspS (6.1.1.12)
Curi_c17330	beta-lactamase domain-containing protein
Curi_c17350	SpoT:GTP pyrophosphokinase/(p)ppGpp synthetase I (2.7.6.5;3.1.7.2)
Curi_c17390	RecJ:single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ (3.1.-.-)
Curi_c17880	NrdD:anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase NrdD (1.17.4.2)
Curi_c18010	hypothetical protein DUF633
Curi_c18030	RpoD3:RNA polymerase factor sigma-70 RpoD (2.7.7.6)
Curi_c18040	DnaG:DNA primase DnaG (2.7.7.-)
Curi_c18100	Era:GTP-binding protein Era
Curi_c18150	putative metalloprotease
Curi_c18210	histidine triad (HIT) family protein
Curi_c18270	DnaJ:chaperone protein DnaJ
Curi_c18280	DnaK:chaperone protein DnaK
Curi_c18290	GrpE:nucleotide exchange factor GrpE
Curi_c18310	HemN:oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase 1 (1.3.99.22)
Curi_c18320	LepA:GTP-binding protein LepA
Curi_c18810	BacA:undecaprenyl-diphosphatase/bacitracin resistance protein BacA (3.6.1.27)
Curi_c19090	AddA:ATP-dependent helicase/deoxyribonuclease, subunit A (3.6.1.-)
Curi_c19100	AddB:ATP-dependent helicase/deoxyribonuclease, subunit B (3.6.1.-)
Curi_c19850	RplU:50S ribosomal protein L21
Curi_c19910	MinD:septum site-determining protein MinD
Curi_c20170	RumA2:23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase RumA (2.1.1.-)
Curi_c20210	PfkA:6-phosphofructokinase PfkA (2.7.1.11)
Curi_c20240	WhiA:sporulation transcription regulator
Curi_c20270	nucleotide-binding protein
Curi_c20290	MurB:UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase MurB (1.1.1.158)
Curi_c20350	UvrC1:exinuclease ABC system, subunit C
Curi_c20520	UvrA:exinuclease ABC system, subunit A
Curi_c20530	UvrB:exinuclease ABC system, subunit B
Curi_c20910	putative cation efflux rotein
Curi_c21260	LeuS:leucyl-tRNA ligase LeuS (6.1.1.4)
Curi_c21840	GlmS:glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (2.6.1.16)
Curi_c22310	CbiQ1:cobalt transporter permease protein CbiQ
Curi_c22340	RplQ:50S ribosomal protein L17
Curi_c22350	RpoA:DNA-directed RNA polymerase, subunit alpha (2.7.7.6)
Curi_c22380	RpsM:30S ribosomal protein S13
Curi_c22420	Adk:adenylate kinase Adk (2.7.4.3)
Curi_c22430	SecY:preprotein translocase subunit SecY
Curi_c22440	RplO:50S ribosomal protein L15
Curi_c22470	RplR:50S ribosomal protein L18
Curi_c22480	RplF:50S ribosomal protein L6

Fortsetzung Tab. 17

Curi_c22490	RpsH:30S ribosomal protein S8
Curi_c22510	RplE:50S ribosomal protein L5
Curi_c22520	RplX:50S ribosomal protein L24
Curi_c22530	RplN:50S ribosomal protein L14
Curi_c22560	RplP:50S ribosomal protein L16
Curi_c22570	RpsC:30S ribosomal protein S3
Curi_c22580	RplV:50S ribosomal protein L22
Curi_c22620	RplD:50S ribosomal protein L4
Curi_c22660	FusA:elongation factor G
Curi_c22670	RpsG:30S ribosomal protein S7
Curi_c22680	RpsL:30S ribosomal protein S12
Curi_c22840	SpoU3:RNA methyltransferase, TrmH family group 3 (2.1.1.-)
Curi_c22860	ribonuclease III
Curi_c22870	CysS:cysteinyI-tRNA synthetase CysS (6.1.1.16)
Curi_c23070	IspF:2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase IspF (4.6.1.12)
Curi_c23610	GreA:transcription elongation factor GreA
Curi_c23630	DusB:tRNA-dihydrouridine synthase B (1.-.-.-)
Curi_c23670	FtsH3:ATP-dependent metalloprotease FtsH (3.6.4.3)
Curi_c23840	Pth:peptidyl-tRNA hydrolase Pth (3.1.1.29)
Curi_c23850	PrsA:ribose-phosphate pyrophosphokinase PrsA (2.7.6.1)
Curi_c23890	MurC:UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase MurC (6.3.2.8)
Curi_c24060	TyrS:tyrosyl-tRNA ligase (6.1.1.1)
Curi_c24110	ProC:pyrroline-5-carboxylate reductase ProC (1.5.1.2)
Curi_c24520	FAD-dependent dehydrogenase domain-containing protein
Curi_c28260	RlmH:ribosomal RNA large subunit methyltransferase H (2.1.1.-)
Curi_c28290	metallo-beta-lactamase family protein
Curi_c28530	DnaC:replicative DNA helicase DnaC (3.6.1.-)
Curi_c28580	Ssb2:single-stranded DNA-binding protein Ssb
Curi_c29430	parB-like partition protein
Curi_c29500	MnmG:tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG
Curi_c29520	MnmE:tRNA modification GTPase MnmE (3.6.-.-)
Curi_c29540	single-stranded nucleic acid binding R3H domain- containing protein

A.VI. Potentielle Fremdgene im Genom von *C. acidurici* 9a

Tab. 18: Auflistung der durch IslandViewer und COLOMBO identifizierten potentiellen Fremdgene.

Lokus-Tag	Start	Stopp	Annotation
Curi_c03830	408356	409213	putative lipoprotein
Curi_c03840	410023	409397	ABC transporter, permease protein
Curi_c03850	410844	410128	ABC transporter, ATP-binding protein
Curi_c03860	411689	410928	MerR family transcriptional regulator
Curi_c03870	412331	412903	acetyltransferase, GNAT family
Curi_c04340	468176	468547	putative parB-like partition protein
Curi_c04350	468704	469402	hypothetical protein
Curi_c04360	469647	470132	HTH-type 3 domain-containing protein
Curi_c04370	470213	471811	hypothetical protein
Curi_c04380	471818	472975	hypothetical protein
Curi_c04420	480940	482628	potassium/proton antiporter
Curi_c04430	483398	483874	hypothetical protein
Curi_c04440	484118	484294	hypothetical protein
Curi_c04450	484723	485319	TetR family transcriptional regulator
Curi_c04460	485334	485873	acetyltransferase, GNAT family
Curi_c04500	488914	489927	ABC transporter permease protein
Curi_c04510	489924	490955	ABC transporter permease protein
Curi_c04520	490952	491704	ABC transporter ATP-binding protein
Curi_c04530	492828	493226	HTH-type transcriptional regulator, AraC family
Curi_c04540	493246	493839	ATP-dependent endopeptidase Clp
Curi_c04550	494391	495869	RA2 family drug resistance ABC transporter ATP-binding protein
Curi_c04560	496034	497068	ribosomal RNA large subunit methyltransferase Cfr
Curi_c04570	497773	497351	transcriptional regulator, MerR family
Curi_c04580	497993	498619	NADPH-dependent FMN reductase RutF
Curi_c04590	498851	499489	methyltransferase type 12
Curi_c04600	499834	500556	signal transduction response regulator
Curi_c04610	500557	501984	signal transduction histidine kinase
Curi_c04620	501968	502537	hypothetical protein
Curi_c04630	502624	503367	hypothetical protein
Curi_c04640	503887	504582	nitroreductase
Curi_c04650	504864	505400	acetyltransferase, GNAT family
Curi_c04660	505895	506653	AraC type HTH- domain containing protein
Curi_c04670	506699	507403	transglutaminase domain-containing protein
Curi_c04680	507667	508284	methyltransferase type 12
Curi_c04690	508706	509404	two-component system signal transduction response regulator
Curi_c04700	509394	510338	two-component system signal transduction histidine kinase

Fortsetzung Tab. 18

Curi_c04710	510469	511137	ABC transporter ATP-binding protein
Curi_c04710	510469	511137	ABC transporter ATP-binding protein
Curi_c04720	511148	513541	ABC transporter permease protein
Curi_c04730	513877	514026	hypothetical protein
Curi_c04740	514231	515697	FAD linked oxidase domain-containing protein
Curi_c04750	516073	516288	hypothetical protein
Curi_c04760	517040	516558	chromate transport protein ChrA
Curi_c04780	519019	519927	LysR family transcriptional regulator
Curi_c04790	520343	521125	ABC transporter ATP-binding protein
Curi_c04800	521115	523172	ABC transporter permease protein
Curi_c04810	523184	523861	signal transduction response regulator
Curi_c04820	523858	524880	signal transduction histidine kinase
Curi_c04830	526053	525868	hypothetical protein
Curi_c04840	527691	526297	soluble quinoprotein glucose/sorbosone dehydrogenase
Curi_c04850	528082	528642	ribosomal RNA adenine methylase transferase
Curi_c04860	528660	529346	signal transduction response regulator
Curi_c04870	529523	530437	signal transduction histidine kinase
Curi_c04880	530644	531009	glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
Curi_c04890	531867	531100	helix-turn-helix domain-containing protein, AraC type
Curi_c04900	532300	533250	ferrichrome ABC transporter substrate-binding protein FhuD
Curi_c04910	533237	534061	ferrichrome ABC transporter permease protein FhuB
Curi_c04920	534224	535231	ferrichrome ABC transporter permease protein FhuG
Curi_c04930	535232	536026	ferrichrome ABC transporter ATP-binding protein FhuC
Curi_c04940	536023	537270	major facilitator superfamily MFS-1
Curi_c04950	538362	540143	adenine deaminase Ade
Curi_c04960	540260	541846	hypothetical protein
Curi_c04970	542439	543311	membrane-bound metal-dependent hydrolase
Curi_c04980	543693	544037	hypothetical protein
Curi_c04990	544339	545706	cytosine deaminase CodA
Curi_c05000	546049	546597	TetR family transcriptional regulator
Curi_c05000	546049	546597	TetR family transcriptional regulator
Curi_c05010	546897	548690	myosin-cross-reactive antigen
Curi_c05020	548924	549451	iron hydrogenase HydA
Curi_c05030	550062	551315	agmatine deaminase AguA
Curi_c05040	551981	552676	putative vancomycin response regulator
Curi_c05050	553280	554140	vancomycin B/G-type resistance protein VanW
Curi_c05090	558780	560255	hypothetical protein
Curi_c05100	560488	560757	hypothetical protein
Curi_c05110	561096	561860	sporulation-specific N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase CwlC
Curi_c05120	562082	562255	AraC family transcriptional regulator

Fortsetzung Tab. 18

Curi_c05130	562374	563219	acetyltransferase, GNAT family
Curi_c05140	563564	564661	release factor H-coupled RctB family protein
Curi_c05150	564664	565296	peptide chain release factor H
Curi_c05160	566081	566938	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein
Curi_c05170	567851	567294	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase PgsA
Curi_c05180	568173	570296	M28 family peptidase
Curi_c05190	571065	571811	RelA/SpoT domain-containing protein
Curi_c05200	572411	573382	ABC transporter ATP-binding protein
Curi_c05210	573402	574181	ABC transporter permease protein
Curi_c05310	582859	584325	putative nicotinic phosphoribosyltransferase
Curi_c05320	584512	585009	acetyltransferase, GNAT family
Curi_c05330	586641	585067	hypothetical protein
Curi_c05340	587037	587864	polysaccharide deacetylase
Curi_c05350	587903	589204	signal transduction histidine kinase
Curi_c05360	589185	590024	signal transduction response regulator
Curi_c05370	590210	591604	sodium:alanine symporter family protein
Curi_c05430	597577	598470	acetamidase/formamidase family protein
Curi_c05440	598594	599340	signal transduction response regulator
Curi_c05450	599340	600386	sensor signal transduction histidine kinase
Curi_c05460	600547	602943	ABC transporter ATP-binding/permease protein
Curi_c05470	603442	604101	RNA polymerase sigma factor, sigma-70 family
Curi_c05480	604085	604843	hypothetical protein
Curi_c05490	605103	605258	IS200-like transposase domain-containing protein
Curi_c05500	605283	605624	truncated sodium:alanine symporter family protein
Curi_c05680	626918	629014	S-layer domain-containing protein
Curi_c05690	629181	631244	S-layer domain-containing protein
Curi_c05700	631421	633481	S-layer-like domain-containing protein
Curi_c05710	633755	635836	S-layer-like domain-containing protein
Curi_c05720	636014	638092	S-layer-like domain-containing protein
Curi_c05730	638268	638666	toxin secretion/phage lysis holin
Curi_c05740	638822	639412	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase GpmA
Curi_c05750	639473	639946	iron hydrogenase HydA
Curi_c05760	640027	640863	cobyric acid synthase CobQ
Curi_c05770	640867	641832	adenosylcobinamide-phosphate synthase CobD
Curi_c05780	641847	642899	L-threonine-O-3-phosphate decarboxylase CobB
Curi_c05790	642962	643522	adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase CobU
Curi_c05800	643531	644265	cobalamin 5'-phosphate synthase CobS
Curi_c06640	748856	749635	transcriptional regulator, LytTR family
Curi_c06650	750490	751323	hypothetical protein

Fortsetzung Tab. 18

Curi_c06660	751559	752392	hypothetical protein
Curi_c06670	752624	753442	hypothetical protein
Curi_c11030	1190935	1190720	hypothetical protein
Curi_c11040	1192327	1192602	hypothetical protein
Curi_c11050	1192771	1192971	hypothetical protein
Curi_c11060	1193851	1194633	hypothetical protein
Curi_c11070	1195117	1195971	hypothetical protein
Curi_c11080	1196453	1196127	putative cupin 2
Curi_c11090	1197147	1196503	putative metallo-beta-lactamase family protein
Curi_c11100	1197362	1197697	putative transcriptional regulator, HxlR family
Curi_c11110	1198012	1198395	glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
Curi_c11120	1199148	1200158	hypothetical protein
Curi_c14200	1511489	1512079	accessory gene regulator B
Curi_c14210	1513642	1513830	hypothetical protein
Curi_c14220	1513833	1514075	hypothetical protein
Curi_c14230	1514078	1514281	hypothetical protein
Curi_c14240	1514285	1514965	hypothetical protein
Curi_c19600	2059409	2059711	hypothetical protein
Curi_c19610	2060265	2059855	CGGC domain-containing protein
Curi_c19620	2060349	2061818	HTH-type transcriptional regulator, GntR family
Curi_c19630	2062985	2062482	nitroreductase
Curi_c19640	2063148	2064032	HTH-type transcriptional regulator, LysR family
Curi_c19650	2065085	2065525	hypothetical protein
Curi_c19660	2065820	2066464	hypothetical protein
Curi_c19670	2067385	2067008	hypothetical protein

A.VII. Vergleich clostridialer Plasmide

Tab. 19: Verwendete Plasmide des Genus *Clostridium* zum Vergleich ihrer Größe und der Anzahl ihrer Gene.

Name (<i>accession</i> -Nummer)	Größe [bp]	Anzahl Gene
pCuri3 (CP003327)	2.913	3
pSMBa (CP002661)	191.996	176
pSMBb (CP002662)	11.123	9
pCLJ (CP001081)	270.022	310
pCLJ2 (CP001082)	9.953	6
pCD630 (AM180356)	7.881	11
pCKL555A (CP000674)	59.182	75
pSM101A (CP000313)	12.397	10
pSM101B (CP000314)	12.206	11
pE88 (AF528097)	74.082	61
pMCF-1 (U59416)	2.450	1
p17BNRP (FR745876)	47.689	36
pBOT3502 (AM412318)	16.344	19
pCLI (CP000729)	17.531	24
pCLK(CP000963)	266.785	329
EA2018plasmid (CP002119)	191.996	176
pCBF (CP002012)	17.531	25
pIP404 (M32882)	10.206	10
pCBM588 (AB365348)	8.060	9
pSOL1 (AE001438)	192.000	178
p1BKT015925 (CP002411)	203.897	222
p2BKT015925 (CP002412)	98.732	105
p3BKT015925 (CP002413)	80.365	92
p4BKT015925 (CP002414)	39.648	51
p5BKT015925 (CP002415)	12.403	13
pCP8533cpb (AB736083)	3.948	5
pCP8533S12 (AB736082)	11.891	16
pCLG1 (CP001659)	107.690	130
pCLG2 (CP001660)	54.152	49
pCLL (CP001057)	47.642	56
pCLD (CP000940)	148.780	194
pJIR3536(JN689219)	82.146	83
pJIR3537 (JN689220)	48.787	52
pJIR3843 (JN689218)	3.183	5
pJIR3844 (JN689217)	70.192	83
pCPPB-1 (AB604032)	67.479	71
p19 (HM590571)	19.899	21
pCW3 (DQ366035)	47.263	51

Fortsetzung Tab. 19

pC2C203U28 (AP010934)	106.981	123
pCP8533etx (AB444205)	64.753	62
pCP13 (AP003515)	54.310	63
pCPF4969 (AB236336)	70.480	61
pCPF5603 (AB236337)	75.268	69
pBCNF5603 (AB189671)	36.695	36

A.VIII. Bestimmung der Oligonukleotid-Effizienzen zur PCN-Berechnung

Tab. 20: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *dnaA* (cau825/cau826).

Als unverdünnte Ausgangskonzentration wurden etwa 100-200 ng/μl DNA eingesetzt. Für die „Konzentrationen“ wurden besser handhabbare Zahlen eingesetzt, das Verhältnis zueinander blieb dabei jedoch bestehen. Aus den von der IQ5-Software bestimmten Ct-Werten (vier pro Verdünnungsstufe) wurden der mittlere Ct und die Standardabweichung (StAbw) gebildet.

Verdünnung DNA	„Konzentration“	\log_{10} („Konz.“)	mittlerer Ct	StAbw (Ct)
1:250	10	1	21.89135432	0.103613843
1:125	20	1,3	20.84572069	0.111635488
1:50	50	1,7	19.57181209	0.244833054
1:25	100	2	18.69590053	0.217935422
1:5	500	2,7	15.94235365	0.050376489
1:1	2500	3,4	13.52416338	0.296171754

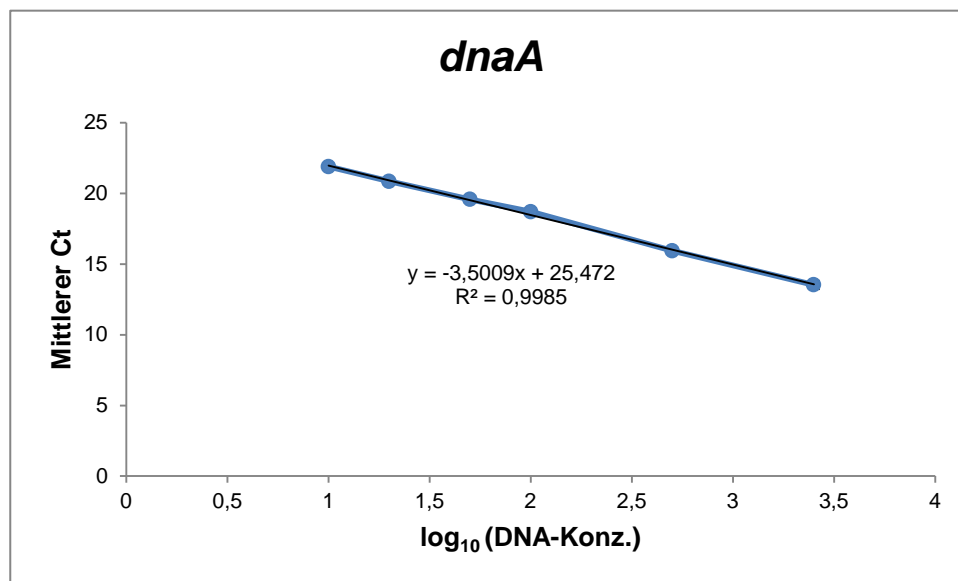


Abb. 32: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *dnaA*.

Zur Bestimmung der Steigung der Trendlinie (schwarz) wurden die jeweils mittleren Ct-Werte gegen den \log_{10} der DNA-Konzentration aufgetragen. Die Steigung von $y = -3,5009$ wurde automatisch berechnet. Das Oligonukleotidpaar für *dnaA* bestand aus cau825 und cau826. Die Werte wurden aus **Tab. 20** entnommen.

Tab. 21: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *repB* (cau831/cau832).

Als unverdünnte Ausgangskonzentration wurden etwa 100-200 ng/μl DNA eingesetzt. Für die „Konzentrationen“ wurden besser handhabbare Zahlen eingesetzt, das Verhältnis zueinander blieb dabei jedoch bestehen. Aus den von der IQ5-Software bestimmten Ct-Werten (vier pro Verdünnungsstufe) wurden der mittlere Ct und die Standardabweichung (StAbw) gebildet.

Verdünnung DNA	„Konzentration“	\log_{10} („Konz.“)	mittlerer Ct	StAbw (Ct)
1:250	10	1	19.09842417	0.235644698
1:125	20	1,3	17.94248265	0.022453464
1:50	50	1,7	16.29055076	0.105419323
1:25	100	2	15.61241976	0.075685544
1:5	500	2,7	12.73962173	0.025600413
1:1	2500	3,4	10.59205948	0.071375394

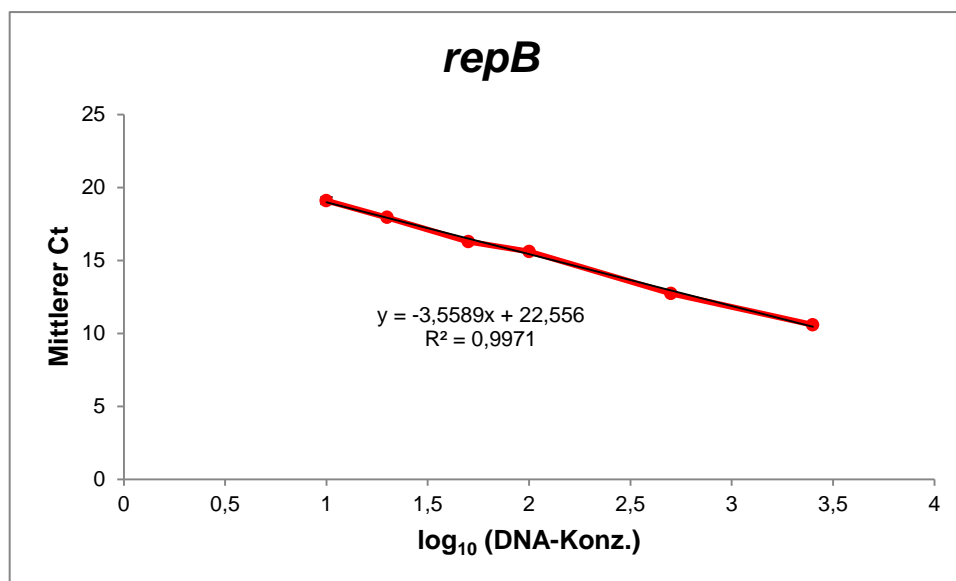


Abb. 33: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *repB*.

Zur Bestimmung der Steigung der Trendlinie (schwarz) wurden die jeweils mittleren Ct-Werte gegen den \log_{10} der DNA-Konzentration aufgetragen. Die Steigung von $y = -3,5589$ wurde automatisch berechnet. Das Oligonukleotidpaar für *repB* bestand aus cau831 und cau832. Die Werte wurden **Tab. 21** entnommen.

A.IX. Na⁺-bindende Motive in der Aminosäuresequenz von F₁F₀-ATPasen

Ca	1	-----MIQGISSEAFVLGCSAIGAGLAVITGIGAGIGGSAAGRAAEAVGRQ	47
Aw1a	1	MIGDMNIVDFVIQFLSQFDPVDVIKGFSAIGIGLAMVAGVGGIGGGFAAGKGAEAVGKN	60
Aw1b	105	-----VWILSASAMASGIAMIAGIGPGTGGGYAAGKGAEAVGIR	143
Aw2	1	-----MEGLDFIKACSAIGAGIAMIAGVGGIGGGFAAGKGAEAVGRQ	43
Aw3	1	-----MEGLDFIKACSAIGAGIAMIAGVGGIGGGFAAGKGAEAVGRQ	43
Pm	1	-----MDMVLAKTVVLAASAVGAGAAMIAGIGPGVGGGYAAGKAVESVARQ	46
Ca	48	PEAQGDIIKTMILGQAVAEESTGIYGLVIAIILLFVRPLMGAL--	89
Aw1a	61	PTKSNDIVMIMLLGAAVAETSGIFSLVIALILLFANPFISSTAS	104
Aw1b	144	PEMKSAILRVMLLQAVAQTTGIYALIVALILMYANPFL-----	182
Aw2	44	PEAQSDIIRTMLLGAAVAETTGIYGLIVALILLFANPFF-----	82
Aw3	44	PEAQSDIIRTMLLGAAVAETTGIYGLIVALILLFANPFF-----	82
Pm	47	PEAKGDIISTMVLGQAIAESTGIYSLVIALILLYANPFVGLLG-	89

Abb. 34: Aminosäurealignment des Proteolipids der Na⁺-F₁F₀-ATPase von *C. acidurici* 9a mit den Proteolipiden anderer Organismen.

Ca, AtpE aus *C. acidurici* 9a; Aw1a, AtpE1 aus *A. woodii* DSM 1030, Aminosäurereste 1-104; Aw1b, AtpE1 aus *A. woodii* DSM 1030, Aminosäurereste 105-182; Aw2, AtpE2 aus *A. woodii* DSM 1030; Aw3, AtpE3 aus *A. woodii* DSM 1030; Pm, AtpE aus *Propionigenium modestum*. Grün unterlegte Aminosäuren stellen die Na⁺-Bindemotive dar. Die Abbildung wurde modifiziert nach Rahlfs et al. (Rahlfs et al, 1999; Rahlfs & Müller, 1999)

A.X. Bestimmung des Wachstums von *C. acidurici* 9a in Gegenwart von Antibiotika

Tab. 22: Antibiogramm von *C. acidurici* 9a.

Die Sensitivität wurde in Standard-Harnsäure-Medium getestet, supplementiert mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden antimikrobiellen Substanz. Alle Tests wurden in Triplikaten durchgeführt und der Durchschnitt sowie die Standardabweichung ermittelt.

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Maximum OD _{600nm} [\bar{O}]	Standardabweichung
Vancomycin	5	0.44	0.02
	10	0.3	0.02
	20	0.09	0.009
	40	0.09	0.008
Ampicillin	20	0.3	0.02
	50	0.28	0.02
	100	0.19	0.01
	150	0.07	0.008
Bacitracin	10	0.69	0.02
	30	0.71	0.03
	50	0.69	0.01
	100	0.72	0.01
Chloramphenicol	5	0.54	0.03
	10	0.35	0.01
	30	0.23	0.02
	50	0.22	0.009
Thiamphenicol	2	0.51	0.02
	5	0.45	0.01
	15	0.33	0.02
	30	0.22	0.03
Erythromycin	5	0.36	0.009
	10	0.24	0.02
	50	0.1	0.01
	100	0.1	0.01
Clarithromycin	2	0.49	0.01
	5	0.41	0.02
	10	0.36	0.01
	20	0.2	0.02
Acriflavin	50	0.63	0.01
	150	0.62	0.02
	250	0.64	0.01
	350	0.61	0.02
4-Azaleucin	30	0.63	0.02
	50	0.62	0.04
	100	0.63	0.01
	200	0.61	0.03
Kanamycin	20	0.09	0.009
	50	0.08	0.009
	100	0.08	0.02
	150	0.07	0.01

Fortsetzung Tab. 22

Gentamicin	10	0.07	0.01
	20	0.08	0.01
	50	0.08	0.008
	100	0.09	0.01
Tetracyclin	5	0.1	0.009
	10	0.08	0.009
	20	0.09	0.01
	30	0.09	0.01
Ohne Antibiotikum	-	0.7	0.03

A.XI. Bestimmung der Oligonukleotid-Effizienzen zur *real-time*-Analyse des *cop*-Operons

Tab. 23: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *rpoA* (cau827/cau828).

Als unverdünnte Ausgangskonzentration wurden etwa 100-250 ng/μl DNA eingesetzt. Für die „Konzentrationen“ wurden besser handhabbare Zahlen eingesetzt, das Verhältnis zueinander blieb dabei jedoch bestehen. Aus den von der IQ5-Software bestimmten Ct-Werten (vier pro Verdünnungsstufe) wurden der mittlere Ct und die Standardabweichung (StAbw) gebildet. Rot markierte Zahlen wurden bei der anschließenden Bestimmung der Steigung nicht berücksichtigt.

Verdünnung cDNA	“Konzentration”	\log_{10} (“Konz.”)	mittlerer Ct	StAbw (Ct)
1:250	10	1	25.5338	0.2112
1:125	20	1,3	23.5727	0.0957
1:50	50	1,7	20.8748	0.0657
1:25	100	2	18.4871	0.1380
1:5	500	2,7	14.9653	0.0158
1:1	2500	3,4	25.5338	0.2112

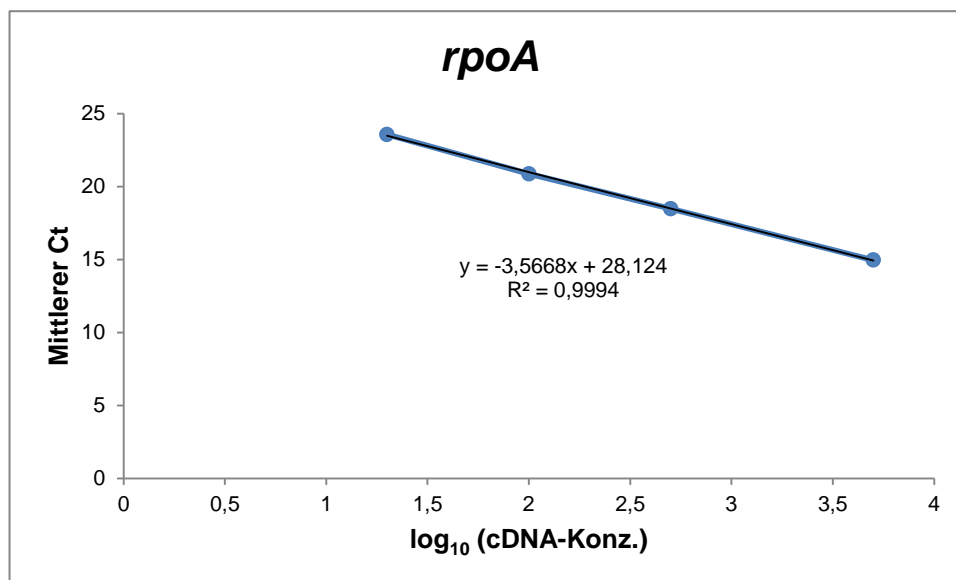


Abb. 35: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *rpoA*.

Zur Bestimmung der Steigung der Trendlinie (schwarz) wurden die jeweils mittleren Ct-Werte gegen den \log_{10} der cDNA-Konzentration aufgetragen. Die Steigung von $y = -3,5668$ wurde automatisch berechnet. Das Oligonukleotidpaar für *rpoA* bestand aus cau827 und cau828. Die Werte wurden **Tab. 23** entnommen.

Tab. 24: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *copA* (cau803/cau804).

Als unverdünnte Ausgangskonzentration wurden etwa 100-250 ng/μl DNA eingesetzt. Für die „Konzentrationen“ wurden besser handhabbare Zahlen eingesetzt, das Verhältnis zueinander blieb dabei jedoch bestehen. Aus den von der IQ5-Software bestimmten Ct-Werten (vier pro Verdünnungsstufe) wurden der mittlere Ct und die Standardabweichung (StAbw) gebildet.

Verdünnung cDNA	„Konzentration“	\log_{10} („Konz.“)	mittlerer Ct	StAbw (Ct)
1:250	10	1	28.86	0.233234676
1:125	20	1,3	27.70	0.11720018
1:50	50	1,7	25.21	0.059086892
1:25	100	2	22.95	0.079111402
1:5	500	2,7	19.36	0.071385529
1:1	2500	3,4	28.86	0.233234676

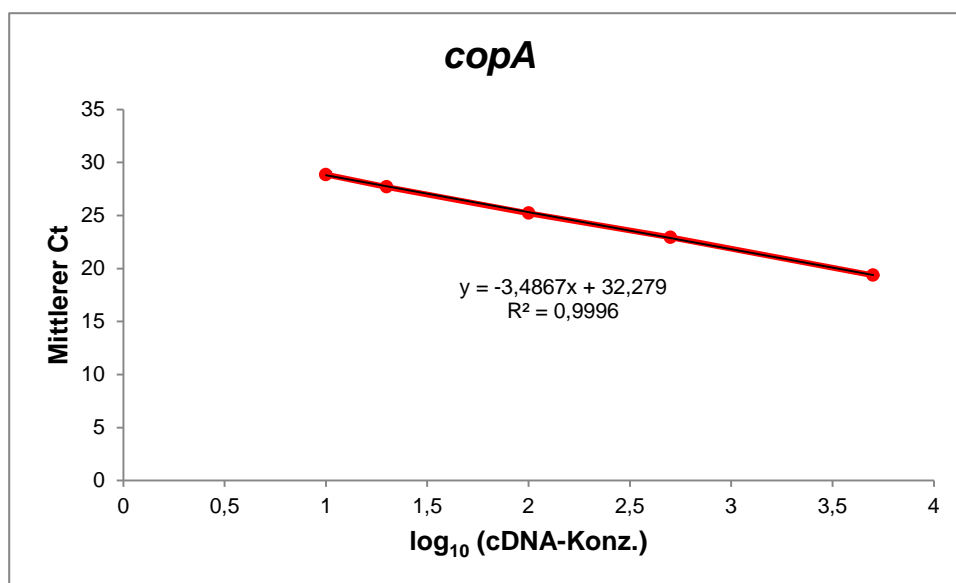


Abb. 36: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *copA*.

Zur Bestimmung der Steigung der Trendlinie (schwarz) wurden die jeweils mittleren Ct-Werte gegen den \log_{10} der cDNA-Konzentration aufgetragen. Die Steigung von $y = -3,4867$ wurde automatisch berechnet. Das Oligonukleotidpaar für *copA* bestand aus cau803 und cau804. Die Werte wurden **Tab. 24** entnommen.

Tab. 25: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *copZ* (cau807/cau808).

Als unverdünnte Ausgangskonzentration wurden etwa 100-250 ng/μl DNA eingesetzt. Für die „Konzentrationen“ wurden besser handhabbare Zahlen eingesetzt, das Verhältnis zueinander blieb dabei jedoch bestehen. Aus den von der IQ5-Software bestimmten Ct-Werten (vier pro Verdünnungsstufe) wurden der mittlere Ct und die Standardabweichung (StAbw) gebildet. Rot markierte Zahlen wurden bei der anschließenden Bestimmung der Steigung nicht berücksichtigt.

Verdünnung cDNA	„Konzentration“	\log_{10} („Konz.“)	mittlerer Ct	StAbw (Ct)
1:250	10	1	31.01399615	1.427982899
1:125	20	1,3	28.85922422	0.067787204
1:50	50	1,7	26.43657541	0.065490107
1:25	100	2	23.84406887	0.050034013
1:5	500	2,7	20.3121744	0.048851849
1:1	2500	3,4	31.01399615	1.427982899

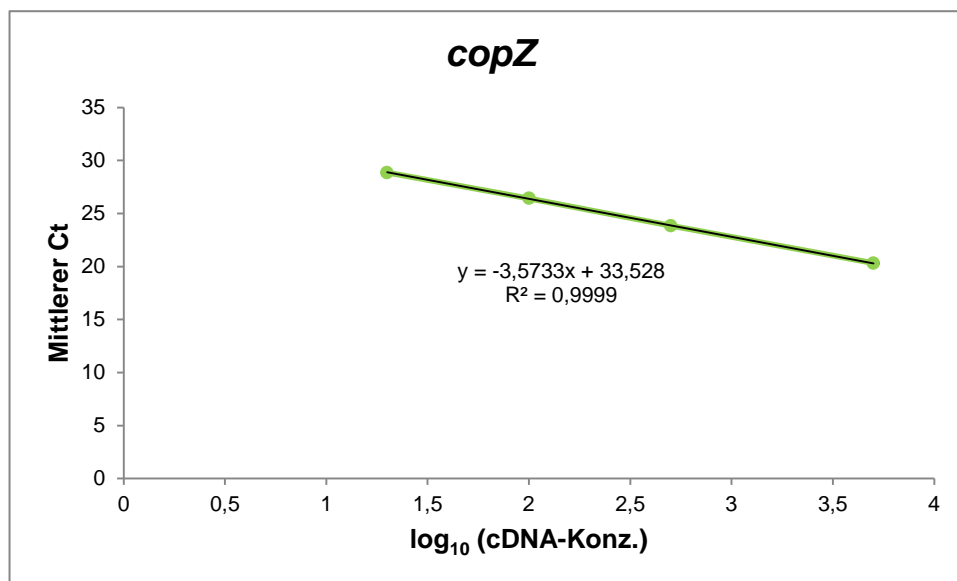


Abb. 37: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *copZ*.

Zur Bestimmung der Steigung der Trendlinie (schwarz) wurden die jeweils mittleren Ct-Werte gegen den \log_{10} der cDNA-Konzentration aufgetragen. Die Steigung von $y = -3,4867$ wurde automatisch berechnet. Das Oligonukleotidpaar für *copA* bestand aus cau807 und cau808. Die Werte wurden **Tab. 25** entnommen.

Tab. 26: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *csor* (cau813/cau814).

Als unverdünnte Ausgangskonzentration wurden etwa 100-250 ng/μl DNA eingesetzt. Für die „Konzentrationen“ wurden besser handhabbare Zahlen eingesetzt, das Verhältnis zueinander blieb dabei jedoch bestehen. Aus den von der IQ5-Software bestimmten Ct-Werten (vier pro Verdünnungsstufe) wurden der mittlere Ct und die Standardabweichung (StAbw) gebildet. Rot markierte Zahlen wurden bei der anschließenden Bestimmung der Steigung nicht berücksichtigt.

Verdünnung cDNA	„Konzentration“	\log_{10} („Konz.“)	mittlerer Ct	StAbw (Ct)
1:250	10	1	30.50	0.195387486
1:125	20	1,3	28.87	0.175183139
1:50	50	1,7	26.37	0.132829781
1:25	100	2	23.85	0.093443635
1:5	500	2,7	20.13	0.17962058
1:1	2500	3,4	30.50	0.195387486

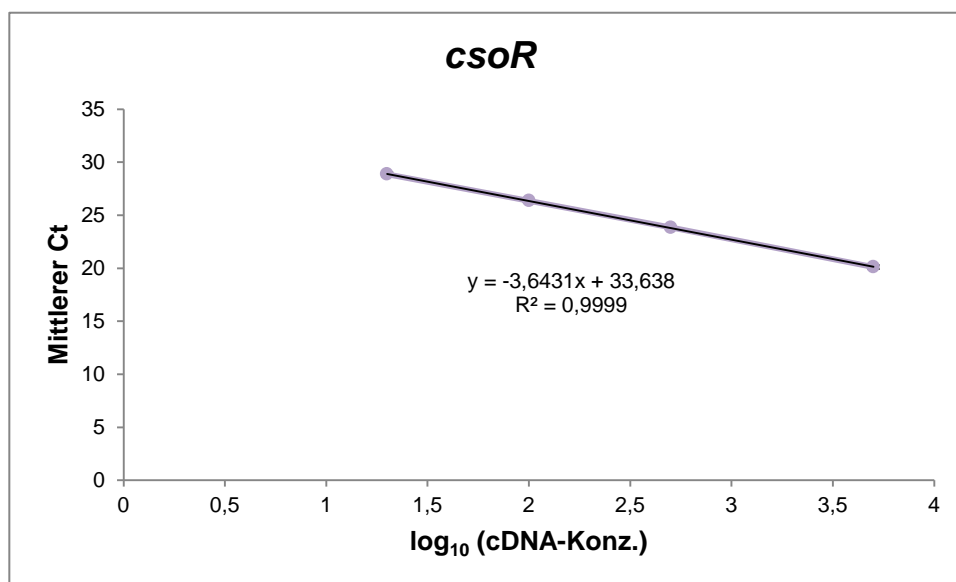


Abb. 38: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für *csor*.

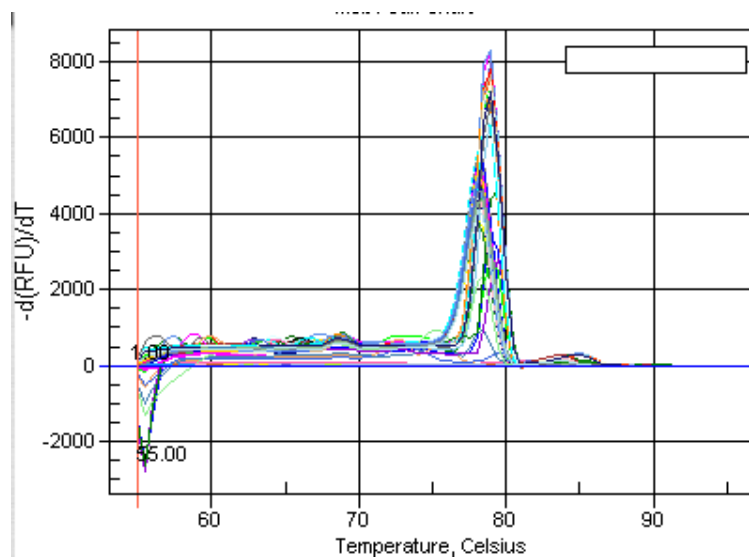
Zur Bestimmung der Steigung der Trendlinie (schwarz) wurden die jeweils mittleren Ct-Werte gegen den \log_{10} der cDNA-Konzentration aufgetragen. Die Steigung von $y = -3,6431$ wurde automatisch berechnet. Das Oligonukleotidpaar für *csor* bestand aus cau813 und cau814. Die Werte wurden **Tab. 26** entnommen.

Tab. 27: Steigung der Ausgleichsgeraden und Effizienzen der Oligonukleotidpaare für das *cop*-Operon.

Oligonukleotidpaar	Steigung	Effizienz	Effizienz [%]
<i>copA</i> (cau803/cau804)	-3,4559	1,947	94,7
<i>copZ</i> (cau807/cau808)	-3,5733	1,905	90,5
<i>csaR</i> (cau813/cau814)	-3,6431	1,881	88,1
<i>rpoA</i> (cau827/cau828)	-3,5668	1,907	90,7

A.XII. Schmelzkurven der Oligonukleotidpaare zur *real-time*-Analyse des *cop*-Operons

A



B

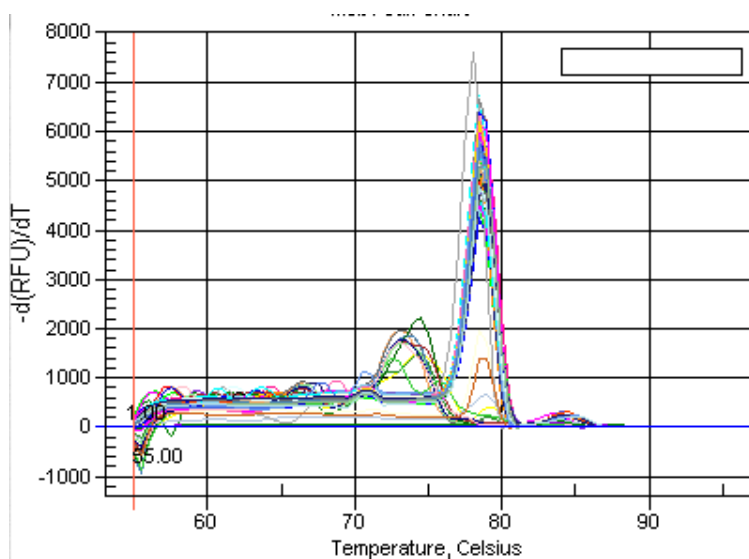


Abb. 39: Schmelzkurven für die Oligonukleotidpaare *copA* (cau803/cau804) und *copZ* (cau807/cau808) (A) und *rpoA* (cau827/cau828) und *csoR* (cau813/cau814) (B).

Dargestellt sind die automatisch von der IQ5-Software erstellten Schmelzkurven durch Auftragungen der negativen Änderung der Fluoreszenz mit der Temperatur ($-d(\text{RFU})/dT$) gegen die Temperatur in Grad Celsius. Lediglich für *csoR* sind zweite Peaks sichtbar, die jedoch vernachlässigbar klein ausfallen, so dass Verunreinigungen ausgeschlossen werden können.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zelle von <i>C. acidurici</i> 9a.	12
Abb. 2: Schematische Darstellung des Glycin-Serin-Pyruvat-Systems im Vergleich zum Glycin-Reduktase-System in <i>C. purinilyticum</i>	13
Abb. 3: Zirkuläre Darstellung des Chromosoms und des Plasmids von <i>C. acidurici</i> 9a.	60
Abb. 4: Taxonomische Beziehung von <i>C. acidurici</i> 9a zu sowohl sequenzierten als auch nicht sequenzierten Typstämmen der <i>Clostridiaceae</i>	62
Abb. 5: 16S-rRNA-Gen-basierte taxonomische Beziehung von <i>C. acidurici</i> 9a zu anderen <i>Clostridiaceae</i>	64
Abb. 6: MLSA-basierte taxonomische Beziehung von <i>C. acidurici</i> 9a zu anderen <i>Clostridiaceae</i>	65
Abb. 7: Verteilung der Gene in <i>C. acidurici</i> 9a auf <i>core</i> -Genom und flexibles Genom.	69
Abb. 8: Visualisierung genomischer DNA aus <i>C. acidurici</i> 9a.	74
Abb. 9: Vergleichende Visualisierung der Größe und Anzahl an Genen verschiedener clostridialer Plasmide.	75
Abb. 10: Semi-quantitative Transkriptionsanalyse von Plasmid-assoziierten Genen.	78
Abb. 11: Abbau von Purinen zu Glycin in purinolytischen Clostridien.	81
Abb. 12: Wichtige metabolische Pfade involviert im Purinabbau von <i>C. acidurici</i> 9a.	83
Abb. 13: Wachstum auf Harnsäure und Glycin mit adaptierten und nicht-adaptierten Zellen.	87
Abb. 14: Transkriptionsanalyse wichtiger Gene des Glycin-Abbaus.	89
Abb. 15: Glykolyse und Glukoneogenese.	91

Abb. 16: Transkriptionsanalyse von Genen der Glykolyse in <i>C. acidurici</i> 9a.....	93
Abb. 17: Der Wood-Ljungdahl-Weg und der Glycin-Weg im Vergleich.....	95
Abb. 18: Organisation und Lokalisierung der Gencluster der Formiat-Dehydrogenasen.....	96
Abb. 19: Wachstum von <i>C. acidurici</i> 9a mit verschiedenen Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen.....	101
Abb. 20: Wachstum von <i>C. acidurici</i> 9a in der Gegenwart von Metallen.....	107
Abb. 21: Organisation des <i>cop</i> -Operons in <i>C. acidurici</i> 9a.....	108
Abb. 22: Semi-quantitative RT-PCR zur Transkriptionsanalyse des <i>cop</i> -Operons von <i>C. acidurici</i> 9a.....	110
Abb. 23: Änderung der Transkriptionsrate R der Gene des <i>cop</i> -Operons.....	112
Abb. 24: Übersichtskarte des Plasmids pKV12.....	113
Abb. 25: Aminosäure-Alignment des Replikationsinitiationsproteins RepB.....	123
Abb. 26: Der Rnf-Komplex in <i>A. woodii</i>	130
Abb. 27: Vergleichende Darstellung der Eisen-Hydrogenasen aus <i>T. maritima</i> (A), <i>A. woodii</i> (B) und <i>C. acidurici</i> 9a (C).....	132
Abb. 28: Organisation des <i>cop</i> -Operons in <i>C. acidurici</i> 9a im Vergleich zu Homologen aus anderen Organismen.....	137
Abb. 29: Verfolgung des Wachstums von <i>C. acidurici</i> 9a mit CuCl ₂ und Zeitpunkte der Probennahme.....	139
Abb. 30: Schematische Darstellung des <i>copAZ-csoR</i> Lokus und seine vorhergesagte Promotor-Region.....	140
Abb. 31: Kandidatengene zur Klonierung von Fruktose-spezifischen Phosphotransferase-Systemen.....	143
Abb. 32: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>dnaA</i>	190
Abb. 33: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>repB</i>	191

Abb. 34: Aminosäurealignment des Proteolipids der Na ⁺ -F ₁ F ₀ -ATPase von <i>C. acidurici</i> 9a mit den Proteolipiden anderer Organismen.	192
Abb. 35: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>rpoA</i>	195
Abb. 36: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>copA</i>	196
Abb. 37: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>copZ</i>	197
Abb. 38: Bestimmung der Steigung zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>csor</i>	198
Abb. 39: Schmelzkurven für die Oligonukleotidpaare <i>copA</i> (cau803/cau804) und <i>copZ</i> (cau807/cau808) (A) und <i>rpoA</i> (cau827/cau828) und <i>csor</i> (cau813/cau814) (B).....	200

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme	15
Tab. 2: Verwendete Plasmide.....	15
Tab. 3: Getestete Kohlenstoff- und Energiequellen	18
Tab. 4: Verwendete Medienzusätze	19
Tab. 5: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.....	30
Tab. 6: Stufensystem zur Beurteilung eines Orthologs mit Hilfe des <i>e-values</i> und der Needleman-Wunsch-Prozentsidentität.....	47
Tab. 7: Übersicht der allgemeinen Eigenschaften des Genoms von <i>C. acidurici</i> 9a im Vergleich zu verschiedenen Vertreter der Clostridiaceae.	58
Tab. 8: Einteilung der chromosomalen Gene von <i>C. acidurici</i> 9a in COG-Kategorien	59
Tab. 9: CRISPR-Regionen und ihre Eigenschaften in <i>C. acidurici</i> 9a.	73
Tab. 10: Anzahl der Plasmidkopien in den verschiedenen Verdünnungsstufen der <i>template</i> -DNA	77
Tab. 11: Antibiotika-Resistenzprotein-kodierende Gene von <i>C. acidurici</i> 9a.	100
Tab. 12: Übersicht der auf dem Chromosom von <i>C. acidurici</i> 9a identifizierten Metall-Resistenzgene.	105
Tab. 13: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.....	172
Tab. 14: Verteilung der vorhergesagten Gene im Genom von <i>C. acidurici</i> 9a und anderer Clostridien auf die verschiedenen COG-Kategorien.....	174
Tab. 15: Organismen und ihre <i>accession</i> -Nummern für die Genomvergleiche und phylogenetischen Analysen.....	175

Tab. 16: Orthologe in anderen <i>Clostridiaceae</i> zu <i>C. acidurici</i> 9a und ihre prozentuale Verteilung unter Berücksichtigung des NW-scores und des <i>e-values</i>	177
Tab. 17: Produkte der Gene des <i>core</i> -Genoms und korrespondierende Locus-tags in <i>C. acidurici</i> 9a.	179
Tab. 18: Auflistung der durch IslandViewer und COLOMBO identifizierten potentiellen Fremdgene.	184
Tab. 19: Verwendete Plasmide des Genus <i>Clostridium</i> zum Vergleich ihrer Größe und der Anzahl ihrer Gene.	188
Tab. 20: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>dnaA</i> (cau825/cau826).	190
Tab. 21: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>repB</i> (cau831/cau832).	191
Tab. 22: Antibiotogramm von <i>C. acidurici</i> 9a.	193
Tab. 23: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>rpoA</i> (cau827/cau828).	195
Tab. 24: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>copA</i> (cau803/cau804).	196
Tab. 25: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>copZ</i> (cau807/cau808).	197
Tab. 26: Grundlegende Werte zur Berechnung der Effizienz des Oligonukleotidpaares für <i>csor</i> (cau813/cau814).	198
Tab. 27: Steigung der Ausgleichsgeraden und Effizienzen der Oligonukleotidpaare für das <i>cop</i> -Operon.	199

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf Daniel für die Ermöglichung dieser Arbeit und seiner stetigen Unterstützung in allen Bereichen. Auch bei Prof. em. Dr. Gottschalk möchte ich mich ganz herzlich bedanken, der trotz seiner Emeritierung nicht müde wurde, als mein Betreuer und Korreferent einer weiteren Generation an Doktoranden mit Rat und Tat und vielen spannenden Anekdoten zur Seite zu stehen.

Mein spezieller Dank geht an Dr. Anja Poehlein, die „Clostridien-Frau“, die mir die faszinierende Welt der Anaerobier näher brachte, immer ein offenes Ohr hatte, bei Problemen immer weiter half, mir gelegentlich auch mal den benötigten Ansporn gab und sich ausgiebig mit der Korrektur meines Papers und der Arbeit befasste. In diesem Sinne möchte ich ebenfalls Dr. Sonja Voget und Dr. Heiko Liesegang danken, die sich mit großer Sorgfalt der Korrektur der Arbeit und des Papers annahmen und mich stets zum Lachen brachten.

Weiterhin gilt mein Dank Stefanie Offschanka und Frauke-Dorothee Meyer, die freundlicherweise die Vorbereitung meines Organismus zur Sequenzierung übernahmen, sowie Dr. Andrea Thürmer für die Assemblierung der Daten. Generell sei besonders den TAs gedankt für ihre Geduld und Hilfe. Danke, ihr seid Schatzis!

Prof. Dr. Peter Dürre und seiner Abteilung in Ulm danke ich für die wundervollen und lehrreichen zwei Wochen, die ich bei ihnen verbringen durfte und das ich sofort in die Familie aufgenommen wurde.

Dem gesamten G2L, neuen wie alten Angehörigen, und „denen von unten“, insbesondere Dr. Christiane Will, möchte ich für das tolle Arbeitsklima und die vielen nicht nur fachlichen Gespräche danken. Sandra Wiegand, John Vollmers, Marvin Djukic, Andreas Leimbach, Robert Hertel und Sascha Dietrich, meine Mitstreiter und Mitleider, sind mir dabei besonders ans Herz gewachsen. Haltet durch!

Zu guter letzt möchte ich mich bei den vier wichtigsten Personen in meinem Leben, meinen Eltern Inge und Berndt, meiner Schwester Laura und meinem Freund Christian bedanken, dass

sie diesen Weg mit mir gegangen sind, an mich geglaubt haben und immer versucht haben zu helfen, wo es nur ging. Besonders Christian verdient meinen Dank, dass er alle meine Launen ohne viel zu klagen über sich hat ergehen lassen.

Lebenslauf

27.02.1982	Geburt in Achim, deutsche Staatsbürgerschaft
08/1988-06/1992	Besuch der Grundschule Blender
08/1992-06/1994	Besuch der Orientierungsstufe Thedinghausen
08/1994-06/2001	Besuch des Domgymnasiums Verden
06/2001	Erlangung der Hochschulreife durch das Abitur
10/2001-09/2006	Studium der Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität in Göttingen
10/2003	Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Chemie und Physik
11/2005	Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Bioinformatik und Humangenetik
09/2006	Abgabe der Diplomarbeit mit dem Thema „Synthetischer Wachstumsdefekt von α -Synuclein-produzierenden <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämmen durch Defekt im t-SNARE-Protein-kodierenden PEP12-Gen“ in der Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik im Institut für Mikrobiologie und Genetik und anschließende Verleihung des Diploms
09/2006-11/2006	Praktikum am College of Life Science in Dundee, Schottland, Abteilung Gene Regulation and Expression
03/2007-10/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am European Neuroscience Institute in Göttingen, Abteilung Molecular Neurogenetics

17.04.2009

Anmeldung der vorliegenden Promotion im Göttinger Genomlabor am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität in Göttingen mit dem Titel „Funktionelle Genomanalyse des Purinverwerters *Clostridium acidurici* 9a“