

Etablierung und Intensivierung von Mikroben-Anoden- Interaktionen in synthetischen und natürlichen exoelektrogenen Stämmen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Katrin Felicitas Richter

aus

Bad Säckingen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2014

Erklärung an Eides statt

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2011 bis Mai 2014 am Institut für Angewandte Biowissenschaften Abteilung Angewandte Biologie der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Gescher durchgeführt.

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde. Die Arbeit wurde bisher in gleicher, ähnlicher Form oder auszugsweise noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht. Die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurde beachtet.

Ort, Datum

Katrin Richter

Danksagung

Lieber Johannes, ich danke dir für deine großartige Unterstützung und das Vertrauen, das du mir für die Promotion, aber auch weit darüber hinaus entgegen gebracht hast. Deine Motivation, deine Ideen und dein Interesse an meiner Arbeit haben das Projekt erst ermöglicht. Danke, dass ich so viel über das Labor, über mich und natürlich auch über die Mikrobiologie lernen durfte.

Liebster Gunnar! Schön, dass wir den Weg der Promotion und darüber hinaus gemeinsam gegangen sind und gehen werden. Danke für deine Hilfe, dein Verständnis und danke dafür, dass es dich (uns) gibt! Ich freu' mich auf die Zukunft!

Ich danke der ganzen AG Gescher. Ihr habt mich immer unterstützt und anerkannt. Ich finde, wir sind ein tolles Team und es macht Spaß mit euch zu arbeiten. Kadda: es ist so schön, dass du da bist, mit mir versuchst, das Chaos zu ordnen und nie den Spaß an der Sache verlierst. Schnubbi: du bist mein liebster, hungrigster und ordentlichster Bench-Nachbar. Fredi: danke, dass du immer alles stehen und liegen lässt und uns allen stets mit Rat und vor allem Tat zur Seite stehst.

Ich danke all meinen Praktikanten, HiWis, Bachelor-, Master-, Lehramts- und Diplomstudenten für ihre Unterstützung und die Beiträge zu dieser Arbeit. Ein spezieller Dank geht an Thea Bursac für ihre Hilfe, gute Laune und die Kekse!

Meinen Kooperationspartnern danke ich dafür, dass sie mich und meine Arbeit weiter gebracht haben und ich neue Dinge und Arbeitsweisen lernen durfte. Danke an Sven Kerzenmacher, Elena Kipf und Sabine Sané vom IMTEK in Freiburg; danke an Prof. Anne Ulrich, Marina Berditsch und Papia Sanyal vom IBG2; danke an Bea Tettmann und Andreas Dötsch vom IFG und danke an Michael Wagner und Prof. Harald Horn vom EBI. Danke an André Dittsche für's Rechnen und Vermitteln von mathematischen Grundlagen.

Meine lieben Löwinnen! Es ist so schön, dass wir uns gefunden haben. Danke für alle seelsorgerischen Laufunden, spontanen Abende im Labor und die moralische Unterstützung.

Meiner Familie bin ich sehr dankbar für den Ausgleich neben der Arbeit und all das Verständnis, Vertrauen und die Unterstützung für meine Arbeit. Danke, dass ihr an mich glaubt!

Liste der Publikationen und Manuskripte

Teile dieser Arbeit wurden oder werden in folgenden Fachzeitschriften oder Büchen veröffentlicht:

1. Richter K, Schicklberger M, Gescher J, 2012. **Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration.** Appl Environ Microbiol.78, 913-21.
2. Richter K, Gescher J, 2012. **The molecular toolbox for chromosomal heterologous multiprotein expression in *Escherichia coli*.** Biochem Soc Transact. 40, 1222-1226.
3. Sturm G, Dolch K, Richter K, Rautenberg M, Gescher J: **Metal reducers and reduction targets. A short survey about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of terminal electron acceptors.** Microbial Metal Respiration, (49-82). ISBN 978-3642328664.
4. Richter K, Gescher J, 2012. **Accelerated glycerol fermentation in *Escherichia coli* using methanogenic formate consumption.** Biores Technol. 162, 389-391
5. Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, C., Louro, R. O., Gescher, J.: **A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime.** Submitted to ISME 2014.
6. Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Kerzenmacher, S., Gescher, J.: **Unbalanced fermentation in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and connection to anodes in microbial fuel cells.** submitted to *Metabol. Engin.* 2014

Die Publikationen bzw. Manuskripte 1, 2, 4, 5 und 6 sind ans Ende der Arbeit angehängt.

Zusätzlich konnten weiterführende Ergebnisse in folgenden Manuskripten veröffentlicht werden:

7. Richter K, Bücking C, Schicklberger M, Gescher J, 2010. **A simple and fast method to analyze the orientation of c-type cytochromes in the outer membrane of Gram-negative bacteria.** J Microbiol Methods. 82, 184-6.
8. Kipf E, Koch J, Geiger B, Erben J, Richter K, Gescher J, Zengerle R, Kerzenmacher S, 2013. **Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis*.** Biores Technol. 146, 386-92.
9. Sané S, Richter K, Rubenwolf S, Matschke NJ, Jolivalt C, Madzak C, Zengerle R, Gescher J, Kerzenmacher S, 2014. **Using planctonic microorganisms to supply the unpurified multi-copper oxidases laccase and copper efflux oxidase at a biofuel cell cathode.** Biores Technol. 158, 231-8

Inhaltsverzeichnis

Danksagung III

Liste der Publikationen und Manuskripte IV

Inhaltsverzeichnis V

Zusammenfassung..... 1

Abkürzungsverzeichnis 3

1 Einleitung 4

 1.1 Mikrobielle Brennstoffzellen 4

 1.1.1 Geschichte und Grundlagen 4

 1.1.2 Formen von MFCs..... 6

 1.1.3 Interaktion zwischen Mikroorganismus und Anode 8

 1.1.4 Aufbau eines MFC-Reaktors 9

 1.1.5 Anwendungen mikrobieller Brennstoffzellen 11

 1.2 Exoelektrogene Mikroorganismen 14

 1.3 Dissimilatorische Eisenreduktion in *S. oneidensis* 16

 1.4 Das Typ-II-Sekretionssystem in Gram-negativen Bakterien 19

 1.4.1 Die Rolle des T2SS bei der extrazellulären Atmung 20

 1.5 Biofilme in mikrobiellen Brennstoffzellen 22

 1.5.1 Persistenz und der Einfluss auf die Bildung von Biofilmen 23

 1.6 Ziele der Arbeit 25

2 Material und Methoden 26

 2.1 Verwendete Mikroorganismen und Chemikalien 26

 2.1.1 Bakterienstämme 26

 2.1.2 Chemikalien 26

 2.2 Bakterienzüchtung und Stammkulturhaltung 26

 2.3 Molekularbiologische Methoden 32

 2.3.1 PCR..... 32

 2.3.2 Reinigung und Isolation von DNA..... 38

 2.3.3 Reinigung und Isolation von RNA 38

 2.3.5 Klonierungsmethoden 41

 2.3.6 Verwendete Plasmide 45

 2.3.7 Transformationstechniken 47

2.3.8 DNA-Sequenzierung	48
2.4 Elektrophoretische Methoden	48
2.5 Protein-biochemische Methoden.....	51
2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	51
2.5.2 Präparation der Membranfraktion.....	52
2.5.3 Periplasma-Präparation.....	52
2.5.4 Färbung der Hämgruppen	52
2.5.5 Sekretion und Konzentration von Proteinen.....	53
2.5.6 in vitro Membran-Assay	53
2.6 Analytik.....	54
2.6.1 Chromatographische Methoden	54
2.6.2 Enzymatische Analysemethoden	57
2.6.3 Optische Analyse-Methoden	60
2.6.4 in vivo Methoden mit ganzen Zellen	62
2.7 Elektrochemische Methoden	62
2.7.1 Zyklische Voltametrie	63
2.7.2 Mikrobielle Brennstoffzellen (MFC)	63
2.8 Wachstumskurven mit Eisencitrat und Bestimmung des Fe(II)-Gehalts.....	65
3 Ergebnisse.....	66
Teil 1 A: Funktionelle Verlängerung/Verbreiterung der Elektronentransportkette ins Periplasma von <i>E. coli</i>	66
3.1. Periplasmatische c-Typ Cytochrome in <i>Shewanella oneidensis</i> unter Eisen-reduzierenden Bedingungen.....	66
3.2 Etablierung einer Testmethode zum Vergleich des periplasmatischen Elektronentransfers in <i>E. coli</i>	67
3.3 Klonierung der periplasmatischen Cytochrome.....	69
3.4 CymA-abhängige in vivo und in vitro Reduktion von STC in <i>E. coli</i>	72
3.5 Genomintegration von STC	74
3.6 Elektrochemische Experimente.....	75
3.7 Exkurs: Fermentative Glycerin-Oxidation in <i>E. coli</i>	78
3.8 Analyse des Endprodukt-Spektrums der Anoden-unterstützten Glycerin-Oxidation	81
Teil 1 B: Untersuchungen zum Elektronentransfer über die äußere Membran	85
3.9 Deletion von <i>gspBA</i> in <i>S. oneidensis</i>	85
3.10 Transfer des T2SS aus <i>S. oneidensis</i> in <i>E. coli</i>	86
3.11 Funktionaler Test des heterologen T2SS.....	88

3.12 Transkriptionskontrolle der Gene des T2SS in <i>E. coli</i>	89
Teil 2: Intensivierung der Mikroben-Anoden-Interaktion natürlich-exoelektrogene Stämme	91
3.13 Analyse der Biofilmbildung.....	91
3.14 Mikrobielle Brennstoffzellen mit und ohne TisB.....	93
3.15 Transkriptom-Analyse unter Biofilm-induzierenden Bedingungen.....	94
4 Diskussion	97
Teil 1 A: Etablierung der Mikroben-Anoden-Interaktion in einem synthetischen exoelektrogenen Stamm	97
4.1 Inventur des Periplasmas von <i>S. oneidensis</i>	97
4.2 Entwicklung eines Assays zur Charakterisierung der periplasmatischen Cytochrome und Etablierung eines neuen <i>E. coli</i> -Stammes	99
4.3 Reduktion von STC in Abhängigkeit von CymA	100
4.4 Elektrochemische Charakterisierung von <i>E. coli</i> JG622.....	101
4.5 Verbesserte fermentative Glycerin-Oxidation in <i>E. coli</i> durch Co-Kultivierung von <i>M. formicicum</i>	103
4.6 Methylenblau-basierte und Anoden-unterstützten Glycerin-Respiration in JG622	104
4.7 Generelle Betrachtungen zu <i>E. coli</i> als Strom-produzierendem Organismus in MFCs	106
Teil 1 B: Untersuchungen zum Elektronentransfer über die äußere Membran	107
4.8 Der Einfluss von <i>gspBA</i> auf die Eisenreduktion in <i>S. oneidensis</i>	107
4.9 Funktionalität des T2SS aus <i>S. oneidensis</i> in <i>E. coli</i>	108
Teil 2: Intensivierung der Mikroben-Anoden-Interaktion natürlich-exoelektrogener Stämme	108
4.11 Ausblick.....	111
5 Literaturverzeichnis	113
Anhang	125
Transkriptomdaten.....	125

Zusammenfassung

Exoelektrogene Mikroorganismen sind in der Lage, Elektronen auf Akzeptoren zu transferieren, die sich außerhalb der Zelle befinden. Eine Lebensweise, bei der ein solcher extrazellulärer Elektronentransfermechanismus entscheidend ist, stellt die dissimilatorische Eisenreduktion dar. Diese ist ein anaerober, respiratorischer Prozess in Mikroorganismen, bei dem Eisen(III) als terminaler Elektronenakzeptor der Atmungskette genutzt und zu Eisen(II) reduziert wird. Da viele Eisenverbindungen bei neutralem pH-Wert unlöslich sind, haben Mikroorganismen unterschiedliche Strategien etabliert, den periplasmatischen Raum und die äußere Membran zu überbrücken und einen Elektronentransfer auf den extrazellulären Akzeptor zu ermöglichen. Darüber hinaus sind solche exoelektrogene Organismen zumeist in der Lage, statt Eisenmineralen auch Anoden als extrazellulären Elektronenakzeptor zu nutzen und können daher in mikrobiellen Brennstoffzellen (*microbial fuel cells*; MFCs) zur Anwendung kommen.

Das γ -Proteobakterium *Shewanella oneidensis* ist einer der Modellorganismen zum Studium der dissimilatorischen Eisenreduktion. *S. oneidensis* besitzt eine verlängerte Elektronentransportkette bestehend aus *c*-Typ-Cytochromen und ist dadurch in der Lage, Eisen- und Manganminerale sowie eine Anode zu reduzieren. Das Genom des Organismus trägt die genetische Information für 41 *c*-Typ-Cytochrome, welche redundante Aktivitäten zeigen und deren Expression kaum reguliert ist, weshalb die Identifikation von Komponenten der Atmungskette eine große Herausforderung darstellt. Ein Ansatz zum besseren Verständnis der dissimilatorischen Eisenreduktion ist die Nachbildung der putativen Elektronentransportkette aus *S. oneidensis* in *Escherichia coli*. *E. coli* kann per se kein Eisen reduzieren, besitzt nur 7 endogene *c*-Typ Cytochrome und ist somit gut zur Charakterisierung einzelner heterologer Cytochrome oder Enzym-Kombinationen aus *S. oneidensis* geeignet. Ergänzend dazu könnte ein neuer, synthetisch-exoelektrogener *E. coli*-Stamm auf Grund seiner metabolischen Diversität für vielfältige Anwendungen in einer MFC genutzt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Anoden-Interaktion von *E. coli* so wie die Intensivierung des Kontaktes zwischen *S. oneidensis* und einer Elektrode zur Steigerung der Leistung in einer MFC.

Hierzu wurde zunächst mit Hilfe eines massenspektrometrischen Ansatzes die Expression von 12 *c*-Typ Cytochromen ermittelt, welche unter Eisen-reduzierenden Bedingungen im Periplasma von *S. oneidensis* hochreguliert sind. Aufbauend auf einem *E. coli*-Stamm, welcher bereits die Cytochrome CymA und MtrA aus *S. oneidensis* heterolog exprimiert, wurde der Einfluss einer zusätzlichen Expression der detektierten Cytochrome untersucht. Dazu wurde ein neuer Assay entwickelt um die Kinetik des periplasmatischen Elektronentransfers vergleichen zu können. Der Assay basiert auf der Reduktion des membrangängigen Redoxmediators Methylenblau, welcher im Periplasma durch die

Cytochrome reduziert werden kann. Die zusätzliche Expression des kleinen Tetrahäm-Cytochroms STC resultierte in der mit Abstand höchsten Methylenblau-Reduktionsrate und die Reduktionsrate des Wildtyps konnte um 183% gesteigert werden. Daraufhin wurde der Transfer respiratorischer Elektronen von CymA auf STC charakterisiert und ein neuer Stamm entwickelt, welcher ein Cytochrom-Modul aus CymA, MtrA und STC genomisch exprimiert. Dieser Stamm wurde bezüglich seiner metabolischen und elektrochemischen Aktivität in MFCs charakterisiert, das Endprodukt-Spektrum der Glycerin-Oxidation in Co-Kultur mit dem methanogenen Archaeum *Methanobacterium formicicum* untersucht und die vollständige Umsetzung von Glycerin zu Ethanol, Acetat und Methan ermittelt. Es wurde eine Anoden- und Methylenblau-unterstützte respiratorische Glycerin-Oxidation erreicht und eine Leistung der MFC von $196,3 \pm 0,18 \text{ mW/m}^2$ erzielt.

Um eine Mediator-freie Interaktion von *E. coli* mit einer Anode zu ermöglichen, wurde das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS) aus *S. oneidensis* in das Genom von *E. coli* integriert. Das T2SS ist entscheidend für eine korrekte Orientierung der terminalen Reduktasen in der äußeren Membran und somit essentiell für den direkten exoelektrogenen Elektronentransfer. Eine Funktionalität des heterologen T2SS konnte in *E. coli* nicht erreicht werden, da nicht alle Gene transkribiert wurden. Die Gründe hierfür liegen möglicherweise in einer noch unbekanntenen Regulation der Transkription des T2SS.

Die Interaktion von *S. oneidensis* mit einer Anode wurde durch Zugabe des Biofilm-induzierenden Peptids TisB intensiviert. Mit Hilfe optischer Methoden wurde der Einfluss unterschiedlicher TisB-Konzentrationen auf die Aggregat-Bildung von *S. oneidensis* analysiert und anschließend der Effekt des Peptids auf die Stromproduktion in einer MFC untersucht. Unter Zugabe von TisB konnte eine Steigerung der Leistung um den Faktor 2,2 erreicht werden. Die Analyse des Transkriptom ergab eine TisB-abhängige Regulierung zahlreicher Gene, die bei der Biofilm-Bildung eine Rolle spielen.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
MFC	mikrobielle Brennstoffzelle
<i>M. formicicum</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>
NHE	Normal-Wasserstoff-Elektrode
NTA	Nitrilotrinatriummessigsäure
OCT	Optische Kohärenz-Tomographie
OD	Optische Dichte
pmf	elektrochemischer Protonengradient
RT	Raumtemperatur
<i>S. oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
T2SS	Typ-II-Sekretionssystem
Δ	Deletion

1 Einleitung

1.1 Mikrobielle Brennstoffzellen

1.1.1 Geschichte und Grundlagen

Die Beobachtung, dass Mikroorganismen Elektrizität erzeugen geht zurück in die Anfänge des letzten Jahrhunderts. M. C. Potter, ein Botanik-Professor aus England berichtete 1911 von einer „elektronenmotorischen Kraft“, welche von *E. coli* und *S. cerevisiae* Kulturen ausging, wenn sie auf einer Platin-Elektrode wuchsen (Potter, 1911). 20 Jahre später konnte B. Cohen diese Beobachtungen ausweiten und zeigen, dass *Bacillus subtilis* und *Proteus vulgaris* in einer mikrobiellen Halbzelle Strom erzeugen konnten. Durch die Serienschaltung mehrerer mikrobieller Brennstoffzellen (*microbial fuel cell*; MFC) schaffte es Cohen, eine Spannung von 35 V zu erzeugen. Die Stromstärke betrug aber nur 2 mA (Cohen, 1931). Die Erkenntnisse von Potter und Cohen gerieten aufgrund mangelnder Anwendungsmöglichkeiten in Vergessenheit und erst mit dem Beginn des 21. Jahrhunderts und dem aufkommenden Bewusstsein für die Endlichkeit der Energie- und Rohstoffvorkommen rückte das System der mikrobiellen Brennstoffzelle zurück ins Interesse der Forschung. Seither ist die Zahl der Publikationen auf diesem Gebiet rasant angestiegen (Abbildung 1). Dieser Anstieg ist zum einen zurückzuführen auf die Notwendigkeit, umweltfreundliche und regenerative Energiequellen erschließen zu müssen; ein weiterer Grund findet sich in der Entdeckung des ersten exoelektrogenen Organismus *Shewanella putrefaciens* (später *oneidensis*) und somit des extrazellulären Elektronentransfers und der darauf aufbauenden Entwicklung der ersten mediatorlosen MFC durch Kim et al. (Kim et al., 2002).

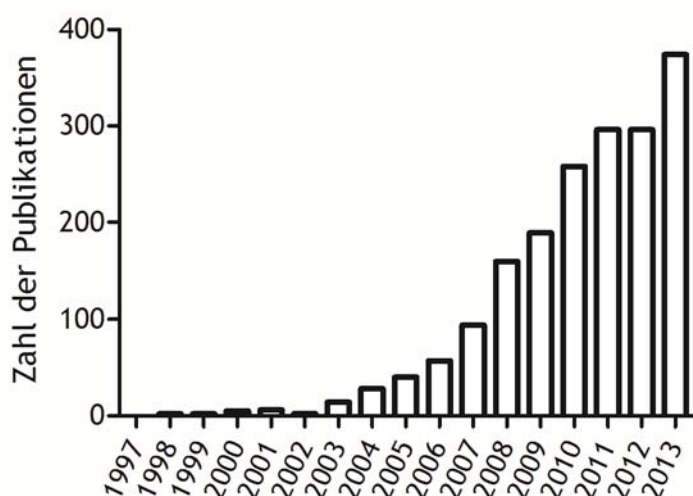


Abb. 1: Zahl der Publikationen zu mikrobiellen Brennstoffzellen von 1997 bis 2013. Ausgewertet wurde die Zahl der Treffer zu dem Suchbegriff „microbial fuel cell“ bei der online-Datenbank „ISI – Web of Science“ am 22. 05. 2014.

Eine Brennstoffzelle ist ein galvanisches Element, in welchem chemische in elektrische Energie umgewandelt wird. In einer MFC dienen Mikroorganismen als Katalysatoren und oxidieren organische Substrate zu CO_2 , Protonen und Elektronen. Der oxidative und der reduktive Prozess finden in zwei getrennten Kompartimenten statt, welche über eine Protonen-permeable Membran miteinander verbunden sind. In der Anodenkammer wird der Kohlenstoff oxidiert und die entstehenden Elektronen auf die Anode übertragen. Diese fließen über eine externe Last (Widerstand) zur Kathode, in welcher normalerweise Sauerstoff als Akzeptor dient und reduziert wird. Die treibende Kraft für den Elektronenfluss ist dabei der Potentialunterschied zwischen Oxidation und Reduktion (Logan et al., 2006; Abbildung 2).

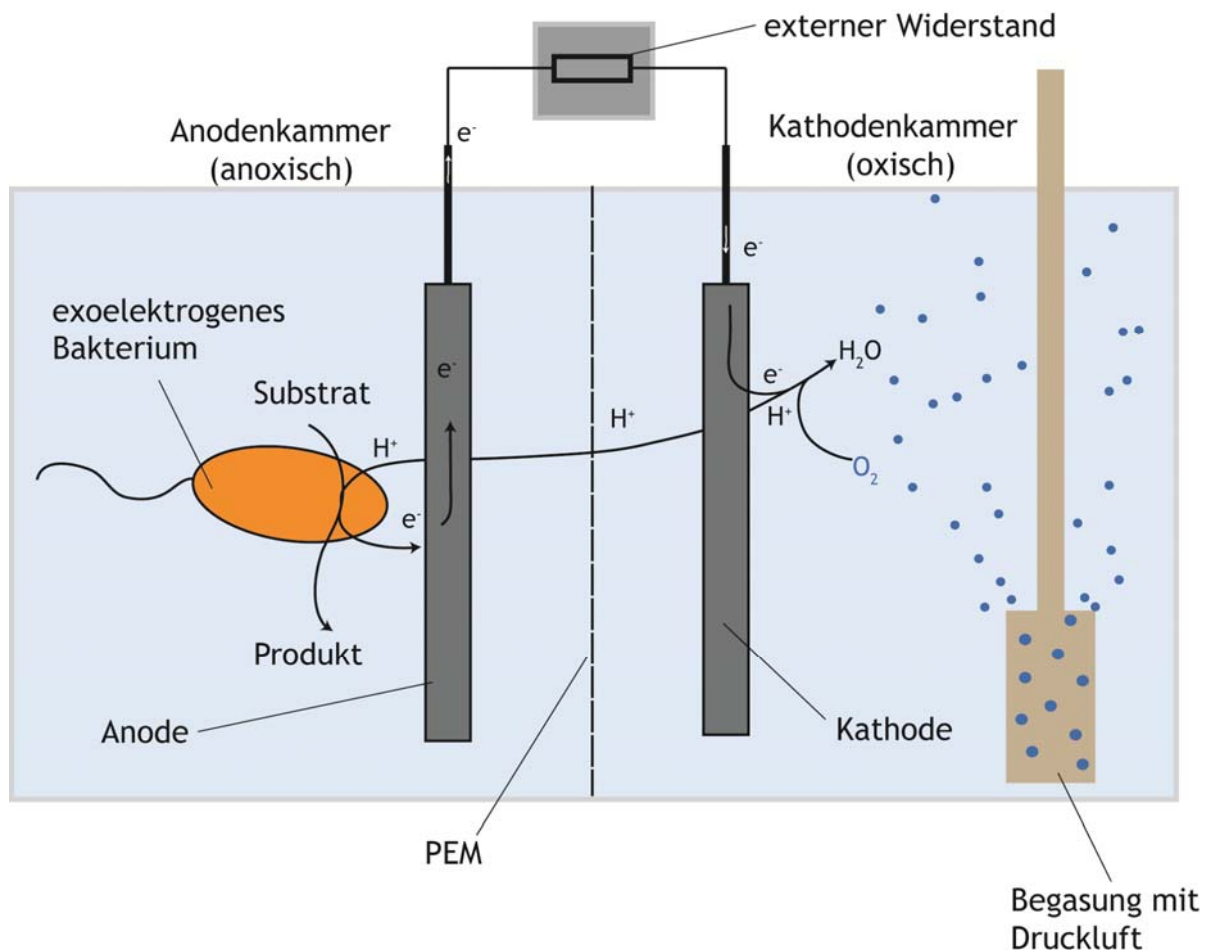


Abb. 2: **Schematische Darstellung einer mikrobiellen Brennstoffzelle.** Im Anodenkompartiment herrschen anoxische Bedingungen; die Kathodenseite wird mit Druckluft begast und dadurch Sauerstoff im Medium angereichert. In der Anodenkammer befinden sich Mikroorganismen, welche ein Substrat zu einem oder mehreren Produkten oxidieren und die dabei entstehenden Elektronen auf die Anode als terminalen Akzeptor übertragen. Die Elektronen wandern auf Grund eines Potentialunterschiedes zwischen Anode und Kathode über einen externen Widerstand in die Kathodenkammer, wo sie auf Sauerstoff übertragen werden und Wasser entsteht. Protonen können aus dem Anodenkompartiment über eine Protonen-Austausch-Membran (*proton exchange membrane*, PEM) zur Kathode wandern.

In mikrobiellen Brennstoffzellen nutzen Mikroorganismen Anoden als Elektronenakzeptor. Aufgrund seiner inerten Struktur kann dieser Akzeptor theoretisch nicht verbraucht werden und es sammeln sich keine (möglicherweise inhibierend wirkenden oder toxischen) Reduktionsendprodukte an. Dies ist aus biotechnologischer Sicht ein vielversprechender Aspekt; jedoch stellt ein unlöslicher und somit nicht-membrangängiger Elektronenakzeptor eine große Herausforderung an den Organismus dar, der diesen Akzeptor reduziert. Zwar kommen in der Natur keine Elektroden und Anoden-reduzierende Mikroorganismen vor, jedoch existieren überall unlösliche Elektronenakzeptoren in Form von Eisen-oder Manganoxiden, welche bakteriell reduziert werden können und viele Arbeiten haben gezeigt, dass metall-reduzierende Organismen meist auch in der Lage sind, Elektronen auf eine Anode zu übertragen (Logan and Regan, 2006a, Logan and Regan, 2006b, Rabaey et al., 2007, Logan, 2009, Richter et al., 2012).

1.1.2 Formen von MFCs

Im Wesentlichen können drei Arten von MFCs unterschieden werden. In einer indirekten MFC produzieren Mikroorganismen elektrochemisch aktive Substanzen durch Fermentation von komplexen Substraten. Zum Zweck der Energiegewinnung werden diese Reaktionsprodukte dann in einem getrennten Kompartiment an einer Anode oxidiert; der mikrobielle Bioreaktor bleibt also räumlich von der Brennstoffzelle getrennt und es findet kein direkter Elektronentransfer auf die Elektrode statt. Schon 1977 koppelten Karube et al. in einer indirekten MFC die Fermentation von Glukose zu Wasserstoff durch *Clostridium butyricum* mit einer anschließenden Oxidation des entstandenen Wasserstoffs an einer Platinanode. Mit diesem Aufbau wurde während 15 Tagen 15 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ Strom produziert (Karube et al., 1977). Ebenso kann die Fermentation von Glukose auch direkt im Anodenkompartiment stattfinden. Hierbei besteht jedoch das Problem der Entstehung weiterer Fermentationsprodukte neben Wasserstoff, welche sich durch Anlagerung an die Anode negativ auf die Leistung der Brennstoffzelle auswirken können. Durch die alternative Verwendung von Wolfram-Carbid-Elektroden statt der klassischen Platin-Elektroden kann erreicht werden, dass neben Wasserstoff auch Formiat an der Anode umgesetzt werden kann. Somit kann die Energiegewinnung durch Oxidation zusätzlicher Fermentationsprodukte gesteigert werden (Rosenbaum et al., 2006). Ein genereller Nachteil der indirekten MFCs bleibt jedoch, dass im Regelfall Elektroden aus teuren Materialien als Katalysatoren eingesetzt werden müssen, um den bakteriell produzierten Wasserstoff oxidieren zu können.

In der zweiten Form der Mediator-basierten MFC vermitteln Redox-Mediatoren den Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen und Elektrode. Diese Elektronenüberträger („Shuttle“) sind typischerweise kleine Redox-aktive Moleküle wie Thionin, Viologen oder Methylenblau. Sie ermöglichen den Elektronentransfer auf Elektroden durch Mikroorganismen, die per se dazu nicht in der Lage sind, mit einer Anode zu interagieren (Park and Zeikus, 1999). Dabei werden die Shuttle von den Mikroorganismen intrazellulär reduziert, wandern zur Anode, wo sie wieder re-oxidiert werden und pendeln zurück zu den Mikroorganismen. Für einen Einsatz als Elektronenshuttle muss der Redox-Mediator Membran-permeabel und nicht-toxisch sein, ein Redoxpotential besitzen, welches über dem der reduktiven Metabolite liegt und sich leicht an der Anode re-oxidieren lassen. Über die Wahl des Mediators lässt sich demzufolge die Leistung einer MFC stark beeinflussen. Vergleicht man Neutral-Rot und Thionin, so kann die Stromproduktion von *E. coli* in einer MFC durch Neutral-Rot um den Faktor 8,8 gesteigert werden (verglichen mit Thionin) (Park and Zeikus, 2000). Ein Vorteil der Mediator-vermittelten Anodenoxidation ist die virtuelle Vergrößerung der Anodenfläche; Nachteile sind der zusätzliche Kostenfaktor durch den Einsatz von Mediatoren und deren mangelnde Stabilität in Langzeitexperimenten oder Durchflusssystemen.

Die dritte und am häufigsten eingesetzte Form der MFC ist die Mediator-freie MFC. Hier übertragen exoelektrogene Mikroorganismen über Oberflächen-lokalisierte terminale Reduktasen Elektronen auf die Anode. Die erste Mediator-freie MFC wurde 2002 von Kim et al. veröffentlicht (Kim et al., 2002). Hier diente *Shewanella oneidensis* als katalysierendes Bakterium. Seither haben zahlreiche weitere exoelektrogene Organismen Anwendung in MFCs gefunden. Dazu gehören unter Anderem Arten wie *Aeromonas hydrophila*, *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodospirillum rubrum* oder *Clostridium butyricum* (Chang et al., 2006; siehe auch Teil 1.2 (Exoelektrogene Mikroorganismen)). Die unterschiedlichen Formen der Interaktionen zwischen Organismus und Anode werden im folgenden Kapitel beschrieben.

Ein wichtiger Faktor für die Effizienz und Leistungsfähigkeit von MFCs ist neben den Mikroorganismen die Wahl des Elektrodenmaterials. Anodenmaterialien müssen eine gute elektrische Leitfähigkeit aufweisen, sie müssen biokompatibel und chemisch inert sein und einen effizienten Elektronenaustausch gewährleisten. In frühen Arbeiten mit indirekten oder Mediator-basierten MFCs wurde häufig Platin verwendet, da es eine gute Leitfähigkeit und elektrische Aktivität gegenüber der Oxidation von Metaboliten wie Wasserstoff besitzt. Heute werden meist Kohlenstoff-basierte Materialien wie Graphit-Vlies oder Kohlenstoff-Granulate genutzt (Wei et al., 2011). Die Hauptvorteile von Kohlenstoff-basierten Elektroden-Materialien liegen in einem deutlich niedrigeren Preis und der Eigenschaft des Materials, sich zu verschiedenen Strukturen und Formen verarbeiten zu lassen, wodurch große, dreidimensionale Oberflächen geschaffen werden können, an welche sich die

Bakterien anlagern können. Dies führt zu einem sehr guten Preis/Effizienz-Verhältnis von Kohlenstoff-Materialien gegenüber Platin-Elektroden. Neu und vielversprechend sind textile Carbon-Fasern oder dreidimensional gewebte Materialien mit extrem großer Oberfläche (Chen et al., 2011, Xie et al., 2011).

1.1.3 Interaktion zwischen Mikroorganismus und Anode

In Mediator-freien MFCs können Mikroorganismen Elektronen auf verschiedene Arten auf die Anode übertragen (Abbildung 3). Ein Mechanismus schließt jedoch nicht das gleichzeitige Vorkommen eines anderen im selben Stamm aus.

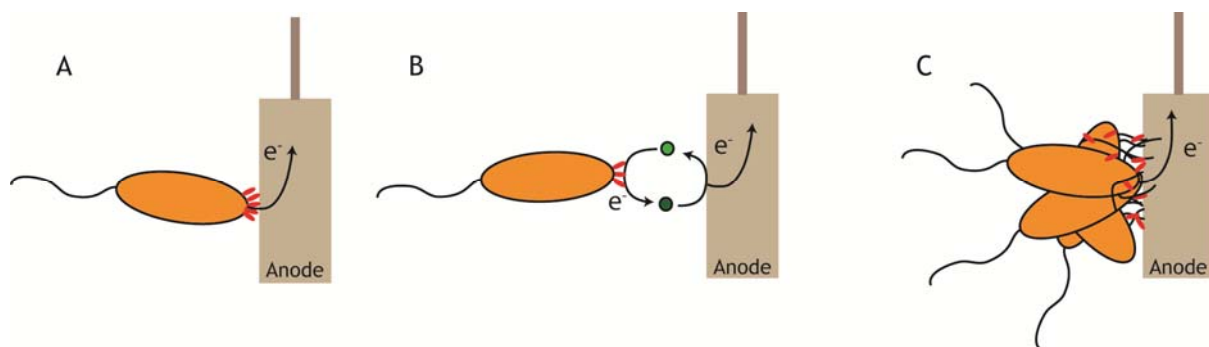


Abb. 3: **Mechanismen des Elektronentransfers in exoelektrogenen Mikroorganismen auf eine Anode.** Dargestellt sind drei unterschiedliche Strategien, Elektronen auf eine Anode zu übertragen. Diese ist als braunes Rechteck und ein Bakterium als oranges Oval skizziert. **A** Direkte Übertragung der Elektronen auf den Akzeptor über Cytochrome (rote Ovale) auf der Zelloberfläche. **B** Elektronen werden von den Cytochromen auf eine lösliche Shuttle-Komponente transferiert (reduzierte Form; dunkelgrün). Von dort auf die Anode übertragen und das Shuttle liegt wieder in der oxidierten Form vor (hellgrün). Das Shuttle kann sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein. **C** Konduktive Pili und lösliche Cytochrome durchziehen einen Biofilm aus mehreren Zellschichten mit einem leitfähigen Netzwerk bis zur Anodenoberfläche.

Beim direkten Kontakt der Zelle mit dem Anodenmaterial fließen die Elektronen zumeist über Cytochrome als terminale Reduktasen auf der Zelloberfläche auf den Akzeptor (Abbildung 3A). In den Cytochrom-Proteinen dienen Häm-Cofaktoren als Elektronen-übertragende katalytische Zentren. Der direkte Transfer erfordert einen Abstand von weniger als 15 Å zwischen der Hämgruppe des Cytochroms und dem unlöslichen Akzeptor (Kerisit et al., 2007). Für MtrF, ein Cytochrom auf der Zelloberfläche von *S. oneidensis* wurde der direkte Kontakt von zwei endständigen Hämgruppen des Cytochroms mit einer Eisenmineral-Oberfläche nachgewiesen. Beide Hämgruppen besitzen jeweils eine Fläche von 250 bzw. 300 Å², die über die äußere Membran hinaus ragt, wodurch ein Kontakt mit einer festen Oberfläche möglich ist (Clarke et al., 2011).

Eine andere Möglichkeit der Interaktion von Mikroorganismen mit einer Anode oder Metalloberfläche ist der „Umweg“ über „Shuttle“-Moleküle (Abbildung 3B). Shuttle sind lösliche, Redox-aktive Moleküle, welche an der Zelloberfläche reduziert werden und in die Umgebung diffundieren, wo sie extrazelluläre Substrate reduzieren. Die Mediatoren können dabei viele Zyklen von Reduktion und Oxidation durchlaufen. Vorteil einer Shuttle-basierten Form der Interaktion mit unlöslichen Akzeptoren ist es, auch weiter entfernte Substrate reduzieren zu können, zu denen die Zelle keinen direkten Kontakt hat (Gralnick and Newman, 2007, Marsili et al., 2008, Velasquez-Orta et al., 2010). Innerhalb der Mediator-vermittelten Interaktion mit einer Anode kann zwischen der Sekretion von endogenen, zelleigenen Mediatoren wie Riboflavin oder FMN oder dem Elektronentransfer über exogene Shuttle wie Huminstoffe unterschieden werden. Exogene Shuttle sind in der Umgebung des Bakteriums vorhanden und es muss somit keine oder kaum Energie investieren, um darüber Elektronen transferieren zu können. Der energetische Aufwand der Produktion eines endogenen Shuttles scheint in einigen Fällen durch den Nutzen einer schnellen und effizienten Reduktion des Akzeptors aufgewogen zu werden (Brutinel and Gralnick, 2012). Neben reinen Redox-Mediatoren werden auch Metall-Chelatoren sekretiert, welche schwer lösliche Metalle solubilisieren können. Hierbei kann der chelatierte und nun gelöste Akzeptor zur Zelloberfläche hin diffundieren und dort reduziert werden (Kouzuma et al., 2012).

Konduktive Biofilme und Pili sind eine dritte Möglichkeit des Elektronentransports auf eine Anode (Abbildung 3C) und werden in Teil 1.5 (Biofilme in mikrobiellen Brennstoffzellen) genauer erläutert.

1.1.4 Aufbau eines MFC-Reaktors

Beim Design von mikrobiellen Brennstoffzellen gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten für den Aufbau der Reaktoren. Hier soll nur auf zwei Systeme eingegangen werden, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

Beim 3-Kammer-Aufbau sind die Arbeitselektrode (Anode) und die Gegenelektrode (Kathode) zwei gleich große, getrennte Kompartimente, welche über eine Ionenbrücke, z. B. eine semi-permeable Membran verbunden sind. In einer dritten (meist kleineren) Kammer befindet sich eine Referenzelektrode, über welche die elektrochemischen Bedingungen in der MFC definiert werden können (Abbildung 4). Diese Art von 3-Kammer-MFC-Aufbau ist relativ einfach zu konstruieren und handhaben, jedoch liegen Arbeits- und Gegenelektrode weit auseinander, was zu hohen Widerständen auf Grund von ohmschen Verlusten führen kann. Der Widerstand kann dadurch verringert werden, dass die Elektroden in enge räumliche Nähe gebracht werden. Eine Halbierung des Abstandes zwischen Anode und Kathode von 4 auf 2 cm führt beinahe zu einer Verdopplung der

Leistung von 720 auf 1210 mW/m² (Liu et al., 2005). Ein verringerter Abstand zwischen beiden Elektroden lässt sich in der Praxis gut durch flach aufeinander liegende, Kassetten-förmige Aufbauten umsetzen (Min and Logan, 2004). Generell ist das System der 3-Kammer-MFC gut geeignet, um individuelle Elektrodenreaktionen zu betrachten und die elektrochemische Leistung bei verschiedenen Bedingungen oder zwischen unterschiedlichen Stämmen vergleichen zu können (Logan et al., 2006).

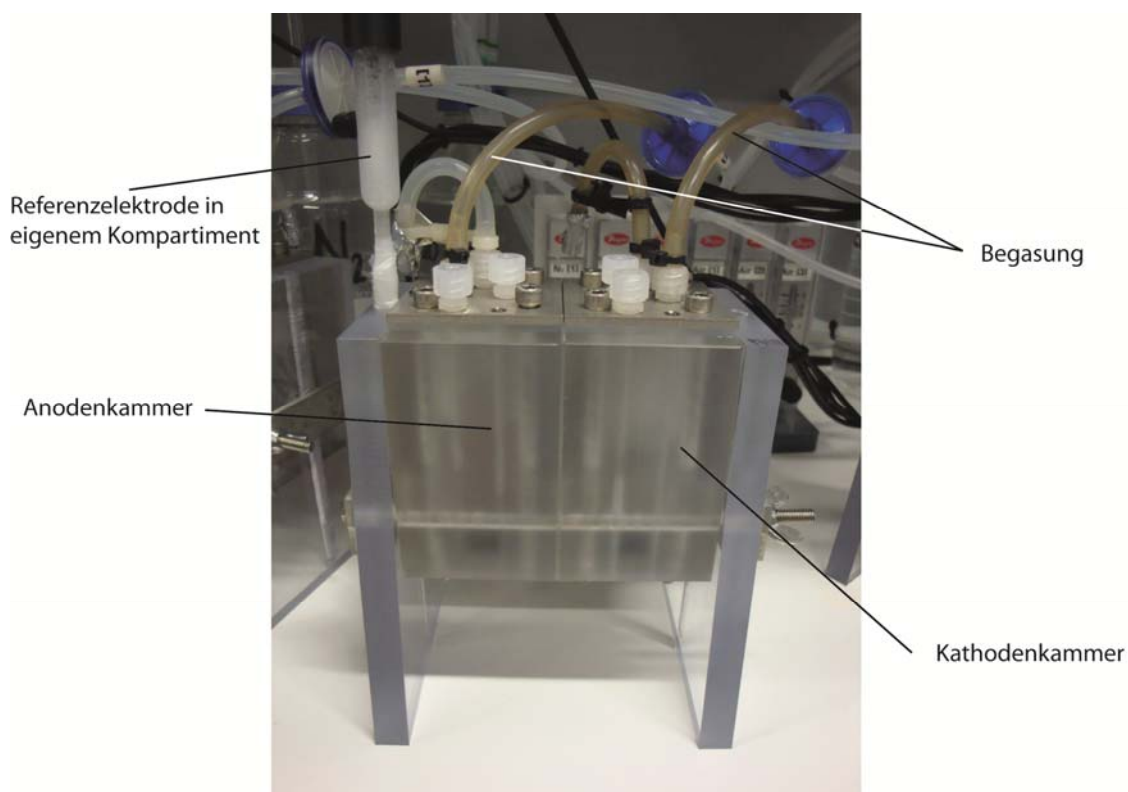


Abb: 4: Bild eines 3-Kammer-Reaktors. In der Anodenkammer (links) befinden sich Medium mit Elektronendonator und Bakterien; um anoxische Bedingungen zu erreichen wird hier mit N₂ begast. In der Kathodenkammer wird Medium ohne Elektronendonator mit Druckluft begast. Protonen können zwischen den Kammern über eine Protonen-Austausch-Membran (nicht zu sehen) diffundieren. Die Referenzelektrode befindet sich in einer separaten Kammer, welche ebenfalls durch eine Protonen-Austausch-Membran vom Anodenkompartiment separiert ist.

Eine zweite Möglichkeit, eine MFC zu betreiben ist der in dieser Arbeit ebenfalls verwendete 1-Kammer-Aufbau (Abbildung 5). Bei dieser Art von Reaktor ist die Gegenelektrode meist kleiner als die Arbeitselektrode und befindet sich innerhalb der Anodenkammer. Um direkten Kontakt zwischen den Zellen und der Kathode zu verhindern liegt sie zumeist in einem abgeschlossenen Gefäß, z. B. einer Glasfritte, welches nur den Transfer von kleinen Molekülen und insbesondere Protonen erlaubt. Da die Kathode im 1-Kammer-Aufbau deutlich kleiner ist als die Anode, besteht sie meist aus einem anderen, reaktiveren Material, um Leistungsunterschiede durch den Größenunterschied

auszugleichen. Ebenso wie in 3-Kammer-Systemen führt ein großer Abstand zwischen Anode und Kathode zu Ohmschen Verlusten.

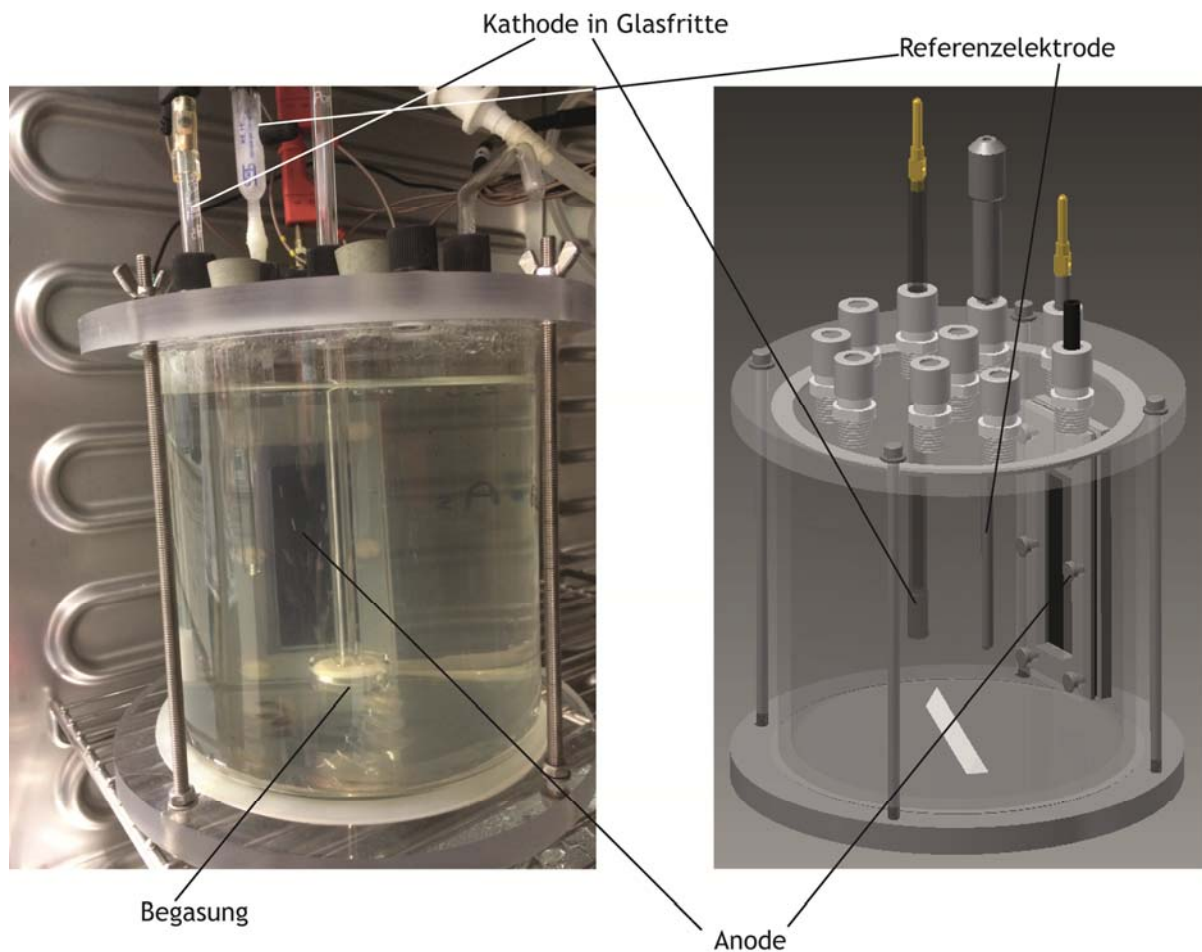


Abb. 5: Foto und AutoCAD-Zeichnung eines 1-Kammer-Reaktors. Im Reaktor befindet sich Medium mit Elektronendonator, welches mit Bakterien beimpft werden kann und eine Anode aus Graphit-Vlies. Die Kathode besteht aus einer Platinnetz und liegt innerhalb einer Glasfritte im Anodenkompartiment. Eine Referenzelektrode, ein Gasanschluss und Module zur Probenentnahme können flexibel über Gewinde im Deckel angeschlossen werden.

1.1.5 Anwendungen mikrobieller Brennstoffzellen

Neben der reinen Gewinnung von elektrischer Energie eignen sich MFCs auch für weiterführende Anwendungen. Drei sollen hier genauer vorgestellt werden.

Abwasserreinigung mit MFCs

MFCs können zur Abwasserreinigung eingesetzt werden. Kommunales Abwasser enthält eine Vielzahl von abbaubaren Kohlenstoffen, welche von Mikroorganismen in elektrische Energie umgewandelt werden können. Da dieser Abbau unter anoxische Bedingungen stattfindet, kann als Kostenersparnis auf die aufwändige Belüftung der Klärbecken verzichtet werden (Du et al., 2007). Auch Abwasser aus

Lebensmittel-verarbeitenden Industrien und der Landwirtschaft sind reich an organischem Kohlenstoff und können in MFCs genutzt werden (Liu et al., 2004, Min et al., 2005, Oh and Logan, 2005). Meistens kommen dabei auf der Anode Mischkulturen zum Einsatz wie sie im Abwasser natürlicherweise vorkommen. Die Zusammensetzung der Kulturen ist dabei abhängig von der Art des eingesetzten Abwassers. Kiely et al. zeigten, dass in MFCs, die mit Abwasser einer Kartoffel-verarbeitenden Industrie betrieben wurden, die Familie der *Geobacteraceae* dominierten (37% der Gemeinschaft), wohingegen in Abwasser aus Kuhdung weniger *Geobacater*-Arten (7%) und mehr *Clostridien* und *Thauera* (je 17%) auf der Anode vorhanden waren (Kiely et al., 2011). Vorteile von gemischten Biofilmen aus dem Abwasser sind, dass die Mikroorganismen an die Bedingungen im Wasser adaptiert sind und somit mit Umgebungstemperatur und den gegebenen Salzkonzentrationen und pH-Werten optimal zu Recht kommen. Ein Nachteil ist, dass auch Nicht-exoelektrogene Stämme die Anoden besiedeln und so die Leistung der MFCs verringern.

MFCs als Biosensor

Eine andere Art der Anwendung von MFCs kann deren Einsatz als Biosensor sein. Ein Biosensor ist ein technische Applikation, welche biologische Moleküle erkennt und über einen physikalischen Wandler quantitativ oder semi-quantitativ in messbare Daten umwandelt (Lagarde and Jaffrezic-Renault, 2011). Es können beispielsweise optische oder elektrische Signale gemessen werden. Meist dienen aufgereinigte Enzyme aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität als biologische Erkennungssequenzen. Jedoch ist die Produktion von Enzymen teuer und zeitintensiv und die Aktivität und Halbwertszeit vieler Enzyme ist in vitro begrenzt (Byfield and Abuknesha, 1994). Mikrobielle Biosensoren mit ganzen Zellen sind eine elegante Lösung dieser Probleme, da die Zellen die benötigten Enzyme kontinuierlich und in großer Zahl selbst herstellen. Meist sind die eingesetzten Mikroorganismen genetisch verändert und besitzen spezifische Promoter-Regionen, die auf den Analyten reagieren. Der Promoter induziert die Expression eines Reportergens und das entsprechende Protein kann direkt oder indirekt in messbare Signale umgewandelt werden (Belkin, 2003, Pasco et al., 2011). Bei der elektrochemischen Signalumwandlung wird ein Potential vorgegeben und der Strom gemessen. Dieser ist abhängig von der Oxidation oder Reduktion einer elektroaktiven Substanz im Medium. So kann z. B. der biologische Sauerstoffbedarf (BSB) eines Systems bestimmt werden (Pasco et al., 2011). Auf Basis von MFCs können vielfältige Biosensorsysteme entwickelt werden. Ein Beispiel hierfür ist ein *S. oneidensis*-Stamm, bei dem die verlängerte Elektronentransferkette unter Kontrolle eines induzierbaren Promoters gestellt wurde. Dieser Stamm produziert nun in einer MFC Strom in Abhängigkeit der Induktionsstärke des

Promoters (Golitsch et al., 2013). Durch Wahl geeigneter Promotoren können somit unterschiedliche Umweltparameter gemessen werden.

Nicht-stöchiometrische Fermentation

Der Prozess der Fermentation bezeichnet den mikrobiellen Abbau organischer Stoffe zur Energiegewinnung ohne Einbeziehung externer Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff oder Nitrat. Fermentationen finden in der Biotechnologie eine breite Anwendung, da durch den Verzicht auf einen Elektronenakzeptor der kostspielige Eintrag von Sauerstoff oder eines alternativen Akzeptors sowie die Anhäufung unerwünschter Reduktionsprodukte entfallen. Zudem ist eine hohe Umsatzrate bei geringer Zunahme der Zellmasse für biotechnologischer Anwendungen von Vorteil. Zelluläre Stoffwechselreaktionen bestehen aus einer engen Verknüpfung von Oxidations- und Reduktionsprozessen und die Elektronenbilanz zwischen Substrat und Produkt(gemisch) muss stets ausgeglichen sein. Mikroorganismen bilden bei der Fermentation daher häufig Produktgemische aus organischen Säuren, Gasen und Alkoholen, was in der biotechnologischen Anwendung zur Anreicherung unerwünschter Nebenprodukte führt und die Produktion reiner Substanzen, die oxidiert sind als das Ausgangssubstrat, verhindert. Anoden in MFCs können eine „Elektronen-Senke“ darstellen und somit nicht-stöchiometrische Fermentationen (*unbalanced fermentations*) ermöglichen. Ein *S. oneidensis*-Stamm, welcher die Gene zur Glycerin-Oxidation und Ethanol-Produktion heterolog exprimiert, oxidiert Glycerin zu Ethanol und CO₂ ohne die Entstehung von Nebenprodukten, wenn die überzähligen Elektronen auf eine Anode abfließen können (Flynn et al., 2010) und zeigt, dass MFCs die Bilanzierung ungünstiger Fermentationsreaktionen ermöglichen können. Weitere Anwendungsmöglichkeiten bietet die biotechnologische Produktion von oxidierten Substanzen wie Butandiol, Itaconsäure oder Terpenen. Diese Wertstoffe könnten durch wenige Veränderungen des Zentralmetabolismus hergestellt werden (Abbildung 6).

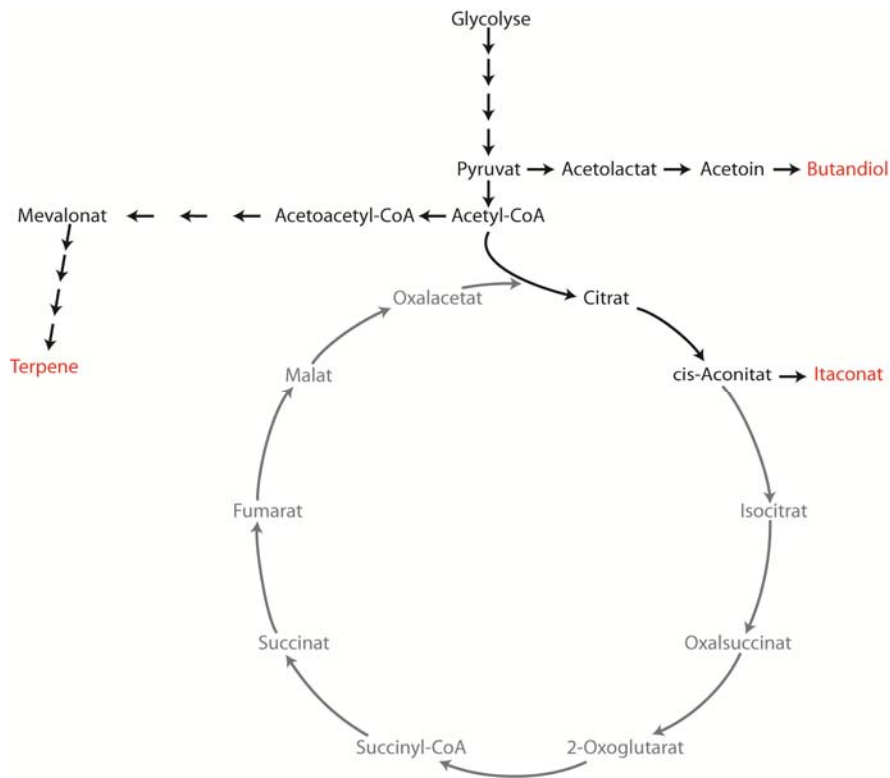


Abb. 6: **Produktion von Wertstoffen mittels nicht-stöchiometrischer Fermentation.** Dargestellt sind potentielle Ansatzpunkte am Zentralmetabolismus zur Produktion von Terpenen, Butandiol oder Itaconat. Die Anzahl der Pfeile zwischen den einzelnen Metaboliten entspricht nicht notwendigerweise der Zahl der Syntheseschritte.

1.2 Exoelektrogene Mikroorganismen

Exoelektrogene Mikroorganismen sind in der Lage, Elektronen auf die Zelloberfläche zu transferieren und somit extrazelluläre Akzeptoren wie Metalle, Minerale oder eine Anode zu reduzieren. Je länger der Prozess der mikrobiellen Metall-Reduktion erforscht wird, desto mehr wird über seine Diversität bekannt. Es gibt Modellorganismen wie *Shewanella oneidensis* oder *Geobacter sulfurreducens* anhand derer die Biochemie mikrobieller Metallreduktion untersucht wird, jedoch sind diese Organismen nur die Spitze des Eisbergs in Bezug auf die phylogenetische (und vermutlich biochemische) Diversität. Die folgende Aufzählung verschiedener exoelektrogener Bakterien in unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen erhebt daher bei weitem nicht den Anspruch auf Vollständigkeit und soll stattdessen die Vielfalt und weite Verbreitung der Metallreduzierer veranschaulichen. Zusätzlich sei erwähnt, dass Metallreduktion auch unter acido- und alkaliphilen Bakterien und unter den Archaea bekannt ist, auch wenn hier nicht genauer auf ihre Vertreter eingegangen wird.

Phylogenetische Verteilung exoelektrogener Bakterien

Proteobakterien stellen die größte Gruppe neutrophiler Metall-Reduzierer dar. Exoelektrogene Bakterien kommen den vier Phyla der α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien vor, wobei sie innerhalb der γ - und δ -Gruppen am häufigsten vertreten sind. Neben *Shewanella*-Species finden sich bei den γ -Proteobakterien Metall-Reduzierer innerhalb der Genera *Ferrimonas*, *Pantothea* und *Aeromonas* (Nolan et al., 2010), (Francis et al., 2000), (Pham et al., 2003). Die δ -Proteobakterien stellen die größte Zahl von isolierten und charakterisierten exoelektrogenen Bakterien. Am bekanntesten sind hier die Vertreter *Geobacter sulfurreducens* und *G. metallireducens*, aber auch unter den *Desulfuromonas*- *Pelobacter*, *Anaeromyxobacter*- und *Desulfovibrio*-Arten wurden zahlreiche Metall-reduzierende Bakterien charakterisiert (Coleman et al., 1993, Lovley et al., 1993, Caccavo et al., 1994, Coates et al., 1995, Lovley et al., 1995, He and Sanford, 2003).

Neben der großen Zahl an exoelektrogenen Organismen innerhalb der Proteobakterien gibt es weitere, phylogenetisch weit verbreitete Arten die ebenfalls Metalle reduzieren können. *Geothrix fermentans*, ein Acidobakterium reduziert Eisen, Mangan oder eine Anode mit Hilfe einer noch nicht näher identifizierten Shuttle-Komponente (Coates et al., 1999, Bond and Lovley, 2005). *Geovibrio ferrireducens* gehört zu der phylogenetisch distinkten Gruppe der *Deferricateriaceae* und kann Eisenspezies mit Prolin als Kohlenstoffquelle reduzieren (Caccavo et al., 1996). Auch unter den Gram-positiven Organismen sind Metall-Reduzierer bekannt, wenn auch in geringerer Zahl als bei den Gram-negativen. *Thermincola potens* reduziert eine Anode über direkten Kontakt; vermutlich mittels Cytochromen auf der Zelloberfläche (Wrighton et al., 2011). Der *Bacillus*-Stamm *B. infernus* koppelt die Oxidation von Lactat oder Formiat an die Reduktion von Mangan- oder Eisenspezies und zeigte in einem vergleichenden Wachstumsexperiment dieselbe Magnetit-Reduktionsrate wie *G. metallireducens* (Boone et al., 1995, Crespo et al., 2007).

Cytochrome als Elektronen-übertragende Proteine

Neutrophile dissimilatorische Metallreduzierer der Genera *Shewanella* und *Geobacter* haben eine erstaunlich hohe Zahl an Genen für putative *c*-Typ Cytochrome in ihrem Genom und ihre Elektronentransportketten aus dem Cytoplasma auf die Oberfläche der Zelle bestehen zumeist aus Cytochromen. Auch in vielen anderen exoelektrogenen Organismen finden sich Hinweise für eine Beteiligung von Cytochromen am extrazellulären Elektronentransfer (Sturm et al., 2012). Dennoch ist das Vorhandensein von Cytochromen kein ausschließliches Kriterium für extrazelluläre Atmung und es gibt ebenso Organismen, welche Metalle reduzieren können und dennoch keine oder wenige Gene für *c*-Typ Cytochrome besitzen.

In den meisten exoelektrogenen Mikroorganismen geht die Fähigkeit, Eisen reduzieren zu können einher mit der Fähigkeit, Elektronen auf eine Anode übertragen zu können. Dennoch bestätigen auch hier Ausnahmen die Regel. So kann *Pelobacter carbinolicus* zwar Eisen reduzieren, produziert jedoch keinen Strom in einer MFC (Richter et al., 2007).

1.3 Dissimilatorische Eisenreduktion in *S. oneidensis*

Shewanella oneidensis MR-1 ist einer der Modellorganismen für exoelektrogene Bakterien, in welchem Physiologie und Biochemie der extrazellulären Atmung genauer untersucht wurden und werden. Es handelt sich um ein Gram-negatives γ -Proteobakterium, welches 1988 als Mangan-Reduzierer aus dem Sediment des Oneida-Sees in New York isoliert wurde (Myers and Nealson, 1988), (Venkateswaran et al., 1999). *S. oneidensis* ist ein obligat aerober Organismus und kann neben Sauerstoff eine große Zahl an weiteren Elektronenakzeptoren nutzen. Dazu zählen über 20 verschiedene Substanzen, unter anderem lösliche Stoffe wie Nitrat, Nitrit, Fumarat, Schwefel, Thiosulfat, DMSO und TMAO, aber auch unlösliche Minerale wie Eisen oder Mangan (Myers and Nealson, 1988, Burnes et al., 1998, Schwalb et al., 2002, Schwalb et al., 2003, Galnick and Hau, 2006, Cruz-Garcia et al., 2007, Shirodkar et al., 2010). Als Elektronendonator bzw. Kohlenstoffquelle nutzt *S. oneidensis* Gärprodukte wie Lactat, Formiat und Wasserstoff, sowie das Chitin-Monomer N-Acetylglukosamin.

Beim Elektronentransfer auf Eisen spielen *c*-Typ-Cytochrome eine entscheidende Rolle. Daher führt eine Deletion der *ccm*-Gene, welche für die *c*-Typ Cytochrom-Maturisierungsmaschinerie codieren, in *S. oneidensis* zum Verlust der Fähigkeit mit unlöslichen terminalen Akzeptoren wachsen zu können (Bouhenni et al., 2005, Carpentier et al., 2005, Sturm et al., 2012). Im Genom des Organismus gibt es 41 Gene für *c*-Typ Cytochrome (Meyer et al., 2004, Romine et al., 2008) und viele davon werden unter Eisen-reduzierenden Bedingungen exprimiert, jedoch ist das minimale Set an Proteinen, welches zur Eisenreduktion notwendig ist, bisher nicht bekannt. Ursache für dieses unvollständige Bild ist die mangelnde Regulation der Expression von Cytochromen unter anoxischen Bedingungen und die Verbindung der einzelnen Elektronen-Transfer-Wege untereinander ebenso wie die redundante Aktivität vieler dieser Proteine, welche eine Erforschung der Rolle einzelner Proteine in der extrazellulären Atmung erschwert. Dennoch sind einige Proteine bekannt, die unverzichtbar für die Eisen- und Anodenreduktion in *S. oneidensis* sind (Abbildung 7; Myers and Myers, 2003a, Bretschger et al., 2007, Gao et al., 2010).

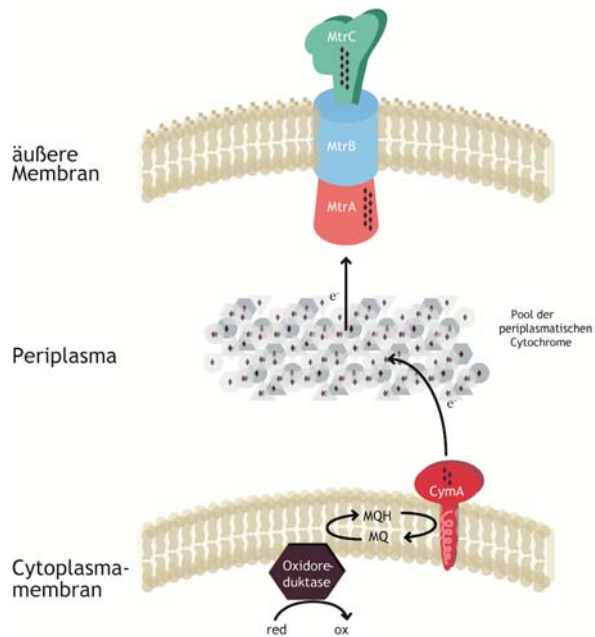


Abb. 7: **Komponenten der dissimilatorischen Eisenreduktion in *S. oneidensis*.** Die Menaquinol-Oxidase CymA überträgt Elektronen ins Periplasma. Das Periplasma ist dicht besetzt mit einer Mischung verschiedener Cytochrome. CymA kann Elektronen auf einige dieser Cytochrome (u.a. MtrA, FccA und STC; siehe Text und Ergebnisse) übertragen. Es ist jedoch unklar, ob dies anhand eines spezifischen Elektronentransferwegs passiert oder ob es sich um einen zufälligen Prozess handelt. In der äußeren Membran gibt es einen Protein-Komplex aus MtrABC. MtrB ist ein β -Fass Protein und bringt durch eine Pore in der Membran das periplasmatische Cytochrom MtrA und die finale Reduktase MtrC in räumliche Nähe, so dass die Elektronen auf den extrazellulären Akzeptor übertragen werden können.

CymA (Cytoplasmic membrane protein A) ist ein Tetrahäm *c*-Typ Cytochrom, welches zur NapC/NirT Familie gehört und den Einstieg und die Verteilung der Elektronen aus dem Menachinol-Pool in der Cytoplasmamembran auf verschiedene Reduktasen im Periplasma katalysiert. CymA-Deletionsmutanten verlieren die Fähigkeit, eine Vielzahl an Elektronenakzeptoren zu reduzieren. Darunter sind Fumarat, Nitrat und DMSO, aber auch unlösliche Spezies wie Eisen, Mangan oder eine Anode (Myers and Myers, 1997, Myers et al., 2000, Schwalb et al., 2003). Die heterologe Expression von *cymA* ist ausreichend, um *E. coli* in einen dissimilatorischen Eisenreduzierer zu verwandeln, wenn das Membran-permeable Eisen-Chelat Fe-NTA (Nitrilotriacetat) als Elektronenakzeptor dient (Gescher et al., 2008). Obwohl mit der heterologen Expression von *cymA* keine Elektronentransportkette auf die Zelloberfläche etabliert wurde, zeigt das Experiment dennoch, dass die dissimilatorische Eisenreduktion in Gram-negativen Organismen hauptsächlich durch den fehlenden Zugang zum Akzeptor limitiert und dass zur Eisenreduktion nicht notwendigerweise eine spezifische Eisenreduktase erforderlich ist.

Neben CymA ist MtrA das einzige periplasmatische Cytochrom, was für die Reduktion von Fe(III) oder einer Anode unabdingbar ist (Bretschger et al., 2007; Hartshorne et al., 2007; Schickberger et al., 2013). MtrA (Metal reducing protein A) ist ein Dekahäm Cytochrom und liegt in *S. oneidensis* sowohl in löslicher Form im Periplasma als auch als Teil eines Komplexes in der äußeren Membran vor. MtrA kann *in vitro* von CymA reduziert werden und besitzt die Fähigkeit, chelatierte Eisenformen zu reduzieren (Pitts et al., 2003, Schütz et al., 2009). Die ergänzende Expression von *mtrA* in einer *E. coli* Mutante, welche bereits *cymA* exprimiert, führt zu einer Erhöhung der Reduktionsrate verglichen mit

Zellen, welche nur *cymA* exprimieren (Schütz et al., 2009). MtrA erfüllt in der Eisenreduktion neben seiner Funktion als periplasmatisches Shuttle eine zusätzliche Funktion und ist Teil eines Komplexes in der äußeren Membran. Dieser Komplex setzt sich aus MtrA, MtrB und MtrC zusammen. MtrB ist ein β -Fass-Protein und bildet eine Pore in der äußeren Membran. Durch diese Pore kommt MtrA in Kontakt mit der finalen Eisenreduktase MtrC, wodurch ein Elektronentransfer auf die Zelloberfläche ermöglicht wird. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex auch *in vitro* den Elektronentransfer über eine Liposomen-Membran erlaubt (Hartshorne et al., 2009). Eine dritte Funktion von MtrA scheint die eines Chaperons zu sein, indem es den Transport von MtrB durch das Periplasma unterstützt und damit vor Abbau durch die Protease DegP schützt (Schicklberger et al., 2011). In $\Delta mtrA$ Mutanten kann MtrB daher nicht detektiert werden (Hartshorne et al., 2009, Schicklberger et al., 2011). MtrB ist neben *CymA* und MtrA ein weiteres essentielles Protein für die dissimilatorische Eisenreduktion. Eine Deletion von *mtrB* führt dazu, dass die Zellen die Fähigkeit verlieren, mit Eisen oder Mangan als Elektronenakzeptor zu wachsen (Beliaev and Saffarini, 1998, Bretschger et al., 2007).

Das Lipoprotein MtrC ist ein Dekahäm *c*-Typ Cytochrom und eines der 5 äußeren Membrancytochrome (*outer membrane cytochromes*, OMCs) in *S. oneidensis*. Es ist über einen Lipid-Anker in der äußeren Membran lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in der Reduktion von Eisen- und Manganoxiden. MtrC dient als terminale Reduktase und katalysiert die terminale Elektronenübertragung auf den extrazellulären Akzeptor. Deletionsmutanten von MtrC wachsen langsamer mit unlöslichen Akzeptoren, verlieren die Fähigkeit jedoch nicht vollständig und können Eisencitrat, Mangan- sowie Eisenoxid noch mit einer Aktivität von 10-15% des Wildtyps reduzieren (Myers and Myers, 2002). Dies liegt vermutlich an der Redundanz der OMCs. *OmcA* (Outer membrane cytochrome A) ist ebenfalls ein Dekahäm *c*-Typ Cytochrom und spielt neben MtrC eine Rolle in der Reduktion von extrazellulären Akzeptoren, v. a. von Manganoxiden (Bücking et al., 2010, Coursolle and Gralnick, 2012). In einer *mtrC*-Deletionsmutante übernimmt es teilweise die Funktion als Eisenreduktase. Die drei weiteren OMCs MtrF, SO2931 und SO1659 werden bei der extrazellulären Atmung in *S. oneidensis* nicht exprimiert. Für MtrF (ein Homolog zu MtrC) existiert eine Kristallstruktur, welche zeigt, dass sich zwei Hämgruppen auf der extrazellulären Seite des Moleküls befinden und somit ein direkter Elektronentransfer auf unlösliche Akzeptoren möglich ist (Clarke et al., 2011).

Neben den bereits erwähnten Proteinen wird besonders im Periplasma von *S. oneidensis* eine Vielzahl von Cytochromen exprimiert. Genomanalysen ergaben 27 Gene für putative

periplasmatische c-Typ Cytochrome und Periplasmafraktionen von Zellen, welche unter Eisen-reduzierenden Bedingungen kultiviert wurden, weisen eine tief rote Farbe auf und zeigen in einer Hämgruppenfärbungen die Anwesenheit zahlreicher Cytochrome (Bücking, 2010). Hier ist jedoch über die Rolle einzelner Proteine bisher wenig bekannt.

Neben den genannten Cytochromen und MtrB gibt es zusätzliche Faktoren, welche eine essentielle Funktion bei der Ausbildung der extrazellulären Elektronentransportkette in *S. oneidensis* einnehmen. Mutanten in *gspD* und *gspG* verlieren die Fähigkeit, Eisen- oder Manganoxide reduzieren zu können und die OMCs sind falsch orientiert auf der periplasmatischen Seite der äußeren Membran oder falsch lokalisiert in der inneren Membran zu finden (Shi et al., 2008, Richter et al., 2010). Die *gsp*-Gene (general secretory pathway) gehören zum Typ-II-Sekretionssystem, welches für den Transport von Proteinen in und über die äußere Membran verantwortlich ist und worauf im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird.

1.4 Das Typ-II-Sekretionssystem in Gram-negativen Bakterien

Bei der Sekretion von Proteinen in Gram-negativen Bakterien müssen diese zwei Membranen überwinden. Hierfür stehen den Organismen 6 verschiedene Sekretionssysteme zu Verfügung (Typ I bis Typ VI; Hayes et al., 2010). Das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS) dient dazu, Multiprotein-Komplexe und Proteine mit Co-Faktoren aus dem Periplasma in die äußere Membran oder darüber hinaus ins umgebende Medium zu sekretieren. Die Zahl der sekretierten Proteine reicht dabei von einem Protein im Falle von *Klebsiella oxytoca* (Denfert et al., 1987) bis hin zu mehr als 10 verschiedenen sekretierten Proteinen in *Pseudomonas aeruginosa* (Bleves et al., 2010) oder *Vibrio cholerae* (Sikora et al., 2011). Die Funktion der Exoproteine ist äußerst divers. Unter anderem werden Toxine (Sandkvist et al., 1997), Virulenzfaktoren (Zalewska-Piatek et al., 2008), Cytochrome (Shi et al., 2008) und eine Vielzahl von Exoenzymen, welche Makromoleküle extrazellulär hydrolysieren können (Filloux, 2004) exportiert. Charakteristisch für eine Sekretion durch das T2SS ist dabei der Export „komplexer“ Proteine, was bedeutet dass eine Maturisierung der Proteine im Periplasma oder die Assemblierung zu multimeren Komplexen dem Export vorangeht. Beispiele für solche Proteine sind die Lipoproteine MtrC und OmcA der äußeren Membran von *S. oneidensis*, bei denen 10 Hämgruppen auf dem Weg durch das Periplasma eingefügt werden oder das hitze-labile Toxin LT aus *E. coli*, welches aus mehreren Untereinheiten besteht (Horstman and Kuehn, 2000). Das T2SS setzt sich aus einer komplexen Protein-Maschinerie zusammen, die aus 12 bis 15 verschiedenen Proteinen besteht, welche häufig in einem einzigen Operon lokalisiert sind (Abbildung 8).

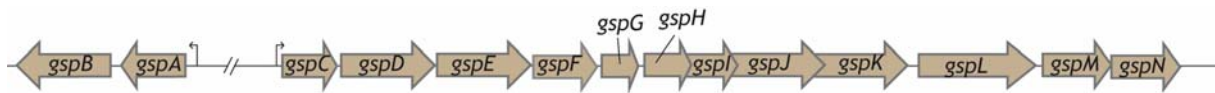


Abb. 8: Schematische Darstellung der zwei *gsp*-Gencluster in *S. oneidensis*. Der Organismus besitzt zwei Operons an unterschiedlichen Orten im Genom. Das kleinere Operon besteht aus den Genen *gspA* und *gspB*; das größere Gencluster aus den Genen *gspC* bis *gspN*. Die Größe der Gene und ihr Abstand zueinander innerhalb der Cluster sind näherungsweise maßstabsgetreu dargestellt.

Das T2SS ist der terminale Teil des allgemeinen Sekretionsweges in Gram-negativen Organismen und die Gene sind daher mit „*gsp*“ (*general secretory pathway*) benannt. Die T2SS-Maschinerie durchspannt gleichzeitig die innere und äußere Membran und ermöglicht so das Ausschleusen von Proteinen. Sie setzt sich (von Innen nach Außen betrachtet) aus vier Untereinheiten zusammen: einer ATPase-Einheit (GspE) auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran, einer Plattform in der inneren Membran, welche sich aus den Proteinen GspC, GspF, GspL und GspM zusammensetzt, einer Art „Stempel“, der aus der trimeren Spitze des Pseudopilus (GspKIJ) und dem filamentösen Pseudopilus (GspG) besteht sowie dem multimeren Kanal-Proteinkomplex aus GspD-Untereinheiten, welche eine Pore in der äußeren Membran bilden. Der Pseudopilus schiebt das Exoprotein durch die Pore in der äußeren Membran (Abbildung 9).

Neben den beschriebenen Komponenten des T2SS gibt es in *E. coli*, *S. oneidensis* und einigen anderen Organismen zusätzlich noch ein weiteres, kleineres Operon aus den Genen *gspA* und *gspB*, dessen Rolle bisher jedoch unbekannt ist. Für *E. coli* wird eine regulatorische Funktion vermutet (Francetic et al., 2000). Die Stöchiometrie vieler Proteinkomponenten der T2SS ist noch unklar oder unbekannt und auch über den genauen Mechanismus des Exports und die Erkennung von zu sekretierenden Proteinen durch das T2SS ist bisher wenig bekannt.

1.4.1 Die Rolle des T2SS bei der extrazellulären Atmung

Die Analyse verschiedener Deletionsmutanten der *gsp*-Gene hat gezeigt, dass das T2SS essentiell für die richtige Lokalisierung und Orientierung der OMCs ist und somit entscheidend zu einer funktionierenden extrazellulären Atmung beiträgt (Shi et al., 2008, Richter et al., 2010). Über den genauen Mechanismus der Sekretion der OMCs ist jedoch nur wenig bekannt. Die Translokation der Exoproteine OmcA und MtrC erfolgt wahrscheinlich in zwei Schritten. Die Proteine werden im Cytoplasma transkribiert, translatiert und über den Sec-Transportweg durch die Cytoplasmamembran ins Periplasma sekretiert, wo sie durch Einfügen der Hämgruppen zum fertigen Protein reifen. Nach dieser Maturisierung sorgen T2SS-Komponenten dafür dass die Lipoproteine in

die äußere Membran gelangen. Auf den generellen Mechanismus der Sekretion wird im Folgenden genauer eingegangen.

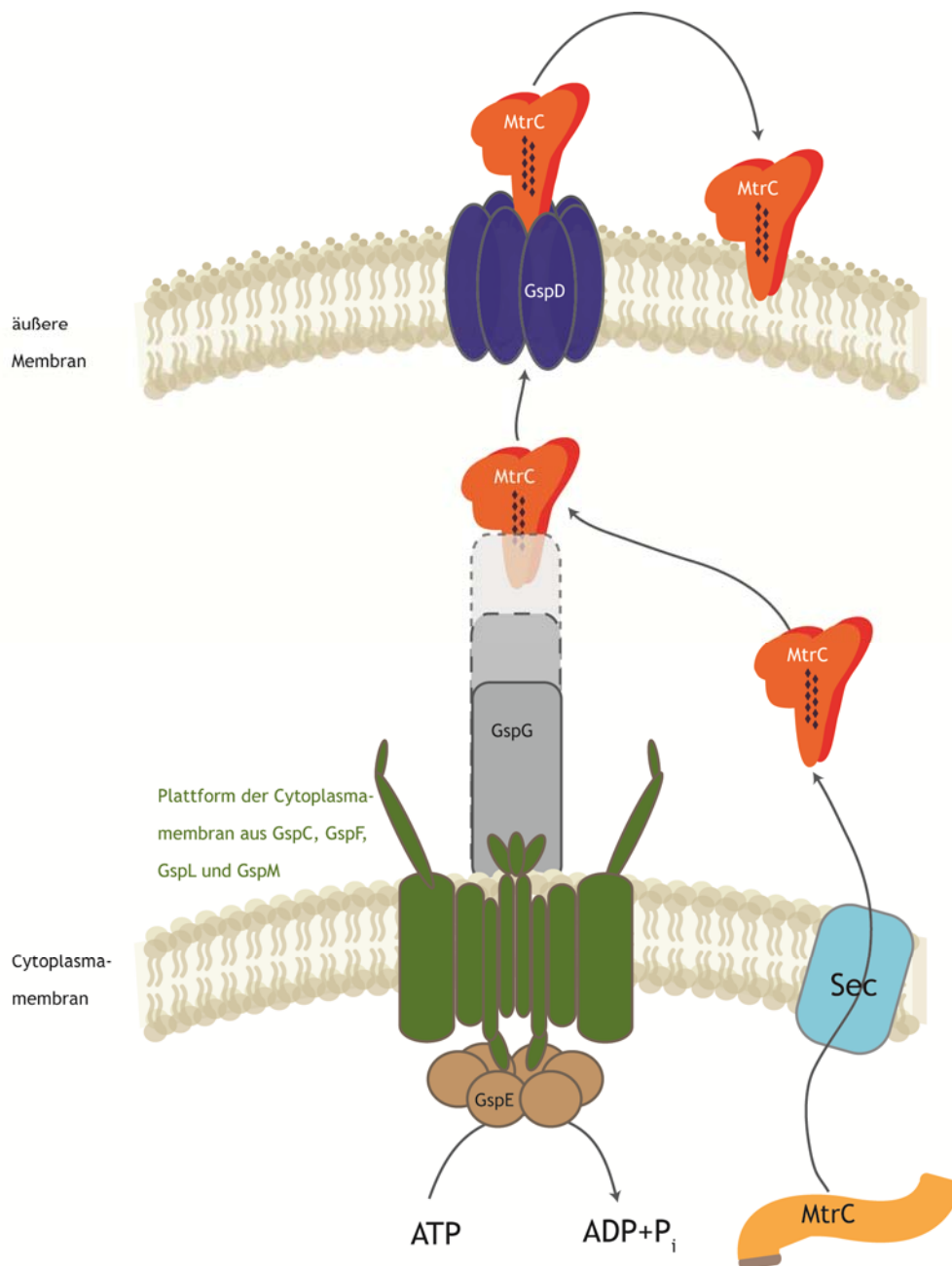


Abb. 9: **Sekretion von MtrC in die äußere Membran.** MtrC wird im Cytoplasma transkribiert, translatiert und ungefaltet über den Sec-Transportweg durch die Cytoplasmamembran ins Periplasma sekretiert. Dort findet die Maturisierung zum fertigen Protein statt. Das T2SS erkennt an der Plattform in der Cytoplasmamembran (bestehend aus GspC, GspF, GspL und GspM, dargestellt in grün) das Exoprotein und beginnt vermittelt über die ATPase GspE (braun) mit der Assemblierung des Pseudopilus aus GspG-Untereinheiten (grau). Die trimere Spitze des Pseudopilus aus den Untereinheiten GspK, GspI und GspJ ist zur besseren Anschaulichkeit nicht dargestellt. Der Pilus schiebt MtrC schrittweise durch die Pore in der äußeren Membran (bestehend aus GspD-Untereinheiten; dargestellt in blau). Anschließend erfolgt die Einlagerung in die äußere Membran. Für diesen letzten Schritt ist der Mechanismus unbekannt.

Ein möglicher Mechanismus für die Sekretion von Proteinen in die äußere Membran (oder darüber hinaus) wird von Korotkov et al. (2012) vorgeschlagen (Korotkov et al., 2012). Hierbei erkennt GspC, eine Komponente der Plattform in der inneren Membran das Exoprotein, welches zuvor vom Sec- oder Tat-System ins Periplasma transloziert wurde und leitet ein Signal an die ATPase weiter (Voulhoux et al., 2001, Du Plessis et al., 2011). Die Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung und zum Beginn der Assemblierung des Pseudopilus (GspG). Nach und nach führt die Anlagerung von immer mehr GspG-Untereinheiten zur Ausbildung einer filamentösen Struktur, welche das Exoprotein durch die Pore in der äußeren Membran schiebt (Possot and Pugsley, 1994, Abendroth et al., 2004, Francetic et al., 2007, Korotkov and Hol, 2008, Korotkov et al., 2011).

Wie bereits in Kapitel 1.3 (Dissimilatorische Eisenreduktion in *S. oneidensis*) angedeutet spielt das T2SS eine essentielle Rolle in der extrazellulären Atmung von *S. oneidensis*. Fehlen Schlüsselkomponenten des T2SS (GspD, GspE oder GspG), so ist die Fähigkeit, Fe(III) zu reduzieren deutlich verringert und die terminalen Reduktasen können nicht in der äußeren Membran nachgewiesen werden (Shi et al., 2008). Auch in *E. coli* ist eine korrekte Orientierung heterolog exprimierter OMCs aus *S. oneidensis* von einem funktionalen T2SS abhängig. Wird OmcA in dem *E. coli* Stamm BL21 synthetisiert, welcher über ein funktionales T2SS verfügt, so befindet sich das reaktive Zentrum des Cytochroms auf der Zelloberfläche und kann Elektronen auf einen extrazellulären Akzeptor übertragen. In einem anderen *E. coli*-Stamm (K-12) sind unter Laborbedingungen die *gsp*-Gene durch das DNA-bindende H-NS Protein transkriptionell inaktiviert (Francetic et al., 1996, Francetic et al., 2000) und OmcA nicht auf der Zelloberfläche zu finden (Donald 2008, Richter 2009). Interessanterweise ist eine Aktivierung des T2SS in *E. coli* K-12 jedoch nicht ausreichend für eine funktionale Sekretion von MtrC in die äußere Membran (Richter 2009). Gründe hierfür liegen möglicherweise in der hohen Spezifität des T2SS, welche eine Erkennung des Cytochroms verhindert (Douzi et al., 2012). Diese Spezifität wurde unter anderem für das Pul-System von *Klebsiella oxytoca* gezeigt, welches nicht in der Lage ist Proteine aus den nahe verwandten γ -Proteobakterien *Pseudomonas aeruginosa* oder *Erwinia chrysanthemi* zu sekretieren (Degroot et al., 1991, Lindeberg et al., 1996).

1.5 Biofilme in mikrobiellen Brennstoffzellen

Die Ausbildung von Biofilmen auf einer Anode ist eine von mehreren Möglichkeiten eine Elektronenübertragung zu gewährleisten (Abbildung 3); der genaue Mechanismus des Elektronentransfers durch den Biofilm ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Auf Anoden,

welche als Elektronenakzeptor dienen, bildet *Shewanella* spp. dünne Biofilme, in denen jede Zelle direkten Kontakt zur Anode besitzt (McLean et al., 2010). Im Gegensatz dazu formt *Geobacter* spp. dickere Aggregate, bei denen der Elektronentransfer auch mehrere Zelllängen von der Anode entfernt stattfindet (Reguera et al., 2006). Die Mechanismen des Elektronentransports in Biofilmen mit exoelektrogenen Organismen sind ein intensiv erforschtes und debattiertes Gebiet und aus Arbeiten mit *G. sulfurreducens* sind filamentöse Strukturen („nanowires“) bekannt, die als leitfähige oder strukturgebende Elemente des Biofilms diskutiert werden (Reguera et al., 2007, Malvankar et al., 2011, Schrott et al., 2011, Strycharz-Glaven et al., 2011). Zusätzlich scheint das äußere Membrancytochrom OmcZ eine Rolle zu spielen (Nevin et al., 2009). Es werden zwei unterschiedliche Modelle der Elektronenübertragung in Biofilmen von *G. sulfurreducens* kontrovers diskutiert (Bonanni et al., 2012). Beim Modell des metallischen Leiters werden die nanowires als leitfähige Ausstülpungen der äußeren Membran betrachtet, welche die Elektronen zum entfernten Akzeptor leiten. Extrazelluläre Cytochrome wie OmcZ haben in diesem Modell lediglich eine unterstützende Funktion (Reguera et al., 2005, Reguera et al., 2006). Pili wurden im Zellüberstand von *Geobacter*-Kulturen gefunden und Wissenschaftler postulierten eine Leitfähigkeit vergleichbar derer von synthetischen metallischen Nanostrukturen, welche aber immer noch kontrovers diskutiert wird (Malvankar et al., 2011). Das „electron-hopping“-Modell geht von einer hauptsächlich strukturgebenden Funktion der Pili aus (Reguera et al., 2007) und nimmt an, dass die Elektronen sequentiell über lösliche Cytochrome transportiert werden. Diese Cytochrome bilden entlang der Pili ein leitendes Netzwerk bis zum Akzeptor aus (Strycharz-Glaven et al., 2011). Neben OmcZ wurden jedoch bisher keine weiteren extrazellulären Cytochrome in *G. sulfurreducens* gefunden.

Auch in anderen exoelektrogenen Organismen hat die Bildung von Biofilmen einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit in einer MFC. Induziert man bei *Desulfovibrio desulfuricans* die Biofilmbildung auf einer Anode durch Modifikationen auf der Elektrodenoberfläche, so lässt sich die Stromproduktion um 41% steigern (Kang et al., 2014). Neben der Identifizierung neuer Stämme, der Optimierung von Reaktoren und der Nutzung der synthetischen Biologie bietet somit die Verbesserung der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Anoden durch verstärkte Biofilmbildung eine weitere Möglichkeit, die Effizienz einer MFC zu steigern. Abschließend soll nun das Phänomen der Persistenz und ein daraus resultierender neuer Ansatz zur Induktion der Biofilmbildung genauer erläutert werden.

1.5.1 Persistenz und der Einfluss auf die Bildung von Biofilmen

In vielen Mikroorganismen gibt es den Schutzmechanismus der so genannten Persistenz. Sind beispielsweise *E. coli*-Zellen starkem Stress, etwa durch UV-Strahlung oder Antibiotika ausgesetzt, so

sterben nicht zwingend alle Bakterien ab. Einzelne Zellen können in ein Überdauerungsstadium („Persister“) übergehen und sich bei günstigeren Umweltbedingungen wieder vermehren und in robuste Biofilme umwandeln. Persister-Zellen sind keine Mutationen innerhalb einer Art, sondern sind isogenetisch zu den normal-wachsenden, sensitiven Zellen und haben einen reduzierten Stoffwechsel und eine verstärkte Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse. Der Übergang in das Persistenzstadium erfolgt mit geringer Rate und nach dem Zufallsprinzip. Diese stochastische Heterogenität wird als „Bet-Hedging“ bezeichnet („auf alles gefasst sein und das Risiko verteilen“) und dieses Prinzip der Risikostreuung sorgt dafür, dass Organismen mit gleicher genetischer Ausstattung unterschiedlich gut an wechselnde Bedingungen adaptiert sind und somit das Überleben der ganzen Art sichern können. Anders als bei zufälligen Mutationen ist das Bet-Hedging Charakteristikum einer Bakterienkultur und eine Reaktion auf Umweltveränderungen kann unmittelbar erfolgen (Balaban et al., 2004, Beaumont et al., 2009, Rotem et al., 2010, Wagner and Unoson, 2012).

Ein Mechanismus der Bildung von persistenten Zellstadien ist aus *E. coli* bekannt. Unter Stress synthetisiert der Organismus das Peptid TisB, welches sich in die Zellmembran einlagert. TisB ist ein kurzes Peptid aus 29 Aminosäuren und spielt eine entscheidende Rolle beim Übergang der vegetativen Zellen zu Persister-Zellen (Abbildung 10).

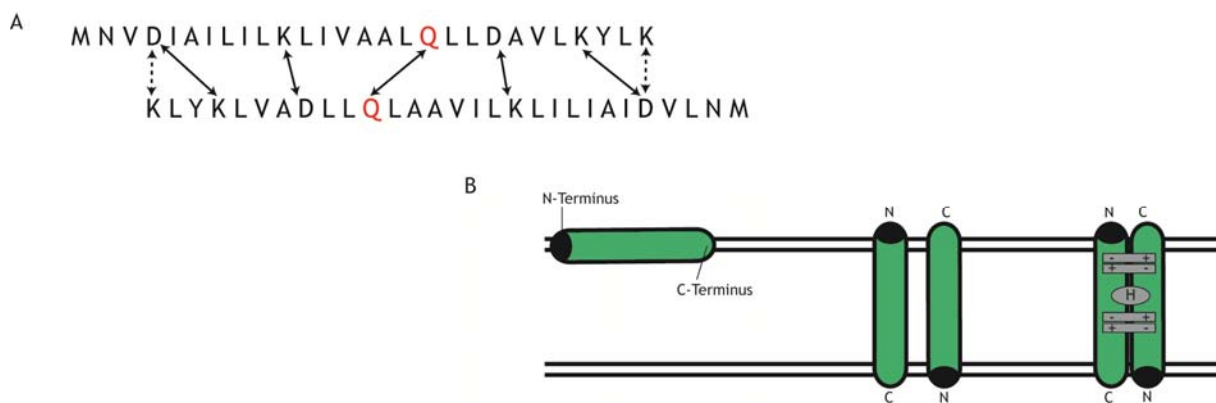


Abb. 10: **Sequenz von TisB und Orientierung in der Membran.** **A** Aminosäuresequenz von TisB, sowie die vermuteten intermolekularen Salzbindungen im antiparallelen TisB-Dimer (Pfeile). Die beiden Glutaminsäuren sind in rot dargestellt. **B** Bei einer Interaktion von TisB mit der Lipiddoppelschicht bildet sich ein antiparalleles Dimer, welches durch vier Salzbrücken und eine Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Glutaminsäure-Resten (mit „H“ gekennzeichnet) stabilisiert wird (nach Steinbrecher et al., 2012).

Zwei TisB-Moleküle können sich in der Cytoplasmamembran über geladene Seitenketten aneinander lagern und durchspannen die unpolare Lipidmembran so mit einer Art polarer „Strickleiter“. Auf den

„Sprossen“ können dann geladene Wasserstoff- und Hydroxid-Ionen über die Membran wandern, wodurch das Membranpotenzial sinkt, sämtliche Stoffwechselprozesse verlangsamt werden und die Zelle in den Persister-Zustand verfällt. Ist der Stress-auslösende Umweltreiz vorüber, regenerieren sich einige der überlebenden Persister und breiten sich als Biofilme aus (Gurnev et al., 2012, Steinbrecher et al., 2012).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Mikroben-Elektroden-Interaktionen in *E. coli* und eine Intensivierung der Interaktion von *S. oneidensis* mit einer Anode.

Hierzu sollte zunächst untersucht werden, welche periplasmatischen Cytochrome unter Eisen-reduzierenden Bedingungen in *S. oneidensis* exprimiert werden und wie sich eine heterologe Expression dieser Proteine auf das Reduktionsverhalten von verschiedenen *E. coli* Stämmen auswirkt. Zur schnellen und parallelen Analyse vieler Stämme sollte eine neue Testmethode etabliert werden, die auf der Reduktion einer membrangängigen Shuttle-Komponente und einer photometrischen Bestimmung der Reduktionsrate dieses Shuttles beruht. Ein anhand dieser Analysen optimierter *E. coli* Stamm sollte einen verbesserten Elektronentransport ins Periplasma aufweisen. Mit Hilfe einer Shuttle-basierten Anoden-Interaktion sollte der neue, synthetische Stamm in einer mikrobiellen Brennstoffzelle charakterisiert und ein Einfluss der heterologen Cytochrom-Expression auf seinen Metabolismus untersucht werden. Anschließend sollte die Elektronentransportkette auf die Zelloberfläche von *E. coli* durch die korrekte Orientierung einer terminalen Eisen-Reduktase vervollständigt werden.

Zur Intensivierung der Interaktion des natürlich-exoelektrogenen Bakteriums *S. oneidensis* mit einer Anode sollte der Einfluss des Biofilm-induzierenden Peptids TisB auf die Aggregat-Bildung der Zellen mit verschiedenen optischen Analyse-Methoden untersucht und die Auswirkungen des Peptids auf das elektrochemische Verhalten von *S. oneidensis* charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen und Chemikalien

2.1.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Liste der Stämme. Diese Mikroorganismen wurden in der Arbeit verwendet.

Species/Stamm	relevanter Genotyp	Referenz oder Quelle
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (JG7)	Wildtyp Stamm	(Venkateswaran et al., 1999)
<i>E. coli</i> DH5 α ZI (JG22)	<i>aci q</i> , PN25- <i>tetR</i> , <i>SpR</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>), Phi80 <i>lacZDM15</i>	(Lutz and Bujard, 1997)
<i>M. formicicum</i>	Wildtyp Stamm	(Ferry and Wolfe, 1976)
JG11	DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) Δ (<i>frdA-D</i>) 4380508::(<i>P_{tet} cymA</i>) pEC86	(Gescher et al., 2008)
JG146	DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) (<i>frdA-D</i>) 4380508::(<i>P_{tet} cymA-mtrA</i>) pEC86	(Schütz et al., 2009)
JG155	JG146 Δ <i>galk</i>	diese Arbeit
JG287	JG155 Δ (<i>gspC-gspO</i>)	diese Arbeit
JG380	JG287 <i>gspH-gspN</i> (aus <i>S. oneidensis</i>)	diese Arbeit
JG443	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>gspD</i>	Schickberger
JG519	JG380 <i>galk</i>	diese Arbeit
JG520	JG519 <i>P_{ara}(gspC-gspN)</i> (aus <i>S. oneidensis</i>)	diese Arbeit
JG788	JG520 pEC86	diese Arbeit
JG622	JG146 1195240::(<i>P_{ara stc}</i>) pEC86	diese Arbeit
JG642	<i>S. oneidensis</i> MR-1 pBAD- <i>mtrF</i> _{löslich}	(Thormann et al., 2004)
JG700	DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) 1195240::(<i>P_{ara stc}</i>) pEC86	(Gescher et al., 2008)
JG714	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Tn7:: <i>egfp</i>	(Thormann et al., 2004)
JG7672	DH5 α ZI pEC86	diese Arbeit
JG737	<i>S. oneidensis</i> MR-1 pBAD- <i>stc_{his}</i>	diese Arbeit
JG786	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>gspBA</i>	diese Arbeit

2.1.2 Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Difco (Augsburg) bezogen.

2.2 Bakterienzüchtung und Stammkulturhaltung

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Kulturmedien und Puffer wurden autoklaviert, hitzelabile Lösungen durch Filtration mit Sterilfiltern (0,2 μ m) sterilisiert.

2.2.1 Anzucht von *E. coli*

LB-Medium („*Lysogeny Broth*“, Tabelle 2) diente als Medium für flüssige Vorkulturen von *E. coli*. Die Zellen wurden in über Nacht in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben angezogen und bei 37°C bzw. 30°C im Schüttler (180 rpm) inkubiert. Antibiotika dienten als Selektionsmarker und wurden im Bedarfsfall in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml oder Chloramphenicol 30 µg/ml.

Tab. 2: **Zusammensetzung des LB-Mediums.** Dieses Medium diente zur aeroben Kultivierung von *E. coli* und *S. oneidensis*.

Komponente	Menge [g/l]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5

Die Anzucht von Zellen auf LB-Agar-Platten (Tabelle 3; 2% Agar) erfolgte je nach Stamm und Plasmid unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums und bei 30°C oder 37°C in Brutschränken.

Tab. 3: **Zusammensetzung des LB-Agars.** Dieser diente zur Kultivierung von *E. coli* und *S. oneidensis* auf Platten.

Komponente	Menge [g/l]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5
Agar	20

Für die Herstellung von Mutanten über das *galK*-System (2.3.5 Klonierungsmethoden) wurden Agarplatten aus M63 Medium (Tabelle 4) hergestellt.

Tab. 4: **Zusammensetzung des M63 Mediums.** Dieses Minimalmedium diente der *galK*-Selektion (2.3.5 Klonierungsmethoden). Der Agar wurde getrennt autoklaviert und danach dem Medium zugegeben (2%).

Komponente	Menge [g/l]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
KH_2PO_4	13,6
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 mg
pH mit 5 M KOH auf 7	
nach dem Autoklavieren erfolgte Komplementation mit:	
MgSO_4 (1 M)	1 ml
Thiamin (0,5%)	100 μl
Galaktose oder Glycerin und 2-Desoxy- Galaktose	2 5 bzw. 2

Für die anaerobe Kultivierung von *E. coli* wurden M4 Medium (Tabelle 5), M9 Medium (Tabelle 6) oder Carbonat-gepuffertes Medium (Tabelle 7) verwendet. Die Medien wurden komplementiert mit Spurenelementen (Tabelle 8), 0,1% Hefe-Extrakt und 14,8 μM Thiamin Hydrochlorid.

Tab. 5: **Zusammensetzung des M4 Mediums.** Dieses Medium diente der anaeroben Kultivierung von *E. coli* und *S. oneidensis*.

Komponente	Menge [g/l]
K_2HPO_4	0,22
KH_2PO_4	0,09
HEPES	1,41
NaHCO_3	0,17
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,19
NaCl	8,77
Spurenelemente 100x (siehe Tab. 8)	10 ml
MgSO_4 (1M)	1 ml
CaCl_2 (0,1 M)	1 ml
Hefeextrakt	1

Sofern nicht anders erwähnt, dienen 40 mM Glycerin oder 20 mM Glukose als Elektronendonator und 50 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Zur anaeroben Kultivierung

dienten Glasflaschen, die mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossen wurden. In M4 und M9 Medien sorgten die abwechselnde Begasung mit Stickstoff und das Anlegen von Vakuum für 15 Zyklen für eine schrittweise Anaerobisierung des Mediums, wohingegen das Carbonat-gepufferte Medium zunächst für 10 Minuten aufgekocht wurde, um gelösten Sauerstoff auszutreiben. Anschließend sorgte die Begasung mit einer Gasmischung aus N₂ und CO₂ (80:20) für eine Anreicherung von CO₂ in Medium und Gasphase. Beide Medien wurden autoklaviert, bei dem Carbonat-gepufferten Medium steril der pH auf 7,4 eingestellt und die Medien nach Bedarf mit Induktoren und Antibiotika komplementiert und mit *E. coli* beimpft. Anaerobe Kulturen wurden bei 30° C inkubiert, um durch das langsamere Wachstum eine gute heterologe Proteinexpressionsrate zu gewährleisten.

Tab. 6: **Zusammensetzung des M9 Mediums.** Dieses Minimalmedium diente der anaeroben Kultivierung von *E. coli*.

Komponente	Menge [g/l]
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	12,8
K ₂ HPO ₄	3
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1
Spurenelemente 100x	10
Casaminosäuren	0,375
pH auf 7,4 einstellen	

2.2.2 Anzucht von *S. oneidensis*

Für die aerobe Anzucht konnte *S. oneidensis* in LB Medium bei einer Inkubationstemperatur von 30°C kultiviert werden. Dem Medium wurde bei Bedarf 50 µg/ml Kanamycin zugefügt. Für die anaerobe Anzucht wurde M4 Medium (Tabelle 5) mit 50 mM Lactat als Elektronendonator und 50 mM Fumarat oder Eisencitrat als Elektronenakzeptor verwendet. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Ebenso wie bei *E. coli* konnte die Anzucht von *S. oneidensis* auf LB-Agar-Platten (Tabelle 3) je nach Stamm und Plasmid unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums und bei 30°C erfolgen.

Tab. 7: **Zusammensetzung des Carbonat-gepufferten Mediums.** Dieses Medium diente der anaeroben Kultivierung von *E. coli*, *S. oneidensis* und *M. formicicum*.

Komponente	Menge [g/l]
KH ₂ PO ₄	0,42
K ₂ HPO ₄	0,22
NH ₄ Cl	0,2
KCl	0,38
NaCl	0,36
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,21
NaHCO ₃	1,8
Na ₂ CO ₃	0,5
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,04
Hefeextrakt	1
Spurenelemente 100 x, siehe (Tab. 8)	10 ml
Selenit-Wolframat	1,0 ml
aufkochen und mit N ₂ /CO ₂ (80:20) begasen	

2.2.3 Anzucht von *M. formicicum*

M. formicicum ist ein strikt anaerobes Archaeum und konnte daher ausschließlich unter komplett anoxischen und reduzierenden Bedingungen kultiviert werden. Carbonat-gepuffertes Medium (Tabelle 7) wurde mit 3 g/l Natrium-Formiat versetzt, aufgeköcht, mit N₂/CO₂ begast und nach dem Autoklavieren mit 1 mM Cystein, 0,2 mM Natriumascorbat und 2,1 mM Na₂S versetzt. Der pH wurde auf 7,2 eingestellt. Zusätzlich wurde das Medium mit Vitaminen komplementiert (Tabelle 9). Die Flaschen wurden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Eine Kultivierung auf Agar-Platten war bei diesem Organismus nicht möglich.

Tab. 8: **100 x Konzentrat der Spurenelemente.** Diese wurden den Minimalmedien in verdünnter Form zugesetzt und dienen der Versorgung der Zellen mit Mikronährstoffen.

Komponente	Menge [mg/l]
Na ₂ EDTA	2500
MnSO ₄ x 1 H ₂ O	21,3
NaCl	58,4
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	107,4
CoCl ₂	119
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	30
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	5
H ₃ BO ₃	351
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	93,6
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	119
Na ₂ SeO ₄	28,3

Co-Kultivierung von *E. coli* und *M. formicicum*

Zur Co-Kultivierung von *E. coli* mit dem methanogenen Archaeum *M. formicicum* diente ebenfalls Carbonat-gepuffertes Medium (Tabelle 7). *M. formicicum* wurde zunächst in Medium mit 3 g/l Natrium-Formiat kultiviert, bis eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml erreicht war. *E. coli* Kulturen, welche in Carbonat-gepuffertem Medium mit 0,5% Glycerin und 50 mM DMSO bis zu einer OD von 0,4 gewachsen waren, wurden geerntet (6.000 g, 5 min, RT), das Zellpellet in Carbonat-gepuffertem Medium ohne Elektronenakzeptor und -donor resuspendiert und 2x unter anoxischen Bedingungen gewaschen (6.000 g, 5 min, RT). Anschließend wurden die *E. coli* Zellen mit einer finalen OD von 0,1 zu der Methanogenen-Kultur gegeben.

Tab. 9: **100 x Vitamin-Konzentrat**. Dieses Konzentrat wurde zu Medien hinzugefügt, in welchen *M. formicicum* kultiviert wurde.

Komponente	Menge [mg/l]
Biotin	2
Folsäure	2
Pyridoxin-HCl	10
Thiamin-HCl	5
Riboflavin	5
Nicotinsäure	5
DL-CaPantothenat	5
Vitamin B ₁₂	0,1
P-Aminobenzoesäure	5
Liponsäure	5

2.2.1 Stammkulturhaltung

Zur Konservierung von Bakterienklonen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurde eine 3 ml Übernachtkultur eines Klons mit 5 % (v/v) sterilem DMSO versetzt und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Um die Kulturen wieder zu reaktivieren, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas gefrorene Zellsuspension von der Oberfläche abgekratzt und auf einer Agarplatte (ggf. mit Antibiotikum) ausgestrichen. Die Platten wurden dann bei 30 oder 37°C über Nacht inkubiert. Von *M. formicicum* wurden ebenfalls wie oben beschrieben Gefrierkulturen angelegt. Jedoch wurde hier zur Reaktivierung der Zellen der Inhalt eines ganzen Kryoröhrchens unter aneroben Bedingungen in Flüssigmedium überführt und anschließend bei 37°C inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR) ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Hierbei kopieren hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Organismen spezifisch Nukleotidsequenzen und können so zur Vervielfältigung von Genen und DNA-Fragmenten für die Erstellung von Mutanten sowie zur Kontrolle von Klonierungen verwendet werden. Die Oligonukleotide, welche als Primer in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 13 dargestellt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (S1000, Biorad, München) durchgeführt.

In den PCR Reaktionen kamen zwei verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz: die Taq-Polymerase des MangoMix (Bioline, Luckenwalde) und die Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Biozym, Hessisch Oldendorf).

Die DNA-Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase ist mit einer Fehlerrate von $1,1 \times 10^{-4}$ Fehlern/bp verhältnismäßig mutationsanfällig, denn das Enzym besitzt keine Korrekturlese-Funktion. In den amplifizierten DNA-Fragmenten finden sich mit erhöhter Wahrscheinlichkeit Mutationen, die durch ungenaues Kopieren des Matrizenstranges entstehen. Daher kam diese Polymerase nur bei analytischen Kontrollen von Klonierungen oder genomischen Modifikationen zum Einsatz. Zur präparativen Amplifikation von Genen und DNA-Fragmenten wurde die Phusion-Polymerase verwendet. Diese verfügt mit $9,5 \times 10^{-7}$ Fehlern/bp über eine deutlich niedrigere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase, da sie eine 3'-5' Exonukleasefunktion besitzt, die falsch-gepaarte Basen erkennt und entfernt und somit die Genauigkeit der PCR-Reaktion erhöht.

Tab. 10: **Komponenten einer Mango-Mix-PCR Reaktion.** Dieser Mix diente für analytische Kontroll-PCRs. In der Tabelle ist die Zusammensetzung eines 16 µl-Ansatzes aufgeführt.

Komponente	Volumen [µl]
MangoMix (2x)	7,5
Primer forward (2 pmo/µl)	3,75
Primer reverse (2 pmo/µl)	3,75
Template DNA (0,1-0,5 µg/µl)	1

Ein Standard-Reaktionsansatz (16 µl) für eine analytische PCR-Reaktion mit dem MangoMix setzte sich wie in Tabelle 10 gezeigt zusammen. Ein typischer Reaktionsansatz für eine präparative PCR-Reaktion mit Phusion Polymerase hatte ein Volumen von 50 µl. Tabelle 11 fasst die benötigten Komponenten zusammen.

Tab. 11: **Komponenten einer Phusion-PCR Reaktion.** Dieser Ansatz wurde zur präparativen Amplifikation von Genen und DNA-Fragmenten verwendet. In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung eines 50 µl-Ansatzes aufgeführt.

Komponente	Volumen [µl]
5 x Phusion GC Puffer	10
10 mM dNTPs (je 200 µM)	1
forward Primer (2 pmol/µl)	12,5
reverse Primer (2 pmol/µl)	12,5
DMSO	3
Phusion DNA Polymerase	1
Template DNA (0,1-0,5 µg/µl)	1
ddH ₂ O	9

Das folgende Programm diente standardmäßig zur Amplifikation von DNA (Tabelle 12):

Tab. 12: **PCR-Programm einer Standard-PCR-Reaktion.** Die Schritt 2 – 4 wurden 30x wiederholt. Bei Mango-Mix-Reaktionen dienten 95°C und bei Phusion-Reaktionen 98°C zur Denaturierung der DNA.

Temperatur	Dauer	Funktion
95°C (98°C)	5 min	initiale Denaturierung
95°C (98°C)	30 sec	Denaturierung
50°C-65°C	30 sec	Anlagerung der Primer
72°C	30 sec/kb	Elongation
72°C	5 min	finale Elongation
12°C	unendlich	Ende

Tab. 13: Liste der Oligonukleotide. Diese Primer wurden in der Arbeit verwendet.

Nummer	Name und Sequenz
1	galK_for: CATGTGGGAGTTTATTCTTG
2	galK_rev: CGAAACTCCCGCACTGGC
3	galK_up_rev: CAAGAATAAACTCCACATG_GATGTATGTTCTAATAAAAAT
4	Scel_up_for: TAGGGATAACAGGGTAAT_TGCGGCGGTGATTCAAGTGAG
5	galK_down_for: CGAAACTCCCGCACTGGC_CCGGGAGGGTTCTCCCTCCC
6	Scel_down_rev: ATTACCCTGTTATCCCTA_CTGTGCGCCAGTTTTCCCC
7	pT7_Scel_for: CTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT_TAGGGATAACAGGGTAAT
8	pT7_Scel_rev: ACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTC_ATTACCCTGTTATCCCTA
9	gspH_for: CGTATTAAGCGGCCAATTTAT
10	gspN_rev: TTAAAGCCCCGGGATACGTC
11	gspH_up_rev: ATAAATTGGCCGCTTAATACG_GATGTATGTTCTAATAAAAAT
12	gspN_down_for: GACGTATCCCGGGGCTTTAA_CCGGGAGGGTTCTCCCTCCC
13	tet_up_rev: AACAAAAATTAGGAATTAATG_GATGTATGTTCTAATAAAAAT
14	galK_down2_for: CGAAACTCCCGCACTGGC_CGTATTAAGCGGCCAATTTAT
15	Scel_down2_rev: ATTACCCTGTTATCCCTA
16	tet_gspC_rev: CATTAATTCCTAATTTTTGTTGACTCTATCATTG_ATAGAGTTATTTACCACTCCCTA
17	tet_gspC_for: TCAGTGATAGAGAAAAGTGAA_ATGGATTATTAGATAAAGT
18	gspH_rev: GTTTCATCGAGCACTAACTC
19	gspH_down_for: GAGTTAGTGCTCGATGAAAC_CCGGGAGGGTTCTCCCTCCC
20	gyrA_for: CAAAATTCCTAACCTGCTGG
21	gyrA_rev: GGCTAATGCTTCAAGGATATG
22	rpoA_for: CACCAAAGAAGGCGTTCAG
23	rpoA_rev: CACCAAAGAAGGCGTTCAG
24	neg1_for: AACGAAGTGTTCGCCAAC
25	neg2_rev: TGCCGTCAATAAGTTCTGTC
26	gspC_for: CGCAAAGCTACAGGTATTC
27	gspC_rev: GGCTGGTGTAAACCAAACC
28	gspD_for: GAAGGCAACGCGTTAAAC
29	gspD_rev: GAGACTCAGATGCGTAAAC
30	gspE_for: CAAGTATCCAAGTCGAGG
31	gspE_rev: CCACCAGTTGTTTCTCATAG
32	gspF_for: GCGTTTACTCAAGTCACCG
33	gspF_rev: GCCACTAATCAAATTGTTTCAG
34	gspG_for: CAAATGAACAAAAAGCACAAAG
35	gspG_rev: GTTCCAGTTACCGATATCG
36	gspH_for: GCTTACCTTAATGGAGGTG
37	gspH_rev: CACGACTAATACGTCGAGC
38	gspI_for: GCTAGGGGAATGACGTTAC
39	gspI_rev: GTTCGTTTTGAGGACATAAC

Material und Methoden

40	gspJ_for: GTTTACCCTGCTCGAAATGC
41	gspJ_rev: CTTAGTTGCCTCGACCTTTC
42	gspK_for: CGATGAAGATACGTTGCG
43	gspK_rev: GGGTGAGCACATCCATTTTG
44	gspL_for: GTTATAGTGAGATGCAATTAG
45	gspL_rev: GCGTAATTTTTAGCCGTGAC
46	gspM_for: GATAATTTGCGGGCTTGGTG
47	gspM_rev: CGCTAGTTGGATACGTCTC
48	gspN_for: GTGTACTGGTTTATATCGTG
49	gspN_rev: CAACTCGATATTACCCAGTG
50	pBAD_STC_for: TTTGGGCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCC_ATG_AGCAAAAACTATTAAGTG
51	pBAD_STC_his_rev: CAGGCTGAAAATCTTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTT_GGCGCCGTGATGGTGATG_AATAGATATAAAAAACGCC
52	pAH95_Para_for: TCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCA_AAGAAACCAATTGTCCATATTG
53	STC_Para_rev: GCACACTTAATAGTTTTTGTCTCAT_GGTATGTATATCTCCTCTTAA
54	STC_for: ATGAGCAAAAACTATTAAGTGTGC
55	CP6_for: CATGTGGGAGTTTATTCTTG
56	CP6_rev: TTCTTACTCCGGATTTCG
57	pAH95_STC_rev: TCACTGATCAGTGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCGAGCTCGGTACCC_AATAGATATAAAAAACGCC
58	pMAL_SO2727_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAGCAAAAACTATTAAGTG
59	pMAL_SO2727_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_CAATAGATATAAAAAACGCCAG
60	pMAL_SO0970_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGTTCAACAAGAAAGATTCAAAA
61	pMAL_SO0970_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_ATTCAAGCTTGGCTCTCATG
62	pMAL_SO3300_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGATAATGATGAAATATATATATA
63	pMAL_SO3300_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_GCCTAGTTAGCTTTCGAATC
64	pMAL_SO3420_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAAAAATACTCCTAACTCT
65	pMAL_SO3420_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_GAATAAAAAAGCCTGCAGTAAT
66	pMAL_SO4485_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGACTAAACCAACCCACAC
67	pMAL_SO4485_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TTAATCATCCCAACGACCAAC
68	pMAL_SO1421_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGTTGAATACCAAATTATTACC
69	pMAL_SO1421_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_ACTAATCTAACCTTCGAGAT
70	pMAL_SO3980_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGC_AATGATGAAGAAGATGACAGG
71	pMAL_SO3980_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_CTAAATTGCGGGGGCTTTG
72	pMAL_SO4047_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAATCTTCTGCAATCTTATT
73	pMAL_SO4047_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_AATCACTCGCTTCATTTAC
74	pMAL_SO0970_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGTTCAACAAGAAAGATTCAAAA
75	pMAL_SO0970_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TCGTGCTATGTGAGCTTAAGG
76	pMAL_SO0264_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAAAAAGCTTTAGCCATGA
77	pMAL_SO0264_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_TTACTTAGCTTTAGACATAAACT
78	pMAL_SO2178_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGACAAAACTACCGCTAT
79	pMAL_SO2178_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTCTAG_GTTTATTCTCGGCCTTTGTTT

80	pMAL_SO4048_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAATAATAAAATTTAAACATTAG
81	pMAL_SO4048_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCCTGCAGGTCGACTCTAG_TTATTTTATATTCGCAAAGTAATT
82	pMAL_SO4666_for: CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACAGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAGCA_ATGAAAAAGTTAGCTCTTGCG
83	pMAL_SO4666_rev: GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCCTGCAGGTCGACTCTAG_TAAACCATCAGCAATATGATAA
84	down_gspA_for: ACCACCAATCATCCTAAGC
85	down_gspA_rev: TGGCGTGCTTTTATATCTGC
86	up_gspB_for: TCTTGATCGGCCACACCAC
87	up_gspB_rev: GCTAGACCTGTTAACGAGAA
88	pMQ150_up_gspB_for: TGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTG CATGCCTGCAGG_TCTTGATCGGCCACACCAC
89	pMQ150_down_gspA_rev: GACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATC_TGGCGTGCTTTTATATCTGC
90	ÜLup_down_for: TTCTCGTTAACAGGTCTAGC_ACCACCAATCATCCTAAGC

Kolonie-PCR

Mittels der Kolonie-PCR können Bakterienklone schnell und einfach analysiert und anschließend weiter verwendet werden (Gussow and Clackson, 1989). Hierbei wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, auf einer Agar-Platte ausgestrichen und die verbleibenden Zellen anschließend direkt im PCR-Reaktionsansatz resuspendiert. Die Masterplatte wurde bei 30°C oder 37°C inkubiert und diente der Sicherung des Klons. Kolonien wurden im Normalfall mit dem MangoMix getestet; bei besonders langen PCRs (über 3,5 kb) kam die Phusion Polymerase zum Einsatz.

Fusion von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe von aufeinander aufbauenden PCR-Reaktionen können zwei (oder mehr) DNA-Fragmente zusammengesetzt werden. In einer ersten Reaktion werden zunächst die Einzelfragmente mit Primern amplifiziert, welche einen 20 bp langen Bereich besitzen, der homolog zu der zu fusionierenden DNA ist. Nach der ersten PCR werden die Fragmente aufgereinigt und in einer weiteren Reaktion zusammen als Matrize zum Reaktionsansatz gegeben. Über die homologen Bereiche binden die beiden Fragmente aneinander und werden von der Polymerase als ein langes Fragment amplifiziert. Somit können zwei oder mehrere DNA-Stücke miteinander verbunden werden.

2.3.2 Reinigung und Isolation von DNA

Isolation von Plasmiden

Plasmide wurden mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) aufgereinigt. Dabei werden die Bakterienzellen alkalisch lysiert. Anschließend wird die chromosomale DNA durch schnelle Neutralisierung des pH-Wertes gefällt und abzentrifugiert, während die Plasmid-DNA stabil bleibt und anschließend an eine Silicasäule gebunden werden kann. Verunreinigungen werden durch Ethanol ausgewaschen und anschließend das Plasmid mit destilliertem Wasser von der Säule eluiert. Die Plasmid Miniprep wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Plasmide bei -20 °C gelagert.

DNA-Reinigung

Zur Reinigung von DNA aus PCR-, Restriktions- oder Ligationsreaktionen diente das DNA-Reinigungskit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega (Mannheim). Wie bei dem Miniprep-Kit wird auch hier die DNA an eine Silica-Säule gebunden und Verunreinigungen mit Ethanol ausgewaschen.

Die DNA wurde entweder direkt auf die Säule gegeben und gereinigt oder zunächst auf einem Agarosegel aufgetrennt. Im letzteren Fall wurden die betreffenden Banden aus den Gelen ausgeschnitten und die DNA nach Herstellerangaben aus den Gelstücken eluiert und aufgereinigt.

2.3.3 Reinigung und Isolation von RNA

RNA Extraktion und cDNA Synthese mittels Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

E. coli wurde anoxisch in M4 (Tabelle 5) mit Glycerin als Elektronendonator und DMSO als Elektronenakzeptor kultiviert. Die Kulturen wurden 24 Stunden unter Induktion der gewünschten Gene bei 30°C inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde mittels enzymatischer Zellyse gemäß dem Protokoll des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierzu wurden 1 ml Zellen der OD₆₀₀ 1 mit 2 ml RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die RNA zu stabilisieren. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 min, 6000 g), das Pellet vorsichtig getrocknet und anschließend in 200 µl TE Puffer mit Proteinase K und Lysozym (Tabelle 14) resuspendiert. Dann wurde die RNA gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Tab. 14: **Lösung zur Zellyse.** Alle Komponenten des Lyse-Puffers wurden in RNase-freiem Wasser mit 0,1% DEPC angesetzt.

Komponente	Menge [mg/ml]
Tris-HCl	3,63
EDTA	0,29
Lysozym	15
Proteinase K	1

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit 0,1 Volumen des 10x rDNase Puffers des DNA-free Kits (Life Technologies, Darmstadt) versetzt und nach Zugabe von 1-2 μl rDNase für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert, um Kontaminationen der Probe mit genomischer DNA zu eliminieren. Nach Zugabe von 0,1 Volumen des Inactivation Reagent, Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (90 sec, 14.000 g) wurde die in der oberen Phase enthaltene Gesamt-RNA in ein frisches Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Um falsch-positive Ergebnisse durch Verunreinigungen mit genomischer DNA in der RT-PCR ausschließen zu können, wurde die isolierte Gesamt-RNA als Matrize in einer Kontroll-PCR mit Mango-Mix eingesetzt. Gegebenenfalls wurde der DNA-Verdau wiederholt, bis keine genomische DNA mehr in den RNA Proben nachgewiesen werden konnte. Unter Verwendung der iScript Reverse Transcriptase (Biorad, München) wurde die RNA mit Random Hexamers gemäß den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben (Tabellen 15 und 16) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tab. 15: **Zusammensetzung einer RT-PCR-Reaktion.** Eine Reaktion zur Synthese von cDNA hatte ein Volumen von 20 μl .

Komponente	Volumen
5x iScript Reaktionspuffer	4 μl
iScript Reverse Transkriptase	1 μl
Nuclease-freies Wasser	x μl
RNA Matrize (100 fg bis 1 μg Gesamt-RNA)	x μ

Tab. 16: Reaktionsprotokoll einer RT-PCR.

Dauer	Temperatur
5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C
4°C	unendlich

RNA-Sequenzierung

Die Gesamt-RNA wurde isoliert und verbleibende DNA abverdaut wie im Kapitel „RNA Extraktion und cDNA Synthese mittels Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)“ beschrieben. Das Ambion MICROExpress bacterial mRNA enrichment Kit (Life Technologies, Darmstadt) diente der Abreinigung von rRNA und der Aufreinigung von mRNA. Strangspezifische cDNA Bibliotheken wurden von 50 ng mRNA gemäß dem TruSeq RNA Protokoll (Illumina, ohne Aufreinigung) mit Modifikationen in der Synthese des zweiten Stages erstellt (Parkhomchuk et al., 2009). Die cDNA Bibliotheken wurden mit Multiplex Primern erstellt, welche simultane Sequenzierung in einer einzelnen Line ermöglichen. Die Sequenzierung wurden auf einem HiSeq1000 Sequenzer mit SBS v3 Kits (Illumina) durchgeführt um paired-end reads von 2 x 50 Nukleotiden zu erhalten. Die Qualität der Reads wurde mit CASAVA v1.8.1 (Illumina) beurteilt. Die Ausbeute der Sequenzierung lag zwischen 17,7 und 53,2 Millionen Read-Paaren für jede Bibliothek und durchschnittlich 96,6% der Basen hatten eine Qualität von Q30 oder besser.

Analyse der RNA-Sequenzdaten

Die RNA-Sequenzdaten wurden gegen die Genom-Sequenz von *S. oneidensis* MR-1 (NCBI accession number NC_004347.2) und das Megaplasmid (NC_004349.1) mit Bowtie2 abgeglichen (Langmead and Salzberg, 2012). Die Genexpression wurde in Reads pro Gen berechnet, indem die Zahl der Reads die mit den annotierten Loci überlappt, bestimmt wurde (Dötsch et al., 2012). Mit dem R Package DESeq wurde die Genexpression normalisiert und statistische Tests mit Hilfe einer negativen Binominalverteilung durchgeführt (Anders and Huber, 2010).

2.3.5 Klonierungsmethoden

Restriktion

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die kurze DNA-Sequenzmotive erkennen und die DNA spezifisch schneiden. Es wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) verwendet. Für DNA-Restriktionen wurden Enzymkonzentrationen und Pufferbedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Die Inkubationszeit für Restriktionen betrug in der Regel zwei Stunden bei 37 °C.

isothermale in-vitro-Ligation

Bei der isothermalen in-vitro-Ligation nach Gibson (Gibson 2010) können in einem einzigen Reaktionsansatz überlappende DNA-Fragmente zusammengesetzt werden, beispielsweise zur Klonierung von Genen in einen Vektor. Hierbei benötigt man endständig homologe Bereiche von ca. 40 Nukleotiden zwischen Insert und Vektor, welche durch Primer eingefügt werden können. Eine 5' Exonuclease generiert kurze einzelsträngige Enden der zu ligierenden DNA-Fragmente. Die komplementären Enden können sich aneinander lagern und Lücken werden von einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase geschlossen. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich unabhängig von Restriktionsschnittstellen DNA-Fragment in einen Vektor zu klonieren.

Der Ligationsmastermix (Tabelle 17) wurde in 15 µl-Aliquots bei -20°C gelagert und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut. Die DNA-Fragmente wurden in äquimolarer Konzentration in einem Gesamtvolumen von 5 µl zum Reaktionsansatz gegeben und für 1,5 Stunden bei 50°C inkubiert. Anschließend konnte der Ligationsansatz direkt zur Transformation in kompetente Zellen verwendet werden.

Tab. 17: Zusammensetzung des Ligationsmastermix (250 µl). Dieser Puffer diente der isothermalen in vitro Ligation.

Komponente	Volumen [µl]
Tris/HCl pH = 7.5 (1 M)	125
MgCl ₂ (1 M)	12.5
dNTPs (0,01 M)	25
DTT (1 M)	12.5
NAD (0,1 M)	12.5
PEG-8000	62,5 mg
ddH ₂ O	62,5

CRIM Plasmid Klonierung

Diese Methode dient der stabilen Integration von Genen ins Genom von *E. coli* und wurde von Andreas Haldimann und Barry L. Wanner entwickelt (Haldimann and Wanner, 2001). Die Abkürzung CRIM steht für **Conditional-Replication, Integration and Modular plasmid**. Die Integration von Genen erfolgt dabei über Sequenz-spezifische Rekombination an einer von fünf verschiedenen Phagenerkennungsstellen im Genom von *E. coli*. Die Rekombination wird durch eine Integrase vermittelt, die von einem Helferplasmid aus exprimiert wird. Die Synthese der Integrase wird durch einen Temperaturanstieg (von 30°C auf 37°C) induziert; da die Replikation der Helferplasmide temperatursensitiv ist, werden diese durch die Temperaturerhöhung gleichzeitig aus den Zellen entfernt. Das CRIM-Plasmid pAH95 besitzt einen R6K-ori. Somit kann es in einem gewöhnlichen *E. coli*-Stamm nicht stabil repliziert werden und das gesamte Plasmid wird ins Genom aufgenommen. Auf eine erfolgreiche Integration wird über die erworbene Antibiotikumsresistenz selektioniert.

Zunächst wurde das zu integrierende Gen in das pAH95 Plasmid kloniert. Dann wurden die Zellen, in welche dieses Gen inseriert werden sollte, mit einem passenden Helferplasmid transformiert und auf selektiven Platten bei 30° C inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde das CRIM Plasmid co-transformiert und bei 37° C auf Agar-Platten mit reduzierter Antibiotikakonzentration auf stabile Integration ins Genom selektioniert.

galk-Selektion und „gene gorging“

Die *galk*-Selektion ist eine Methode zur Integration von Genen ins Genom von *E. coli*, die ohne einen Antibiotikaresistenz-basierten Selektionsmarker auskommt. Grundlage zur Verwendung der Methode bildet ein *E. coli* Stamm, in welchem das *galk* Gen im Genom deletiert wurde (Warming et

al., 2005). Zur Steigerung der Effizienz wurde die *galk*-Selektion zusätzlich mit der „gene gorging“ Methode kombiniert. Diese ist eine Weiterentwicklung der klassischen Rekombinationsmethode in *E. coli* nach Wanner (Herring et al., 2003). Hierbei werden die Gene der λ -Rekombinase von einem Helferplasmid (pACBSR) aus exprimiert, welche die homologe Rekombination unterstützen und damit die Integration linearer DNA ins Genom von *E. coli* ermöglichen. Außerdem trägt das Plasmid das Gen der Meganuklease *i-SceI*, welche eine spezifische, 20 Nukleotide lange DNA-Sequenz erkennt und schneidet, die natürlicherweise nur in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vorkommt. Wird ein DNA-Konstrukt in einem Vektor von zwei *i-SceI*-Schnittstellen flankiert, kann in der Zelle die Meganuclease induziert und somit die DNA in vivo linearisiert werden. Vorteil gegenüber der klassischen Wanner-Methode, bei der lineare DNA direkt transformiert wird, ist eine deutliche höhere Konzentration linearer DNA in der Zelle und somit eine verbesserte Effizienz.

Für die eigentliche *galk*-basierte Integration von Genen ins Genom von *E. coli* wurde zunächst ein Basis-Vektor erstellt. Zwei 500 bp lange Fragmente, die den Bereich ober- und unterhalb der zu verändernden Region flankieren („*upstream*“ bzw. „*downstream*“) wurden über eine Phusion-PCR amplifiziert und mittels PCR zum Konstrukt „*upstream-downstream*“ zusammengesetzt. Das *upstream-downstream*-Fragment wurde auf beiden Seiten von *i-SceI* Restriktionsschnittstellen flankiert und zwischen den beiden Fragmenten wurde eine Restriktionsschnittstelle eingefügt, die weder im Vektor noch in den Fragmenten vorkam. Das Fragment wurde in einen Vektor kloniert. Dieser Vektor konnte über die eingebrachte Schnittstelle zwischen den homologen Bereichen mittels der entsprechenden Endonuklease wieder geöffnet werden. Das *galk* Gen bzw. die in das Genom zu integrierende DNA-Sequenz (*sequence-of-interest*; SOI) wurden dann über isothermale in-vitro Ligation eingefügt (2.3.5 Klonierungsmethoden). Somit waren zwei neue Plasmide entstanden, die sich nur in dem Gen zwischen den flankierenden Bereichen unterschieden. Die eigentliche *galk* Selektion erfolgt dann in zwei Schritten:

Insertion von *galk*

Das Plasmid „*i-SceI-upstream-galk-downstream-i-SceI*“ wurde in kompetente Zellen eines *E. coli* Stamms transformiert, welcher eine Deletion im *galk* Gen trug und das Helferplasmid pACBSR enthielt. Eine Kolonie des transformierten Stammes wurde in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 10 μ l einer 20%-igen Arabinose-Lösung zugegeben, um die Meganuklease zu induzieren. Der Ansatz wurde bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach einer Stunde wurde 1 μ l Chloramphenicol-Lösung (30 mg/ml) zugegeben, um das Helferplasmid stabil in den Zellen zu halten. Danach wurden die Zellen für weitere 7 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 500 μ l sterilem M63

Medium (Tabelle 4) gewaschen und dann auf M63 Minimalmedium-Platten mit 2% Galaktose ausplattiert. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30° C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden auf MacConkey-Agar getestet (Tabelle 18). Eine Rotfärbung deutete dabei auf die Verwertung der Galaktose und somit eine erfolgreiche Insertion des *galk*-Gens ins Genom hin. Rote Kolonien wurden zusätzlich mittels PCR auf Integration des *galk* Gens an der gewünschten Position hin getestet.

Tab. 18: **Zusammensetzung des MacConkey-Agars.** Dieses Medium diente dem Nachweis der Galaktose-Verwertung. Dabei zeigen sich Galaktose-verwertende Bakterien als rote Kolonien. Die Kolonien zeigen einen trüben Hof, der durch Gallensäuren verursacht wird, die wegen der pH-Erniedrigung (Säurebildung aus Galaktose) ausfallen.

Komponente	Menge [g/l]
Pepton aus Gelatine	17
Fleisch- und Caseinpepton	3
Galactose	20
Natriumchlorid	5
Gallesalze (Cholat)	1,5
Neutralrot	0,03
Kristallviolett	0,001
Agar	20
pH-Wert auf 7,1 einstellen	

Austausch von *galk*

In einem weiteren Schritt wurde das Plasmid „*i-Scel-upstream-SOI-downstream-i-Scel*“ in kompetente Zellen des *E. coli* Stamms mit dem inserierten *galk* Gen und pACBSR transformiert. Mit den transformierten Zellen wurde ebenso wie im Kapitel „Insertion von *galk*“ verfahren. Die gewaschenen Zellen wurden auf M63 Minimalmedium-Platten mit 0,5% Glycerin und 2% 2-Deoxy-Galaktose (Tabelle 4) für 2-3 Tage bei 30° C inkubiert. Klone wurden mit PCR auf den erfolgreichen Austausch von *galk* hin getestet.

Klonierung eines Suizid-Vektors und markerlose Deletion von Genen in *S. oneidensis*

Mit Hilfe des Suizid-Vektors pMQ150 können in *S. oneidensis* markerlose Gendeletionen eingefügt werden. Das Plasmid wurde mittels der Restriktionsenzyme BamHI und Sall linearisiert und mit den Primern 500 bp lange homologe Bereiche amplifiziert, welche das zu deletierende Gen flankieren. Alle 3 Fragmente wurden mit der isothermalen Klonierungsmethode fusioniert (2.3.5 Klonierungsmethoden) und in den *E. coli* Stamm WM3064 transformiert. Dieser ist auxotroph für

DAP (2,6-Diaminopimelinsäure) und wächst nur unter Zugabe dieses Bausteins der Zellwandsynthese. Das pMQ150 Plasmid trägt den R6K ori, welcher nur stabil in Zellen repliziert werden kann, die das π Protein synthetisieren. Dieses Protein wird vom *pir*-Gen codiert. Der WM3064 Stamm trägt eine Kopie des *pir*-Gens; *S. oneidensis* jedoch nicht. Zusätzlich enthält das pMQ150 Plasmid das *sacB* Gen, welches für die Levansucrase codiert. Dieses Enzym katalysiert die (übermäßige) Synthese von Zuckerpolymeren, was zum Zelltod führt. Daher kann *sacB* zur Gegenselektion benutzt werden.

Für eine Konjugation des Suizid-Vektors in *S. oneidensis* wurden der WM3064 Stamm mit dem pMQ150 Plasmid bei 37°C in LB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/µl DAP und *S. oneidensis* in LB Medium bei 30°C kultiviert. Von beiden Kulturen wurde jeweils ca. 1 ml geerntet und zweimal in LB Medium gewaschen (2 min, 16000 g). Anschließend wurden die Zellen zusammengeführt, nochmals zentrifugiert und in 500 µl LB resuspendiert. Zur Konjugation wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf eine LB Agar Platte mit 100 µg/µl DAP getropft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 1 ml LB wieder von der Platte gewaschen, im Verhältnis von 1:5, 1:25 und 1:125 verdünnt und auf LB Platten mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Da kein DAP in den Platten zugegeben wurde, konnte der *E. coli* Stamm nicht wachsen. Nach 2 Tagen wurden *S. oneidensis* Einzelkolonien mit einer Pipettenspitze erst auf LB Platten mit Kanamycin, dann auf LB Platten mit 10% Saccharose und zum Schluss auf LB Platten ausgestrichen. Bei einer erfolgreichen Integration des pMQ150 Plasmids (erstes crossover) wuchsen die Zellen auf Kanamycin, nicht aber auf Saccharose. Die LB Platte diente dazu, sicherzustellen, dass sich genug Zellen an der Pipettenspitze befunden hatten.

Um das zweite crossover Ereignis (Entfernen des integrierten Plasmids aus dem Genom und dabei Deletion des Gens) zu ermöglichen, wurden die Kolonien, welche im ersten Versuchsteil das richtige Wachstumsmuster aufwiesen, ohne Antibiotikum in LB mit 10% Saccharose kultiviert und anschließend in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf LB Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze erst auf LB Platten mit 25 µg/ml Kanamycin und dann auf LB Platten mit 10% Saccharose ausgestrichen. Zellen, welche nicht auf Kanamycin, jedoch auf Saccharose wachsen konnten, hatten das integrierte Plasmid verloren und wurden per PCR auf die gewünschte Deletion untersucht. Das PCR-Produkt wurde zur Überprüfung sequenziert.

2.3.6 Verwendete Plasmide

In Tabelle 19 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tab. 19: Liste der Plasmide. Diese Vektoren wurden in der Arbeit verwendet.

Name	relevanter Genotyp	Referenz oder Quelle
pEC86	Chl ^R , <i>ccmABCDEFGH</i> , P _{tet}	(Thöny-Meyer et al., 1995)
pKD46	Amp ^R , [tL3], oriR101, P _{ara}	(Haldimann and Wanner, 2001)
pACBSR	Amp ^R , P _{ara} <i>I</i> -SceI, λ _{red}	(Herring et al., 2003)
pMQ150	Amp ^R , r6k, <i>ura3</i> , <i>sacB</i>	(Shanks et al., 2006)
pMAL-p2e	Amp ^R , MBP, P _{lac}	(Riggs, 2001)
pT7	Amp ^R , P _{lac}	Novagen, Darmstadt
pBAD	Kan ^R , P _{ara}	Invitrogen, Darmstadt
pAH121	Amp ^R , ori101, intP21	(Haldimann and Wanner, 2001)
pAH122	Amp ^R , ori101, intP21, λpR-xis	(Haldimann and Wanner, 2001)
pAH95	Kan ^R , oriR6K, attP21	(Haldimann and Wanner, 2001)
pMAQ150_ <i>gspBA</i>	Amp ^R , r6k, <i>ura3</i> , <i>sacB</i> , <i>gspBA</i>	diese Arbeit
pT7_ <i>galk1</i>	Amp ^R , P _{CP6} , <i>galk</i>	diese Arbeit
pT7_ <i>gspH-N</i>	Amp ^R , <i>gspH-gspN</i>	diese Arbeit
pT7_ <i>galk2</i>	Amp ^R , P _{CP6} , <i>galk</i>	diese Arbeit
pT7_ <i>gspC-H</i>	Amp ^R , P _{tet} , <i>gspC-gspH</i>	diese Arbeit
pMAL_ <i>ccpA</i>	Amp ^R , <i>ccpA</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ <i>stc</i>	Amp ^R , <i>stc</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ <i>ifcA</i>	Amp ^R , <i>ifcA</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ <i>soxA</i>	Amp ^R , <i>soxA</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ SO4048	Amp ^R , SO4048, P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ SO4666	Amp ^R , SO4666, P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ <i>fccA</i>	Amp ^R , <i>fccA</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ SO3300	Amp ^R , SO3300, P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ SO3420	Amp ^R , SO3420, P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ <i>scyA</i>	Amp ^R , <i>scyA</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ <i>nrfA</i>	Amp ^R , <i>nrfA</i> , P _{lac}	diese Arbeit
pMAL_ SO4485	Amp ^R , SO4485, P _{lac}	diese Arbeit
pBAD_ <i>stc</i> _{his}	Kan ^R , P _{ara} , <i>stc</i> _{his}	diese Arbeit
pBAD_ <i>mtrF</i> _{löslich}	Kan ^R , P _{ara} , <i>mtrF</i> _{löslich}	(Golitsch and Gescher, 2014)
pAH95_ <i>stc</i>	Kan ^R , oriR6K, attP21, P _{ara} , <i>stc</i>	diese Arbeit

2.3.7 Transformationstechniken

Elektrokompetente Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation wurde ein Klon des betreffenden Bakterienstamms über Nacht in einer 5 ml-Kultur salzarmen SOB-Mediums (Tabelle 20).

Tab. 20: **Zusammensetzung des SOB-Mediums.** Dieses Medium diente der Kultivierung von Zellen für die Elektroporation.

Komponente	Menge [g/l]
Trypton	20
Hefeextrakt	5
NaCl	0,58
KCl	0,19

Am nächsten Morgen wurde ein größeres Volumen SOB-Medium mit 1% der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 bebrütet. Weiteres Wachstum wurde durch eine 15- bis 30-minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 6000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in sterilem, kaltem, doppeltdestilliertem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese Waschschritte wurden mehrmals wiederholt, um möglichst viele Salze des Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden dann in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen und sofort zur Transformation verwendet. Um kompetente Zellen dauerhaft lagern zu können, wurde statt mit Wasser mit 10%iger Glycerinlösung gewaschen; die Zellen wurden anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80° C gelagert.

Transformation: Elektroporation

Die Transformation dient dem Einbringen von fremder DNA in Bakterienzellen. Im Falle der Elektroporation werden mit einem kurzen Stromimpuls Löcher in der Cytoplasmamembran erzeugt, durch welche die gewünschte DNA aufgenommen werden kann. Für die Elektrotransformation wurde DNA in Form von Plasmiden, PCR-Produkten oder Ligationsansätzen verwendet. 2-10 µl der DNA wurden zusammen mit 100 µl kompetenter Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (*E. coli*-Pulser, Biorad, München) mit 1,8 kV für 5 ms gepulst. Sofort danach wurden die Zellen in vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 21)

aufgenommen und für eine Stunde bei 30° C oder 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden für 12-15 Stunden bei 37 °C oder 15-20 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Tab. 21: **Zusammensetzung des SOC-Mediums.** Dieses Medium diente der Zell-Regeneration nach einer Transformation.

Komponente	Menge [ml/50 ml]
SOB	47,2
MgCl ₂ (1 M)	1
Glukose (10%)	1,8

2.3.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungsreaktion dienten dazu, die klonierten DNA-Abschnitte auf Korrektheit ihrer Nukleotid-Sequenz zu prüfen. Dazu wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert oder das zu sequenzierende Plasmid isoliert und dann zur Firma GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Sci-Ed Software (*CloneManager*, Cary, USA) mit der Originalsequenz verglichen.

2.4 Elektrophoretische Methoden

Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA ist negativ geladen und wird daher über das elektrische Feld zur Anode hin bewegt. Der Salzgehalt des Puffers und die Größe der Poren in der Gelmatrix können die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussen.

Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose (Invitrogen, Darmstadt) in 1x-TAE Puffer (Tabelle 22) aufgeköcht und nach einiger Abkühlzeit mit 0,6 µg/ml Midori Green (1:5 in TAE-Puffer verdünnt) versetzt.

Tab. 22: **Zusammensetzung des TAE-Puffers.** Dieser Puffer diente als Laufmittel bei der Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Menge [g/l]
Tris	4,85
EDTA	0,37
pH mit Acetat auf 8 einstellen	

Das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1x-TAE-Puffer gegeben. Dann wurde die zu analysierende DNA mit 6x Ladepuffer (Tabelle 23) versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Der Größenstandard 1000 bp-Gene-Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) diente zum Abschätzen der Fragmentgröße. Es wurde eine konstante Spannung von 120 V angelegt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die DNA mit Hilfe einer UV-Durchlicht-Lampe (IL 200M; Bachhofer, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert.

Tab.23: **Zusammensetzung des Ladepuffers.** Dieser Puffer diente dem Färben und Beschweren der DNA vor dem Auftragen in ein Agarosegel. Der Ansatz ist für 5 ml Ladepuffer (6 x konzentriert) berechnet.

Komponente	Menge [ml]
Glycerin	6 g
50x TAE-Puffer	1,2
Bromphenolblau 0,25%	1
dH ₂ O	2,8

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode um Proteine anhand ihres Molekulargewichts voneinander zu trennen. Proteine werden dazu mit einem Ladepuffer versetzt und durch Hitze denaturiert. Eine vollständige Denaturierung der Proteine wird durch die ebenfalls im Ladepuffer enthaltenen Komponenten β -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht. β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken im Protein, während SDS nichtkovalente Wechselwirkungen aufbricht. Die negativ geladenen SDS-Moleküle binden an die Proteine, überdecken deren Eigenladung weitestgehend und sorgen für eine stochastisch symmetrische Ladung von Proteinen verschiedener Länge.

Material und Methoden

Im diskontinuierlichen Gel überschichtet ein Sammelgel das Trenngel. Das Sammelgel hat einen pH-Wert von 6,8 und eine Acrylamidkonzentration von 4%; im Trenngel beträgt der pH-Wert 8,8 und die Acrylamidkonzentration liegt je nach Größe des zu trennenden Proteingemisches zwischen 8 und 20%. Der niedrige pH-Wert und die große Porenweite im Sammelgel sorgen für eine Fokussierung der Proteine, die dann als schmale Lauffront ins Trenngel eintreten und dort gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurden SDS-Gele von Expedeon (RunBlue SDS Gel 12% 12 well, Harston, UK) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde über die Bradfordmethode die Proteinkonzentration der Proben bestimmt und daraus das Probenvolumen berechnet. Aufgetragen wurden bis zu 40 µg Protein in einem Volumen von bis zu 35 µl. Die Proben wurden mit 4x Ladepuffer (Tabelle 24) versetzt und zum Denaturieren für 3-7 Minuten auf 95°C erhitzt.

Tab. 24: **Zusammensetzung des SDS-Ladepuffers.** Dieser Puffer diente dem Denaturieren, Färben und Beschweren der Proteine vor dem Auftragen in ein SDS-Gel. Der Ansatz ist für 10 ml Ladepuffer (4 x konzentriert) berechnet.

Komponente	Menge [g]
Glycerin	4
Triethanolamin	1,2
HCl (6 N)	0,93
SDS	0,4
Ficoll 400	0,4
Dinatrium EDTA	0,007
Brilliant Blue G250	0,0025
Phenolrot	0,0025
pH auf 7,7 einstellen	

Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und diese mit RunBlue SDS-Laufpuffer (Tabelle 25) gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Proben in die Taschen geladen. Als Größenvergleich dienten 6 µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas (St.Leon-Rot). Es wurde eine konstante Stromstärke von 110 mA angelegt und die Elektrophorese für ca. 30 Minuten durchgeführt.

Tab. 25: **Zusammensetzung des 20x RunBlue SDS-Laufpuffers.** Dieser Puffer diente als Laufmittel für SDS-Gele von Expedeon und wurde vor Gebrauch mit dH₂O verdünnt.

Komponente	Menge [g/l]
MOPS	126
Tris	145,2
SDS	20
Natriumhydrogensulfit	13
pH auf 8,2 einstellen	

2.5 Protein-biochemische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Hierbei wird die Eigenschaft genutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 von 465 nm auf 595 nm verschiebt, wenn der Farbstoff an Proteine gebunden ist. Bovines Serumalbumin (BSA) diente als Proteinstandard und wurde in Konzentrationen von 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 und 0,1 µg/ml in destilliertem Wasser gelöst. Von dem zu bestimmenden Protein wurden verschiedene Verdünnungen erstellt und in einer 96-well-Mikrotiterplatte NUNC Typ-F (VWR, Darmstadt) jeweils 20 µl der Verdünnungen sowie der BSA Verdünnungen mit 180 µl Bradfordlösung (Tabelle 26) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich) bei einer Wellenlänge von 595 nm ausgelesen. Mit Hilfe der Eichgerade wurde aus den doppeltbestimmten Absorptionswerten unter Berücksichtigung der Verdünnung die Proteinkonzentration der Ausgangslösung bestimmt.

Tab. 26: **Zusammensetzung der Bradford-Lösung.** Diese diente der Proteinbestimmung.

Komponente	Menge [ml/l]
Coomassie brilliant blue G250	0,1 g
Ethanol	50
konz. Phosphorsäure (85%)	100

2.5.2 Präparation der Membranfraktion

Um die Zellmembranen von löslichen Bestandteilen der Zelle zu separieren, wurden die Bakterien zunächst in einer sog. „French-Press“ aufgeschlossen. Dabei wird eine dichte Zellsuspension in einen hohlen Stahlzylinder gefüllt und großem Druck ausgesetzt. Durch langsames Öffnen eines Ventils fließen die Zellen durch eine Kanüle und werden in einem Behältnis gesammelt. Der plötzliche Druckabfall beim Austritt aus der Kanüle bewirkt ein Platzen der Zellen.

Die Zellen wurden bei 6000 g für 5 Minuten abzentrifugiert, in HEPES-Puffer (100 mM, pH 7) aufgenommen und mit einer geringen Menge DNase I versetzt, um zu verhindern, dass hochmolekulare DNA eine Weiterbehandlung erschwert. Die homogene Zellsuspension wurde anschließend in einer kleinen French-Press-Zelle (American Instruments Company, Maryland, USA) bei einem Druck von 8,7 MPa aufgeschlossen. Der so gewonnene Zellextrakt wurde anschließend für 5 Minuten bei 6000 g zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde danach für 60 Minuten bei 208.000 g in einer Ultrazentrifuge L7 (Beckmann, München) mit einem 70Ti-Festwinkelrotor bei 4 °C zentrifugiert. Das Membranpellet wurde vorsichtig auf Eis in HEPES-Puffer (100 mM, pH 7) resuspendiert.

2.5.3 Periplasma-Präparation

Der Periplasma-Aufschluss erfolgte mit Polymyxin B, welches mit den Lipopolysacchariden der äußeren Membran komplexiert. Die Komplexierung führt zur Zerstörung der äußeren Membran (Vaara et al., 1981) und das Periplasma kann von Membranen und Cytoplasma getrennt werden. Die Zellen wurden geerntet und in HEPES-Puffer (100 mM, pH 7) im Verhältnis 1:1,5 resuspendiert und anschließend mit einer Polymyxin B-Lösung versetzt (Endkonzentration 1 mg/ml Polymyxin B). Die Suspension wurde für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 45 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Periplasma befand sich im Überstand und wurde mit 10% Glycerin (v/v) versetzt und bei -20°C gelagert.

2.5.4 Färbung der Hämgruppen

Cytochrome dienen in der Zelle als Elektronencarrier und übertragen die Elektronen über Hämgruppen. Diese Cofaktoren können nach einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Dabei wird die Peroxidaseaktivität der Hämgruppen quantitativ durch Tetramethylbenzidine (TMB) nachgewiesen.

Die Gele wurden zunächst für 30 Minuten in ca. 10 ml 12,5%iger Trichloressigsäure (TCA)-Lösung fixiert und anschließend für weitere 30 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Für die Färbung wurden 10 mg 3,3,5,5-Tetramethylbenzdine (TMB) in 9 ml Wasser gelöst und frisch zum Gel gegeben, nachdem das Wasser entfernt wurde. Es wurden 1 ml Citratpuffer und 30 µl 30%ige H₂O₂-Lösung zugegeben und das Gel für kurze Zeit gefärbt (Tabelle 27).

Tab. 27: **Bestandteile der Hämgruppenfärbung.** Mit dieser Methode können Cytochrome quantitativ im SDS-Gel nachgewiesen werden.

Komponente	Zusammensetzung	Menge pro Gel
TCA-Lösung	12,5% (w/v) TCA in Wasser	ca. 10 ml
TMB-Lösung	10 mg TMB in 9 ml Aqua dest.	9 ml
Citrat Puffer	0,5 M Citrat, titriert mit 20% NaOH bis pH 6,4	1 ml
Wasserstoffperoxid	30% H ₂ O ₂	30 µl

2.5.5 Sekretion und Konzentration von Proteinen

Zur Isolation und Anreicherung des sekretierten, löslichen MtrF Proteins wurden die Zellen anoxisch kultiviert und die Induktion des löslichen MtrF Proteins mit 100 µM Arabinose induziert. Die Kulturen wurden für 24 Stunden bei 30°C inkubiert, anschließend die Zellen zwei Mal abzentrifugiert (je 5 Minuten, 6000 g), das Pellet verworfen und der Überstand gewonnen.

Im Zellüberstand wurden unter permanenter Kühlung durch Eis die darin vorhandenen, löslichen Proteine ankonzentriert. Dazu wurden Millipore-Zentrifugentubes mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa verwendet (Amicon Ultra-3K, Millipore, Darmstadt). Darin wurden 50 ml Zellüberstand in einer Zentrifuge bei 4500 g und 4°C auf ca. 500 µl ankonzentriert. Der konzentrierte Zellüberstand mit den darin enthaltenen löslichen Proteinen wurde mit 10% (w/v) Glycerin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.6 in vitro Membran-Assay

Dieser Test diente dazu, einen möglichen Elektronen-Transfer von CymA auf STC nachweisen zu können und beruht darauf, dass *E. coli* Membranen, welche CymA enthalten, in vitro mit Glycerin-3-Phosphat als Elektronendonator reduziert werden können (Gescher et al., 2008) und dass dieses membrangebundene CymA Elektronen auf bestimmte gereinigte periplasmatische c-Typ Cytochrome übertragen kann (Schütz et al., 2009). Für den Assay wurde Stamm JG11, welcher das Gen für CymA im Genom trägt, anaerob in M9 Medium kultiviert (Tabelle 6) und die *cymA*-Expression entweder mit 0,43 µM Anhydrotetracyclin induziert oder für Kontrollexperimente ohne CymA nicht induziert. Die

Membranfraktion wurde unter anoxischen Bedingungen isoliert (2.5.2 Präparation der Membranfraktion) und in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit HEPES-Puffer (100 mM, pH 7,5) und 10 mM Glycerin-3-Phosphat in eine anaerobe Küvette gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 nmol gereinigtem STC gestartet und die Reduktion des Cytochroms bei einer Wellenlänge von 552 nm in einem Spektrophotometer gemessen (Cary 50, Agilent, Böblingen). Da nur STC in einer messbaren Konzentration in die Küvette gegeben wurde und die Zugabe der Membran in katalytischen Mengen erfolgte, wurde ausschließlich die Reduktion des periplasmatischen Cytochroms detektiert, ohne Interferenz durch eine Absorption von CymA. Die Integrität der Membranen wurde mit Hilfe eines NADH-Dehydrogenase-Aktivitätstest überprüft und sichergestellt (Osborne 1972). Hierzu wurden 0,15 mg Membranprotein zu 100 µM NADH in HEPES-Puffer (100 mM, pH 7,5) gegeben und die Oxidation von NADH bei 365 nm im Cary 50 Spektrophotometer gemessen.

2.6 Analytik

2.6.1 Chromatographische Methoden

MudPIT Analyse

Tryptischer Verdau: 30 µg der periplasmatischen Fraktion wurden 1:2 mit 8 M Urea in 100 mM Tris-HCl (pH 8,7) verdünnt, mit 5 mM DTT für 20 Minuten bei 55°C reduziert und mit 25 mM Iodoacetamid für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln carboxyamidomethyliert. Anschließend erfolgte ein Verdau mit 0,5 µg Lysyl-Endopeptidase (Wako Chemicals, Neuss) für 3 Stunden bei 37°C. Dann wurde der Verdau mit 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ (pH 8,7) auf eine Urea-Konzentration von 1 M verdünnt und mit 0,5 µg Trypsin (Wako Chemicals, Neuss) für 5 Stunden bei 37°C verdaut. Der pH der entstandenen Peptid-Mischung wurde mit Ameisensäure auf ungefähr pH 3 eingestellt und die Peptide mit einer C18 Umkehrphase-Säule extrahiert. Anschließend wurden die Peptide lyophilisiert, in 10 µl 5%igem Acetonitril aufgenommen, mit 0,5 µl Ameisensäure angesäuert und auf eine MudPIT Säule gegeben.

LC-MS/MS: Es erfolgte eine automatisierte, 34-stündige MudPIT Analyse in 17 Schritten (Washburn et al., 2001), (Wolters et al., 2001). Hierzu wurde eine quaternäre HPLC Pumpe an ein lineares Ionenfallen-Massenspektrometer (LTQ-FT-ICR, Thermo Scientific) mit einer Nanoelektrospray-Quelle gekoppelt. Eine Silica-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit 8 cm

Umkehrphase-Säulenmaterial (5 µm Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, Waldbronn) und 8 cm Kationen-Austauschharz (5 µm Partisphere (SCX), Phenomenex, Aschaffenburg) gepackt und die Proben auf die Säulen appliziert. In der MS Analyse wurde ein Survey Scan (400-1800 m/z), gefolgt von einem FT-SIM-Scan und einer CID Fragmentierung mit 35% normalisierter Kollisionsenergie kontinuierlich wiederholt. Einfach geladene Vorläufer-Ionen wurden verworfen. Die Peak Liste wurde mit extract_msn (BioWorks-Package, Thermo Scientific, Schwerte) erstellt und MS/MS Spektren mit Hilfe von Open Mass Spectrometry Search Algorithm [OMSSA, version 2.1] gegen die *S. oneidensis* MR-1 protein database (Juli 2007) durchsucht. Peptid Treffer wurden als signifikant angesehen, wenn Vorläufer- und Produkt-Ionenmasse jeweils innerhalb von 5 ppm und 0,5 kDa und der E-Wert unter 0,01 lagen.

Affinitätschromatographie zur Reinigung von Proteinen mit *his*-Tag

Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren zur Isolation eines Analyten aus einer Lösung verschiedener Stoffe. Zur Reinigung eines Proteins aus einem Gemisch kann eine kurze Aminosäuresequenz an das Protein angefügt werden, welche als „Anker“ zur Aufreinigung dient und an eine Säulenmatrix gebunden und wieder gelöst werden kann. Ein Beispiel eines solchen Affinitätsankers ist der *his*-Tag. Dieser ist eine Folge von mindestens sechs Histidinen, deren Gensequenz in die Gensequenz des zu analysierenden Proteins angehängt wird, wodurch man ein rekombinantes Protein erhält. Meist dient der *his*-Tag zur Reinigung von Proteinen über eine Affinitätssäule; er kann jedoch auch zum Nachweis von Proteinen dienen, für die kein passender Antikörper vorhanden ist. Die Säulenmatrix besteht im Falle des *his*-Tags aus einem Metallionenchelate, wie zum Beispiel Ni^{2+} -NTA.

Zur Reinigung von Proteinen wurde eine *his*-trap-Affinitäts-Säule (GE Healthcare, Solingen) an eine FPLC angeschlossen und mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer equilibriert (Tabelle 28). Dabei wird der Puffer, in dem die Säule gelagert wird, ausgewaschen und gegen den Waschpuffer ersetzt.

Tab. 28: **Zusammensetzung des Waschpuffers.** Dieser diente dem Equilibrieren der Säule und dem Entfernen von unspezifisch gebundenen Proteinen von der Säulenmatrix.

Komponente	Menge [g/l]
Na ₃ PO ₄	3,28
NaCl	29,22
Imidazol	1,36
pH auf 7,4 einstellen	

Anschließend wurde die Proteinfraction auf die Säule geladen und die Säule mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, um Proteine, die nicht oder unspezifisch gebunden haben, von der Säule zu entfernen. Der Waschpuffer ist eine Phosphat-gepufferte Lösung mit einem relativ hohen Salzgehalt und einer geringen Konzentration Imidazol. Imidazol ähnelt dem Histidin strukturell und konkurriert somit mit den Histidinen des Proteins um die divalenten Metallkationen. In geringen Konzentrationen können somit unspezifische Bindungen verhindert oder gelöst werden. Im nächsten Schritt wurde STC_{his} mit 10 Säulenvolumen Elutionspuffer (Tabelle 29) von der Säule eluiert. Der Elutionspuffer enthält 500 mM Imidazol. Diese hohe Konzentration sorgt dafür, dass auch *his*-getagte Proteine abgewaschen werden. Die Fraktionen wurden gesammelt und nach Zugabe von 10% (w/v) Glycerin bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. In einem letzten Schritt wurde die Säule wieder mit Waschpuffer gespült und anschließend mit 20% Ethanol gewaschen und gelagert.

Tab. 29: **Zusammensetzung des Elutionspuffers.** Dieser diente dazu stark gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu lösen.

Komponente	Menge [g/l]
Na ₃ PO ₄	3,28
NaCl	29,22
Imidazol	34,1
pH auf 7,4 einstellen	

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die HPLC ist eine Analytische Methode mit der man Substanzen trennen und über Standards identifizieren und quantifizieren kann. Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel durch eine Trennsäule gepumpt wird, welche eine stationäre Phase enthält. Verschiedene Moleküle in der zu untersuchenden Substanz wechselwirken unterschiedlich stark mit der stationären Phase und erscheinen daher zu verschiedenen Zeiten (den Retentionszeiten) am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können.

In dieser Arbeit wurde mit einem DAD (Diode-Array-Detektor) gearbeitet, der bei geeigneter Säulenwahl eine Analyse organischer Säuren erlaubt. Als Säule diente eine 300 x 7,8 mm Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad, München), welche mit der Hitachi LaCrom Elite HPLC Anlage betrieben wurde. Als Flussmittel diente 5 mM H₂SO₄ mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. 100 µl der filtrierten Proben wurden mit 10 µl 0,5 M H₂SO₄ versetzt und davon 90 µl auf die Säule injiziert. Die Detektion der organischen Säuren erfolgte bei 220 nm mit einem HITACHI Diode Array UV Detector L 2455; zur Auswertung des Chromatogramms diente die EZChrom Elite Software. Als Standards wurden verschiedene Konzentrationen (0-10 mM) von Succinat, Lactat und Acetat verwendet.

2.6.2 Enzymatische Analysemethoden

Ethanolbestimmung

Der Ethanolgehalt der Proben wurde mittels eines enzymatischen Tests bestimmt, der darauf beruht, dass Ethanol in Gegenwart der Alkohol-Dehydrogenase und NAD⁺ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) zu Acetaldehyd oxidiert wird und dabei stöchiometrisch NADH gebildet wird. Da das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite von Ethanol und NAD liegt, wird Acetaldehyd mit Hilfe der Acetaldehyd-Dehydrogenase zu Acetat oxidiert und gleichzeitig der Aldehyd mit Semicarbazid abgefangen. Dabei kann die Zunahme des NADH photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und mittels einer Eichgeraden der Ethanolgehalt der Probe bestimmt werden.

In einer Mikrotiterplatte wurden 20 µl Probe (bzw. verschiedene Verdünnungen derselben) mit 180 µl Reaktionsgemisch (Tabelle 30) versetzt und bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurden 20 µl verschiedener Ethanolkonzentrationen (0-10 mM) als Eichreihe ebenfalls mit 180 µl Puffer inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm in einem Plattenlesegeräte (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich) gemessen und mit Hilfe der Eichgeraden aus den Absorptionswerten unter Berücksichtigung der Verdünnung die Ethanolkonzentration der Ausgangslösung bestimmt.

Tab. 30: **Bestandteile der Ethanolbestimmung.** Dargestellt ist die Zusammensetzung des Puffers und des Reaktionsgemisches zur Messung von 96 Proben in einer Mikrotiterplatte.

	Komponente	Menge [g/l]
Puffer	Natrium-Pyrophosphat	20
	Semicarbazid	5,6
	Glycin	3,3
	pH auf 8,7	
Reaktionsgemisch	Komponente	Menge [ml]
(Menge für 1 Mikrotiterplatte)	Puffer	20
	NAD (15 mM)	2
	Alkohol-Dehydrogenase (50 mg/ml)	0,04
	Aldehyd-Dehydrogenase (40 mg/ml)	0,04

Formiatbestimmung

Die Bestimmung von Formiat erfolgt nach gleichem Prinzip wie die Ethanolbestimmung. Die Formiat-Dehydrogenase oxidiert Formiat zu Hydrogencarbonat. Dabei wird NAD quantitativ zu NADH reduziert, was photometrisch gemessen werden kann.

In einer Mikrotiterplatte wurden 20 µl Probe (bzw. verschiedene Verdünnungen derselben) mit 180 µl Reaktionsgemisch (Tabelle 31) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Formiatkonzentration der Probe wurde eine Eichreihe von 0-2 mM angesetzt. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm in einem Plattenlesegeräte (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich) bestimmt und mit Hilfe der Eichgeraden aus den Absorptionswerten unter Berücksichtigung der Verdünnung die Formiatkonzentration der Ausgangslösung bestimmt.

Tab. 31: **Bestandteile der Formiatbestimmung.** Dargestellt ist die Zusammensetzung der Pufferkomponenten A und B und des Reaktionsgemisches zur Messung von 96 Proben in einer Mikrotiterplatte.

	Komponente	Menge [g/l]
Puffer A	KH_2PO_4	20
Puffer B	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	34,2
	14 ml Puffer A + 86 ml Puffer B; darin 20 mg Pyrazol lösen	
Reaktionsgemisch	Komponente	Menge [ml]
Menge für 1 Mikrotiterplatte	Puffer (zusammengesetzt aus A und B)	7,5
	NAD (42 mM)	375
	ddH ₂ O	11,25
	Formiat-Dehydrogenase (80 U/ml)	0,075

Glukosebestimmung

Die Bestimmung des Glukosegehalts der Proben erfolgte ebenfalls über eine Messung der NADPH - Zunahme. Glukose wird von der Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses wird mit Hilfe der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter Reduktion von NADP zu NADPH zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert.

20 µl Probe in verschiedenen Verdünnungen und eine Eichreihe von 0-2 mM wurden in einer Mikrotiterplatte mit 180 µl Puffer (Tabelle 32) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und mit Hilfe der Eichgeraden aus den Absorptionswerten unter Berücksichtigung der Verdünnung die Glukosekonzentration der Ausgangslösung bestimmt.

Tab. 32: **Bestandteile der Glukosebestimmung.** Dargestellt ist die Zusammensetzung des Puffers und des Reaktionsgemisches zur Messung von 96 Proben in einer Mikrotiterplatte.

	Komponente	Menge [g/50 ml]
Puffer	Triethanolamin	7
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,13
	Glycin	3,3
	NADP	0,05
	ATP-Na ₂ H ₂	0,25
Reaktionsgemisch	Komponente	Menge [ml]
Menge für 1 Mikrotiterplatte	Puffer	7,7
	ddH ₂ O	13,2
	Enzymmix aus Hexokinase (1,8 kU/l	44
	u. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,9 kU/l)	

Glycerinbestimmung

Zur Messung des Glyceringehalts der Proben diente ein Kit zur quantitativen Messung von Glycerin in wässrigen Proben (Free Glycerol Reagent, Sigma-Aldrich). Glycerin wird hierbei katalysiert durch die Glycerin-Kinase und mittels ATP (Adenosin-5'-Triphosphat) phosphoryliert und es entstehen Glycerin-1-Phosphat und ADP (Adenosin-5'-Diphosphat). Glycerin-1-Phosphat wird dann von der Glycerin-Phosphat-Oxidase zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oxidiert. Eine Peroxidase katalysiert die Kopplung von H₂O₂ mit 4-Aminoantipyrin und Natrium-*N*-Ethyl-*N*-(3-Sulfopropyl)-*m*-Anisidin zu einem Quinonimin-Farbstoff, welcher bei einer Wellenlänge von 540 nm ein Absorptionsmaximum hat. Die Zunahme der Absorption bei 540 nm ist direkt proportional zur Glycerinkonzentration in der Probe.

20 µl der Probe wurden mit 180 µl der Assay-Lösung für 15 Minuten bei RT in einer Mikrotiterplatte inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 540 nm die Absorption gemessen. Mit Hilfe einer parallel erstellten Eichreihe von 0-2 mM Glycerin wurde der Glyceringehalt der Proben ermittelt.

2.6.3 Optische Analyse-Methoden

Optische Kohärenz-Tomografie (OCT)

Die optische Kohärenztomografie ist ein bildgebendes Messverfahren aus der medizinischen Diagnostik im Bereich der Augenheilkunde und ermöglicht die Darstellung eines Tiefenmodells. (Fujimoto et al., 1995) In dieser Arbeit diente das Gerät zur Quantifizierung der TisB-induzierten Biofilmbildung in *S. oneidensis*. Das OCT-Gerät verwendet Licht mit niedrigerer Kohärenzlänge und misst darüber die Entfernung zwischen Quelle und reflektierendem Objekt. Das von einer Lichtquelle ausgehende Licht wird in zwei Strahlen geteilt. Ein Strahl trifft auf die Probe, der andere Strahl auf einen Referenzspiegel. Das reflektierte Licht von Probe und Referenzspiegel trifft auf den Detektor, welcher das Interferenzmuster detektiert. Das OCT-Gerät hat eine maximale Abbildungstiefe in Luft von 2,853 mm und in Wasser von 2,14 mm. Einzelne Bakterien kann es daher nicht detektieren; jedoch Zell-Aggregate ab einer Partikelgröße von ca. 0,1 mm. Das verwendete OCT-Gerät war ein Spectral Domain OCT, Typ GANYMEDE von der Thorlabs GmbH (Dachau).

Für die OCT-Messung wurde *S. oneidensis* MR-1 in LB-Luria Medium (Tabelle 33) kultiviert, geerntet und die OD mit doppelt-konzentriertem LB-Luria-Medium auf 0,2 eingestellt.

Tab. 33: **Zusammensetzung des LB-Luria-Mediums.** Dieses salzreduzierte Medium diente der Anzucht von *S. oneidensis* für die OCT-Messungen.

Komponente	Menge [g/l]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	0,5

100 µl der Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und TisB in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. TisB wurde in 50% Ethanol gelöst. Dabei erfolgt eine Verdünnung um den Faktor 2. Start-OD der Proben war somit 0,1 und TisB wurde in den finalen Konzentrationen von 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 und 256 µg/ml zugegeben. Die Ansätze erfolgten in Triplikaten und als Kontrolle wurden äquivalente Mengen einer 50%igen Ethanol-Lösung ohne TisB zugegeben. Die Platten wurden anaerob für 4 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert (150 rpm, Enzysscreen „System Duetz“) und anschließend die Biofilmbildung direkt in der Mikrotiterplatte mit dem OCT-Gerät gemessen.

Mit dem Programm Fiji wurden die Daten des OCT in binäre Datensätze umgewandelt und daraus die prozentuale Bedeckung der Wells mit Biofilm berechnet.

2.6.4 in vivo Methoden mit ganzen Zellen

Zellsuspensionsassay für die Elektronenshuttle-basierte Cytochrom-Charakterisierung

Dieser neue entwickelte Assay basiert auf der kontinuierlichen Messung der Reduktion einer Shuttle-Komponente in einer Zellsuspension und wurde entwickelt, um periplasmatische Elektronentransferreaktionen in *E. coli* messen und vergleichen zu können. Die Zellen wurden dazu in M4 Medium (Tabelle 5) mit Glycerin als Elektronendonator und DMSO als Elektronenakzeptor kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,3 geerntet (6.000 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in anoxischem M4 Medium ohne Elektronenakzeptor und -donor resuspendiert und 2x unter anoxischen Bedingungen gewaschen (6.000 g, 5 min, RT). Die OD₆₀₀ wurde auf 1 eingestellt und 100 µl dieser Zellsuspension in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Der Zellsuspensionsassay wurde in einem Plattenlesegerät mit Dispenser durchgeführt (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich). Mit Hilfe des Dispensers wurden 100 µl einer 100 mM Lösung des Shuttles zu den Zellen gegeben und sofort nach Zugabe die Reduktion für 10-15 Minuten gemessen. Die Reduktion der unterschiedlichen Shuttle-Komponenten wurde bei verschiedenen Wellenlängen gemessen (Roller, 1984) und Tabelle 34). Mit Hilfe des millimolaren Absorptionskoeffizienten wurde die Reduktionsrate bestimmt.

Abb. 34: **Verschiedene Shuttle-Komponenten im Vergleich.** Dargestellt sind die Redoxpotentiale der Farbstoffe und die Wellenlängen, bei welchen der Assay durchgeführt wurde.

Komponente	Redoxpotential [mV]	λ _{max} [nm]
Benzylviologen	-359	399
Safranin O	-289	512
Resorufin	-51	572
Neu-Methylenblau	-21	590
Methylenblau	11	660

2.7 Elektrochemische Methoden

2.7.1 Zyklische Voltametrie

Die zyklische Voltametrie ist ein analytisches Verfahren zur Bestimmung von Redox-Prozessen in einer wässrigen Lösung. An die Arbeitselektrode in einer Lösung werden im Wechsel ein ansteigendes und ein abfallendes Potential angelegt und die Stromstärke wird in Abhängigkeit zur Spannung aufgezeichnet. Wenn sich in der Lösung ein elektroaktiver Stoff befindet, wird dieser bei einem charakteristischen Potential reduziert oder oxidiert.

Zur Untersuchung von Methylenblau mit Hilfe der zyklischen Voltametrie wurde eine wässrige Lösung mit 100 mM Methylenblau versetzt und in einen Reaktor gegeben, der eine Kohlenstoffelektrode sowie eine Referenzelektrode enthält. Für 10 Zyklen wurde eine Potentialspanne zwischen -0,6 und +1,1 V mit einer Sweep Rate von 10 mV/sec abgefahren und dabei der Strom gemessen.

2.7.2 Mikrobielle Brennstoffzellen (MFC)

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene MFC-Aufbauten verwendet; ein Dreikammeraufbau, bei dem Referenz-, Arbeits- und Gegenelektrode durch semipermeable Membranen voneinander getrennt sind und ein Einkammeraufbau, in welchem die Gegenelektrode durch eine poröse Glasfritte vom umgebenden Medium getrennt ist.

In der Dreikammer-MFC diente jeweils ein 2,25 cm² großes Graphit-Weichfilz (SIGRATHERM; SGL Group, Wiesbaden) mit einer Dicke von 1 mm als Arbeits- und Gegenelektrode. Das Elektrodenmaterial wurde mit Isopropanol benetzt und direkt danach gründlich mit dH₂O gespült. So konnte eine ausreichende Benetzung des Filz-Materials sichergestellt werden. Anschließend wurden die Elektroden separat vom restlichen MFC-Aufbau in etwas dH₂O autoklaviert. Die Einzelteile der MFC wurden vor dem Autoklavieren gereinigt und als Dreikammeraufbau bestehend aus Anodenkammer (Arbeitselektrode), Kathodenkammer (Gegenelektrode) und Referenzelektrodenkammer zusammengesetzt. Die einzelnen Kompartimente wurden mit Hilfe einer semipermeablen Fumion F950 Membran (Quintech, Göttingen) voneinander separiert. Die fertig zusammengesetzte MFC wurde in jeder Kammer mit je 5 ml dH₂O befüllt und daraufhin autoklaviert. Nach Autoklavieren wurden die Elektroden mit einem leitfähigen Streckmetallgitter aus platinisiertem Titan zwischen zwei Silikondichtungen am Boden des Aufbaus so fixiert, dass die Kabel des Potentiostaten an den herausstehenden Enden der Gitter befestigt werden konnten. Die Elektroden wurden über das Titangitter mit dem Potentiostaten (WaveNow Portable USB Potentiostat, Pine Research Instrumentation, USA) verbunden. Dieser kann ein konstantes Potential vorgeben und den

geflossenen Strom messen. Eine Kalomel-Standard-Elektrode (Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) diente als Referenzelektrode und wurde ebenfalls mit dem Potentiostaten verbunden.

Das Wasser wurde unter sterilen Bedingungen aus den Kammern entnommen. Die Anodenkammer wurde mit 22,5 ml Carbonat-gepuffertem Medium (Tabelle 7) befüllt, das zuvor mit einer Kohlenstoffquelle und bei Bedarf mit 0,43 μM AHT, 14,8 μM Thiamin, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol, 1 mM Arabinose und 10 μM Methylenblau versetzt worden war. Als Kohlenstoffquelle dienten 20 mM Glukose oder 40 mM Glycerin. In die Kathoden- und die Referenz-Elektrodenkammer wurden 25 ml bzw. 4 ml Carbonat-gepuffertes Medium ohne Elektronendonator und -akzeptor gegeben. Anschließend wurde die MFC in einem Inkubator (Incudrive H, schuett-biotec GmbH, Göttingen) bei 30°C mit dem Potentiostaten verbunden. Um in der Anodenkammer anaerobe Bedingungen zu erzeugen, wurde diese permanent mit einer Gasmischung aus N_2/CO_2 (80:20) steril begast. Die Kathodenkammer wurde in gleicher Weise mit Druckluft begast, um einen nicht-limitierenden Elektronenabfluss zu gewährleisten. 30 Minuten nach Start der Begasung wurden die MFCs mit *E. coli*-Zellen beimpft. So konnten konstante Startbedingungen für die verschiedenen Experimente gewährleistet werden.

Die *E. coli* Zellen wurden in Carbonat-gepuffertem Medium (Tabelle 7) mit 20 mM Glukose oder 40 mM Glycerin und 50 mM MDSO vorkultiviert und bei einer OD von 0,4 geerntet (6.000 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in Carbonat-gepuffertem Medium ohne Elektronenakzeptor und -donor resuspendiert und 2x unter anoxischen Bedingungen gewaschen (6.000 g, 5 min, RT). Anschließend wurde die OD auf 4 eingestellt und 2,5 ml dieser Zellsuspension in die Brennstoffzellen gegeben. Nach erfolgter Beimpfung wurde der Potentiostat mit dem zuvor programmierten Protokoll in Betrieb genommen. Das Protokoll wurde mit der Aftermath Scientific Data Organiser Software (Pine Instrument Company, USA) erstellt und gab ein konstantes Potential von -44 mV gegen die Kalomel-Standard-Elektrode (SCE) vor. Dies entspricht einem Potential von +200 mV gegen eine Standard-Wasserstoff-Elektrode (SHE). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden steril Proben aus der Anodenkammer entnommen, abzentrifugiert, durch einen 0,2 μm Filter gegeben und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Die Einkammer-MFC diente der Co-Kultivierung von *E. coli* mit *M. formicicum*, da hier eine Detektion von Methan und CO_2 möglich war. Die MFC bestand aus einem 2-Liter Reaktor aus Glas, welcher gasdicht abgeschlossen werden konnte (Abbildung 5). Somit erübrigte sich eine Begasung mit einer Gasmischung aus N_2/CO_2 um anoxische Bedingungen zu erreichen und entstehende Gase konnten detektiert werden. Hierzu diente das in-situ-Detektionssystem der Firma BlueSens (Herten), welches

die parallele Kontrolle von CH₄ und CO₂ erlaubt. Vor dem Autoklavieren wurde ein 16 cm² großes Graphitfilz als Anodenmaterial in den Reaktor eingebracht. Als Gegenelektrode diente ein Platinnetz, welches in einer porösen Glasfritte in das Medium eingehängt wurde und somit später in Kontakt mit dem Elektrolyten, nicht aber mit den Zellen kommen konnte. Der Reaktor wurde vollständig mit dH₂O gefüllt und autoklaviert.

M. formicicum wurde in Carbonat-gepuffertem Medium (Tabelle 7) mit 3 g/l Natrium-Formiat kultiviert bis eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml erreicht war. Parallel wurden die *E. coli* Zellen ebenfalls in Carbonat-gepuffertem Medium mit Glycerin und DMSO vorgezogen (Tabelle 7). Die *E. coli* Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,4 geerntet (6.000 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in Carbonat-gepuffertem Medium ohne Elektronenakzeptor und -donor resuspendiert, 2x unter anoxischen Bedingungen gewaschen (6.000 g, 5 min, RT) und anschließend mit einer finalen OD₆₀₀ von 0,1 zu der Methanogenen-Kultur gegeben. Die Zellsuspension wurde mit 30 mM Glycerin, 0,43 µM AHT, 1 mM Arabinose und 10 µM Methylenblau komplementiert und unter anoxischen Bedingungen zusammen mit einem sterilen Magnetrührstab in den 2-Liter Reaktor überführt. Der Reaktor wurde mit einer Kalomel-Referenzelektrode und dem Schlauch zur Gasdetektion ausgestattet und im Inkubator (37°C) an den Potentiostaten angeschlossen. Wie auch in den Dreikammer-MFC-Aufbauten wurde ein konstantes Potential von -44 mV gegen die Kalomel-Referenzelektrode (entspricht +200 mV gegen eine Standard-Wasserstoff-Elektrode) angelegt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden steril Proben aus dem Reaktor entnommen und diese abzentrifugiert, durch einen 0,2 µm Filter gegeben und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.8 Wachstumskurven mit Eisencitrat und Bestimmung des Fe(II)-Gehalts

S. oneidensis wurde anaerob in M4 Medium (Tabelle 5) mit 50 mM Lactat als Elektronendonator und 50 mM Eisencitrat als Elektronenakzeptor kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 100 µl Probe aus der Kultur entnommen und sofort 1:10 in 1 M HCl verdünnt, um eine Oxidation des Fe(II) mit Luftsauerstoff zu verhindern. 20 µl der angesäuerten Proben sowie verschiedene Konzentrationen einer Ammonium-Fe(II)-Sulfat-Lösung (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mM; gelöst in 1 M HCl) wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 180 µl Ferrozine Lösung (1 mg/ml 3-(2-Pyridyl)-5,6-Bis(4-Phenylsulfonsäure)-1,2,4-Triazine; gelöst in 50% Ammoniumacetat) versetzt und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm im Infinite M200pro Plattenlesegerät bestimmt und unter Zuhilfenahme der Ammonium-Fe(II)-Eichgeraden der Fe(II)-Gehalt der Proben ermittelt.

3 Ergebnisse

Teil 1 A: Funktionelle Verlängerung/Verbreiterung der Elektronentransportkette ins Periplasma von *E. coli*

Mikrobielle Brennstoffzellen sind eine vielversprechende Anwendung um nicht-stöchiometrische Fermentationen ermöglichen zu können. Natürlich vorkommende, exoelektrogene Mikroorganismen sind jedoch häufig auf Grund ihres begrenzten Substratspektrums ungeeignet für diese Technologie. In einem Teil dieser Arbeit sollte daher eine effiziente Nutzung einer Anode als Elektronenakzeptor durch *E. coli* etabliert werden. Dazu wurde zunächst untersucht, welche periplasmatischen Proteine in dem Modelorganismus *S. oneidensis* in die Reduktion von extrazellulären Akzeptoren involviert sind und wie sich eine Expression dieser Reduktasen auf den Elektronentransfer ins Periplasma von *E. coli* auswirkt.

3.1. Periplasmatische c-Typ Cytochrome in *Shewanella oneidensis* unter Eisen-reduzierenden Bedingungen

Zellen von *S. oneidensis* MR-1 wurden anaerob mit Eisencitrat als Elektronenakzeptor kultiviert und die periplasmatische Fraktion isoliert. Diese wurde auf ein SDS-Gel geladen, die vorhandenen Cytochrome mit einer Hämgruppenfärbung sichtbar gemacht und mehrere Banden zwischen 10 und 70 kDa wurden ausgeschnitten. Über massenspektroskopische Untersuchungen der verschiedenen Cytochrom-Banden sowie eine MudPIT Analyse der gesamten periplasmatischen Fraktion konnten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Heinrich Heide in Freiburg 12 periplasmatische Cytochrome identifiziert werden, die in *S. oneidensis* unter eisenreduzierenden Bedingungen hochreguliert sind. Die identifizierten Proteine und ihre Scores sind in Abbildung 11 dargestellt.

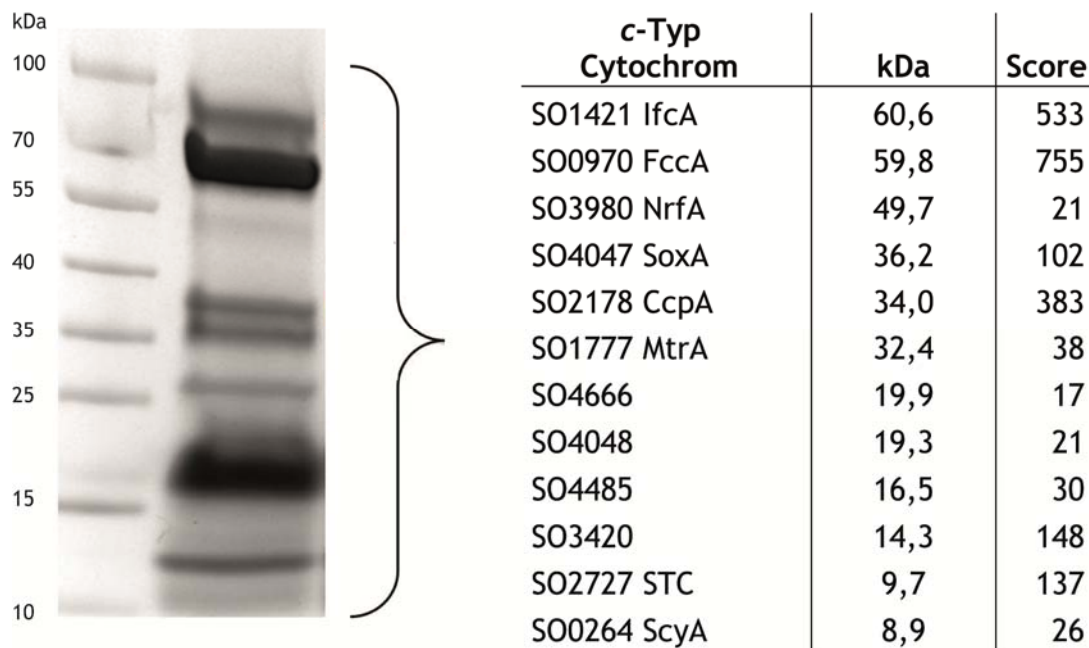


Abb. 11: **Periplasmatische c-Typ Cytochrome in *S. oneidensis***. SDS-Gel mit einer Hämgruppenfärbung des Periplasmas von Zellen, die unter Eisen-reduzierenden Bedingungen kultiviert wurden. Es wurden 25 µg Protein geladen. Einzelne Banden wurden aus dem Gel eluiert und direkt über massenspektrometrische Analysen identifiziert. Zusätzlich wurde die gesamte periplasmatische Fraktion zur MudPIT Analyse verwendet. Alle identifizierten Cytochrome sind mit SO-Nummern und Proteinnamen sowie den dazugehörigen Molekulargewichten und Scores in der Tabelle aufgeführt.

3.2 Etablierung einer Testmethode zum Vergleich des periplasmatischen Elektronentransfers in *E. coli*

Die mit Hilfe der MS-Analyse identifizierten periplasmatischen Cytochrome aus *S. oneidensis* sollten in *E. coli* exprimiert und ihr Einfluss auf die Reduktionskraft des Organismus untersucht werden. Da die Untersuchung des Elektronentransfers ins Periplasma von verschiedenen Stämmen bisher vor allem über zeitaufwendige Wachstumsexperimente mit (un)löslichen Eisenspezies erfolgte, sollte zunächst eine geeignete Methode zum schnellen und parallelen Vergleich von Elektronentransferreaktionen ins Periplasma verschiedener Stämme entwickelt werden. Grundlage des neuen Tests bildet die Messung der Reduktion eines membrangängigen Redox-Farbstoffes. Wird der Farbstoff von den Zellen reduziert, so kann diese Reduktion im Photometer verfolgt werden. Zunächst wurde die *E. coli*-vermittelte Reduktion von 5 verschiedenen Farbstoffen mit unterschiedlichen Redoxpotentialen verglichen. Untersucht wurde die Reduktion von Benzylviologen ($E^{0\prime} = -359$ mV), Safranin O ($E^{0\prime} = -289$ mV), Resorufin ($E^{0\prime} = -51$ mV), Neu-Methylenblau ($E^{0\prime} = -21$ mV) und Methylenblau ($E^{0\prime} = +11$ mV). Als Testorganismus wurde ein *E. coli* Stamm gewählt, der die beiden Cytochrome CymA und MtrA aus *S. oneidensis* heterolog exprimiert und für den eine aus dieser Expression resultierende Fähigkeit der Reduktion von löslichem Eisen-NTA bereits gezeigt

werden konnte (Gescher et al., 2008, Schütz et al., 2009). Abbildung 12 zeigt die Reduktion der verschiedenen Redoxmediatoren innerhalb eines Zeitraums von 13 Minuten. Eine Reduktion des Farbstoffes durch *E. coli* war nur im Falle von Methylenblau zu erkennen; bei allen anderen getesteten Mediatoren fand innerhalb dieses Zeitraums keine messbare Reduktion statt. In einer Kontrolle ohne Zugabe von Zellen wurde Methylenblau nicht reduziert. Eine schematische Übersicht über die Elektronentransfer-Reaktionen im Periplasma ist in Abbildung 13A dargestellt.

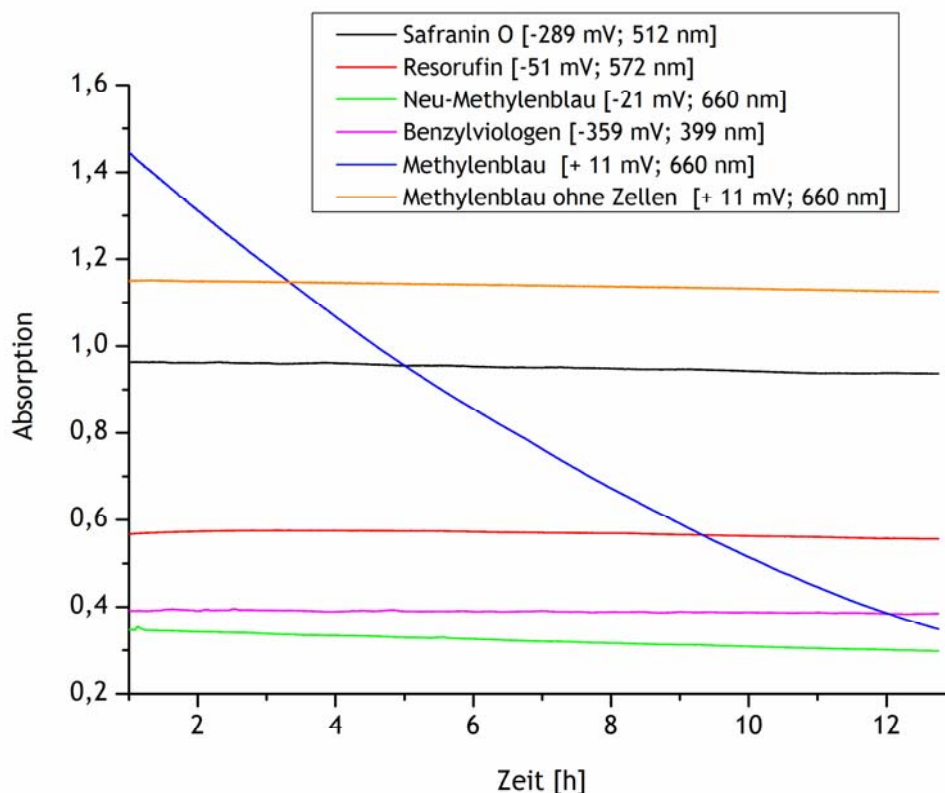


Abb. 12: **Reduktion verschiedener membrangängiger Shuttle-Komponenten durch JG146.** In einem Zellsuspensionsassay wurden 100 μl des jeweiligen Redox-Farbstoffes (100 μM) zu 100 μl Zellen (OD 1) gegeben und die Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge für 13 Minuten in einem Plattenlesegerät (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich) gemessen. Bei der Messung ohne Zugabe von Zellen wurden statt eines Shuttles 100 μl Medium zugegeben. In der Abbildung sind die Redoxpotentiale der Farbstoffe und die Wellenlängen angegeben, bei denen der Test durchgeführt wurde. Nur im Falle von Methylenblau konnte einer Reduktion des Shuttles gemessen werden. Diese war abhängig von der Zugabe von Zellen.

Aufbauend auf diesem Ergebnis sollte eine Abhängigkeit der Methylenblau-Reduktionsrate von der Cytochromexpression im Periplasma untersucht werden. Dazu wurde die Methylenblau Reduktion von drei verschiedenen *E. coli* Stämmen verglichen: JG672 (*E. coli* DH5 α ZI Wildtyp), welcher über keine heterologen Cytochrome verfügt; Stamm JG11, welcher das Gen für das membrangebundene Tetrahäm-Cytochrom CymA im Genom trägt und der darauf aufbauende Stamm JG146, welcher ein Operon aus *cymA* und dem periplasmatischen *mtrA* besitzt. Alle drei Stämme zeigten eine Reduktion von Methylenblau, jedoch konnte im Vergleich mit dem Wildtyp eine um fast 40% gesteigerte Rate

durch die Expression von *cymA* in JG11 gemessen werden. Die zusätzliche Expression von MtrA ergab eine weitere Steigerung der Rate um 13%. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 13B dargestellt.

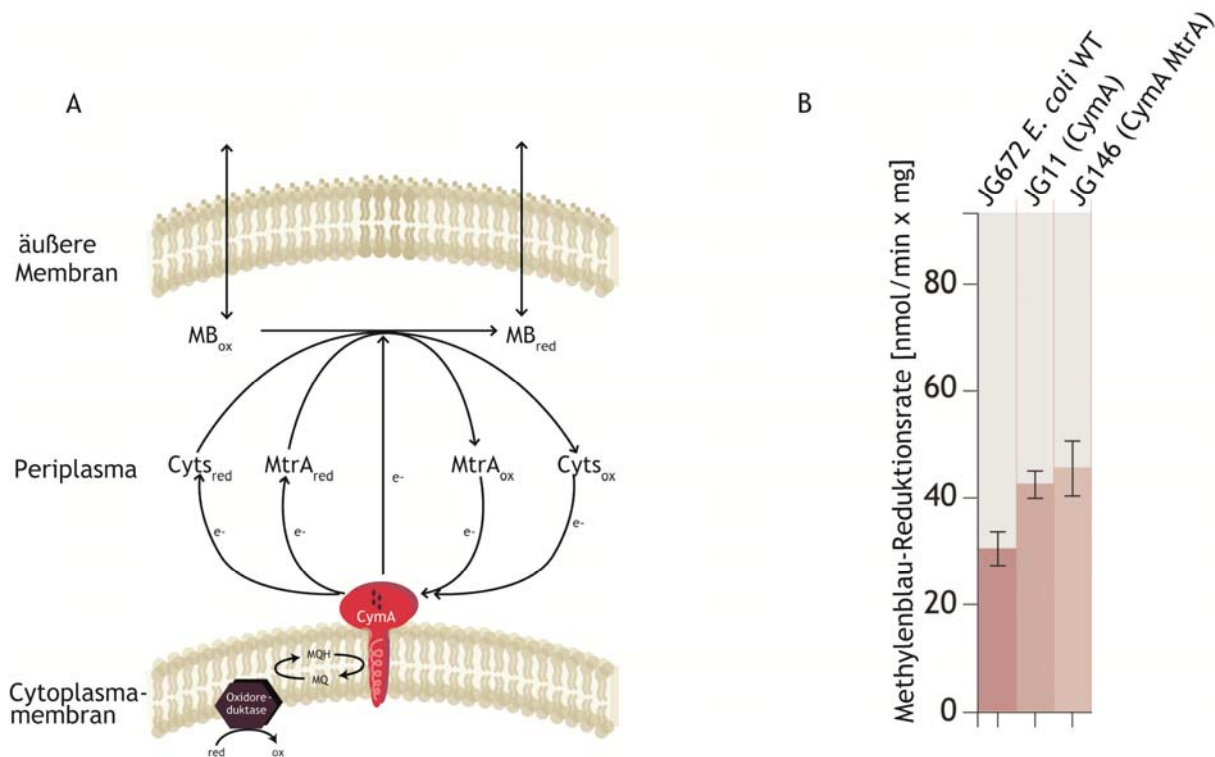


Abb. 13: Etablierung eines Assays zum Vergleich der Elektronentransfer-Raten ins Periplasma verschiedener *E. coli*-Stämme. **A** Übersicht über potentielle Elektronentransfer-Reaktionen im Periplasma. Methylenblau ist Membran-permeabel und diffundiert in das Periplasma der Zellen, wo es durch die heterolog exprimierte *c*-Typ Cytochrome reduziert werden kann. Die Abkürzung Cyts steht für die Summe verschiedener periplasmatischer *c*-Typ Cytochrome, deren Expression unter Eisen-reduzierenden Bedingungen im Verlauf der Arbeit noch getestet werden sollte. **B** Methylenblau-Reduktionsraten verschiedener *E. coli*-Stämme. Dargestellt sind die Methylenblau-Reduktionsraten in nmol pro Minute und mg Zellprotein. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Messungen in unabhängigen Triplikaten.

3.3 Klonierung der periplasmatischen Cytochrome

Anschließend an die Etablierung des Methylenblau-Assays wurde nach potentiellen Cytochromen zur weiteren Steigerung des Elektronentransfers ins Periplasma gesucht. Als Expressionsstamm wurde wieder der *E. coli*-Stamm gewählt, der bereits die beiden Cytochrome CymA und MtrA aus *S. oneidensis* heterolog exprimiert (JG146). Mit Ausnahme von MtrA wurden alle in Abbildung 11 aufgelisteten Cytochrome gemäß der isothermalen Klonierungsmethode nach Gibson (2.3.5 Klonierungsmethoden) in ein Plasmid (pMAL) unter Kontrolle des induzierbaren *lac*-Promoters kloniert (Primer 58 – 83). Zusätzlich wurde das Gen SO3300 kloniert (Primer 62 und 63), da dessen Transkription unter Eisen-reduzierenden Bedingungen stark erhöht ist (Beliaev et al., 2005) und ein Einfluss auf die Reduktion von Methylenblau untersucht werden sollte. Alle klonierten Plasmide

wurden in JG146 transformiert. Dieser Stamm enthielt bereits das Plasmid pEC86. Es trägt eine Kopie der Cytochrom-*c*-Maturationsgene *ccmABCDEFGH* aus *E. coli* und sorgt so über eine erhöhte Genexpression für eine verbesserte Produktion von *c*-Typ-Cytochromen (Arslan et al., 1998). Die Zellen wurden anaerob in M4 Medium (Tabelle 5) mit Glycerin und DMSO kultiviert. Die Expression aller Cytochrome wurde mit 50 mM IPTG induziert und anschließend die periplasmatische Fraktion isoliert. Diese wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Cytochrome mittels Hämgruppenfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 14). Wie zu erwarten wurden im Periplasma des Wildtyps und des Stamms JG11 keine Cytochrome exprimiert (Spur 1 und 2). In JG146 (Spur 3) ist zwischen 35 und 40 kDa eine Cytochrombande zu sehen, welche MtrA zuzuordnen ist. In den Spuren 4 bis 15 wurde das Periplasma der 12 Stämme mit zusätzlich exprimierten Genen geladen. Da alle Gene im Stamm JG146 exprimiert wurden, ist eine Cytochrombande für MtrA in allen Fällen sichtbar; jedoch schwankt die Expressionsstärke sowohl von MtrA als auch von den zusätzlichen heterologen Proteinen in den verschiedenen Stämmen. Für CcpA (Spur 4) ist keine einzelne Bande auf dem Gel zu erkennen, es läuft auf derselben Höhe wie MtrA. Seine Expression konnte daher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. In Spur 5 läuft STC als relative breite Bande zwischen ca. 12 und 25 kDa. Das Tetrahäm Flavo-Cytochrom IfcA hat ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa, jedoch ist auf dieser Höhe keine Bande zu sehen (Spur 6). SoxA liegt auf einer Höhe mit MtrA; auch hier sind daher keine distinkten Banden zu unterscheiden (Spur 7). SO4048 (Spur 8) und SO4666 (Spur 9) haben beide ein Molekulargewicht von etwa 20 kDa und sind im Gel auf dieser Höhe als Banden zu erkennen. SO4048 wurde jedoch deutlich schwächer exprimiert. In diesem Stamm sieht man auch kleinere Proteinfragmente auf einer Höhe unter 10 kDa. In dem SO4666-exprimierenden Stamm ist sehr weit oben im Gel (ca. 90 kDa) ebenfalls eine leichte Hämfärbung sichtbar. In Spur 10 ist FccA auf Höhe von 60 kDa als sehr schwache Bande zu erkennen. MtrA ist in diesem Stamm schwächer sichtbar als in JG146 und zusätzlich ist eine leichte Bande bei 15 kDa zu erkennen. SO3300 wird gut in *E. coli* exprimiert und zeigt in Spur 11 eine deutliche Bande unterhalb von 15 kDa. Gleichzeitig ist MtrA jedoch recht schwach zu erkennen. SO3420 hat eine erwartete Größe von 34 kDa und ist daher über das Gel nicht zweifelsfrei zu detektieren, da es auf einer Höhe mit MtrA läuft (Spur 12). In dieser Spur ist zu eine zusätzlich Bande bei ca. 10 kDa zu sehen. ScyA, ein Monohäm Cytochrom zeigt eine klare Bande auf der Höhe von ca 10 kDa (Spur 13), wohingegen NrfA in Spur 14 nur sehr schwach bei 50 kDa zu erkennen ist. In diesem Stamm ist MtrA fast gar nicht exprimiert. SO4485 hat ein Molekulargewicht von 16 kDa und auf dieser Höhe ist eine sehr schwache Bande im Gel zu erkennen (Spur 15).

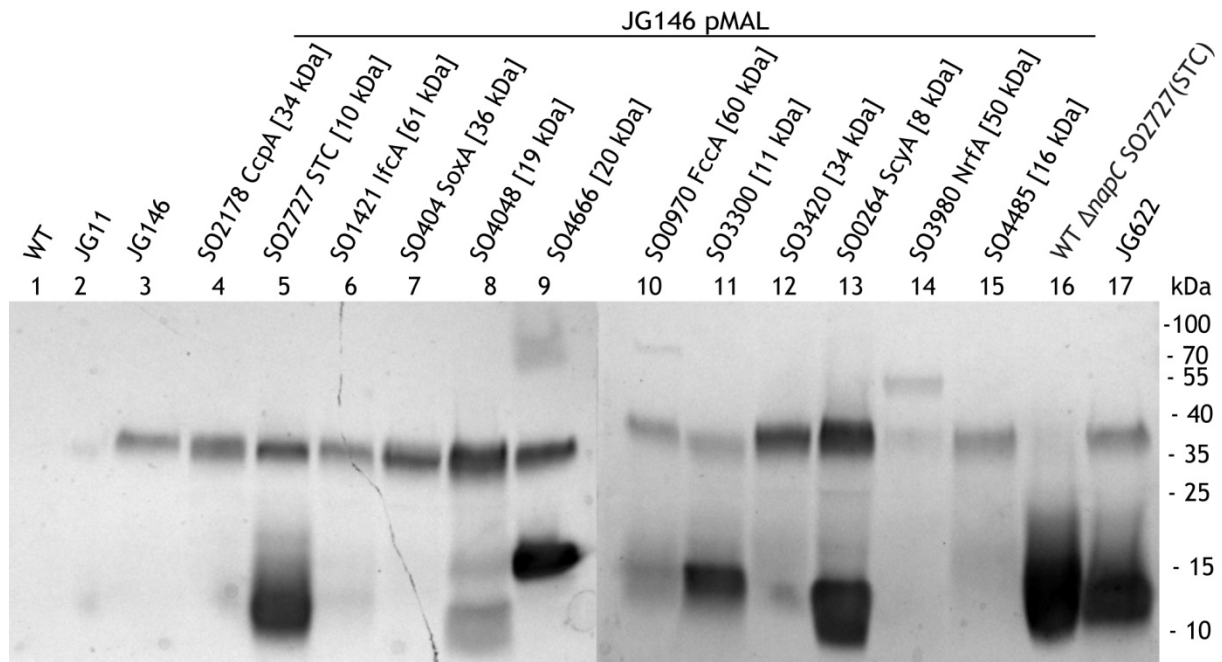


Abb. 14: **Expressionsgel der Expression heterolog exprimierten c-Typ Cytochrome in *E. coli*.** Die Stämme wurden anoxisch in M4 mit 0,5% Glycerin und 50 mM DMSO kultiviert und die Expression der heterologen Cytochrome induziert. Die periplasmatische Fraktion wurde isoliert, 40 µg Protein auf ein Gel geladen und die Hämgruppen angefärbt. In Spur 1 wurde Periplasma von *E. coli* DH5αZl geladen. In JG11 (Spur 2) wurde die Expression von CymA; in JG146 (Spur 3) die von CymA und MtrA induziert. In Spur 4 bis 14 wurde Periplasma von JG146 mit verschiedenen zusätzlich induzierten Cytochromen geladen (siehe Beschriftung). Spur 16 zeigt die periplasmatischen Cytochrome in einer *napC*-Deletionsmutante, in welcher STC vom Plasmid aus synthetisiert wurde. JG622 (Spur 17) trägt ein Cytochrom-Modul bestehend aus den Genen für CymA, MtrA und STC im Genom. Die Molekulargewichte der relevanten Cytochrome sind angegeben.

Anschließend an die Überprüfung der Expression der periplasmatischen Cytochrome wurde eine funktionelle Analyse im Hinblick auf die Methylenblau-Reduktion durchgeführt. Hierzu wurden alle Cytochrome erneut anoxisch exprimiert und die Zellen nach dem Ernten und Waschen unter anoxischen Bedingungen in einem Plattenlesegerät mit Methylenblau inkubiert und die Reduktionsrate in unabhängigen Triplikaten photometrisch bestimmt. Die Raten der einzelnen Stämme sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Co-Expression der meisten Cytochrome in JG146 hatte entweder nur einen schwach positiven Effekt auf die Methylenblau-Reduktion oder verminderte sogar die Fähigkeit des Stamms, Elektronen auf das Shuttle zu übertragen. Lediglich vier Cytochrome erhöhten die Reduktionsrate signifikant über die von JG146. Dabei handelt es sich um das kleine Tetrahäm-Protein STC, das Monohäm SO4666, das Flavo-Cytochrom FccA und die Nitratreduktase NrfA. STC und SO4666 sind Cytochrome, für die im Expressionsgel eine deutliche Bande und somit eine gute Expression gezeigt werden konnte. Die Häm-Banden der Cytochrome von FccA und NrfA sind hingegen deutlich schwächer ausgeprägt. Von allen heterolog exprimierten Cytochromen ist besonders STC hervorzuheben, da eine Expression dieses Cytochroms in *E. coli* JG146 die Reduktionsrate von Methylenblau um über 183% steigert.

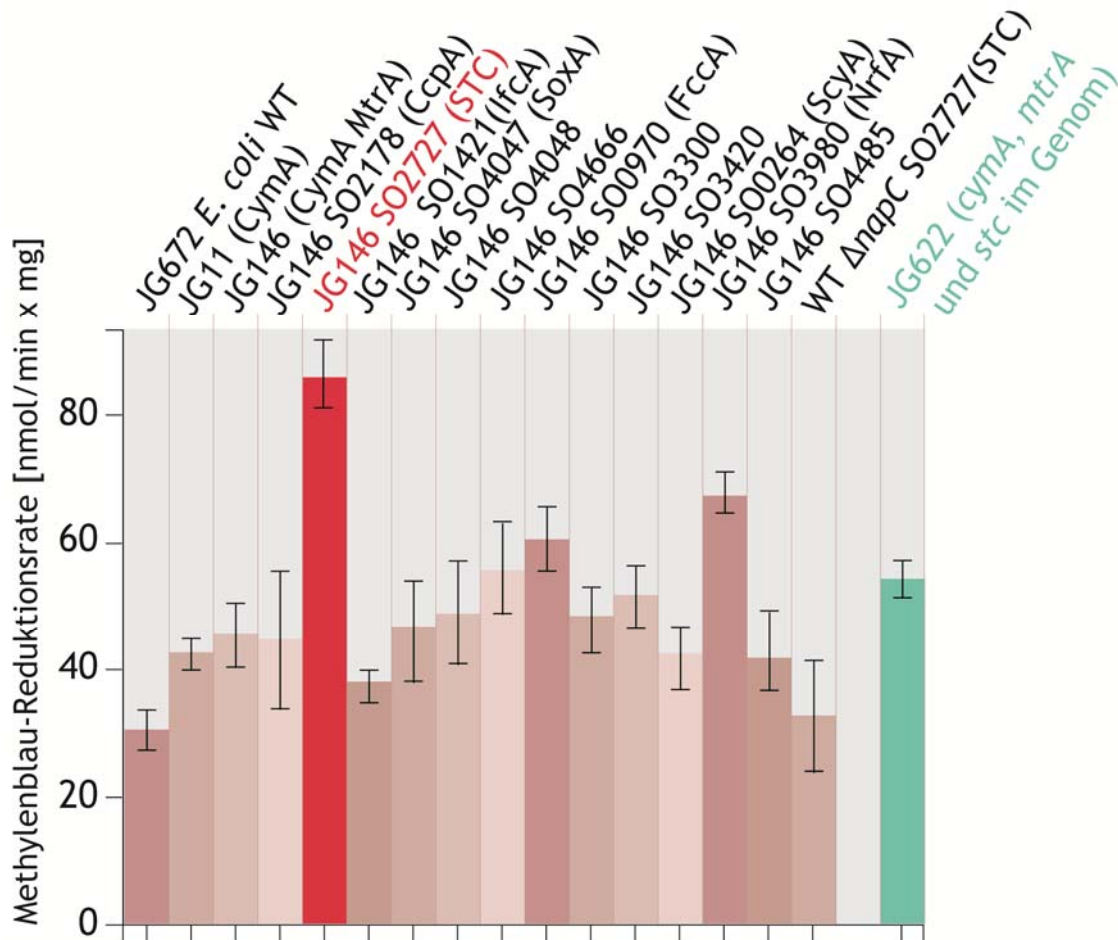


Abb. 15: Einfluss heterologer *c*-Typ Cytochrome auf die Reduktion von Methylenblau. Die Methylenblau-Reduktionsraten wurden in nmol/min x mg Zellprotein für unterschiedliche *E. coli*-Stämme gemessen. Analysiert wurden Stämme, welche die verschiedenen periplasmatischen Cytochrome heterolog exprimieren. Die Raten der ersten drei Stämme sind bereits in Abbildung 13 dargestellt und nur der Vollständigkeit halber nochmals aufgeführt. Zusätzlich wurde die Methylenblau-Reduktionsrate des Stammes JG622 bestimmt (grüner Balken). Dieser trägt ein Cytochrom-Modul bestehend aus den Genen für CymA, MtrA und STC im Genom. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Messungen in unabhängigen Triplikaten.

3.4 CymA-abhängige in vivo und in vitro Reduktion von STC in *E. coli*

Da STC in den vorangegangenen Experimenten eine gute Expression in *E. coli* und die höchste Reduktionsrate im Methylenblau-Assay gezeigt hatte, sollte als nächster Schritt untersucht werden, ob die Elektronen aus der Cytoplasma-Membran über CymA auf STC übertragen werden und somit respiratorischen Ursprungs sind. Dazu wurde der Methylenblau-Assay mit einem *E. coli*-Stamm wiederholt, welchem sowohl das Gen für CymA als auch das Gen für das orthologe Protein NapC fehlt. Eine Expression von STC vom Plasmid aus in diesem *cymA*- und *napC*-defizienten Stamm erhöhte die Reduktionsrate nicht deutlich über das Niveau des Wildtyps (30,4 vs 32,7 nmol/min x mg; Abbildung 15). Eine Hämgruppenfärbung des Periplasmas dieses Stamms ist in Abbildung 14, Spur 16 zu sehen und zeigt die typische breite STC-Bande zwischen 12 und 25 kDa.

Das Methylenblau-Reduktions-Experiment zeigte eine Abhängigkeit der STC-Reduktion von CymA - jedoch nicht, ob STC von CymA direkt reduziert oder der Elektronentransfer von MtrA vermittelt wird. Dieser Frage wurde in einem in vitro Ansatz nachgegangen. Aus früheren Experimenten war bekannt, dass *E. coli*-Membranen, welche CymA enthalten, mit Hilfe von Glycerin-3-Phosphat in vitro reduziert werden können und dass Membran-gebundenes CymA Elektronen auf gereinigte periplasmatische Cytochrome wie MtrA oder FccA übertragen kann (Schütz et al., 2009). In diesem Ansatz reduzieren katalytische Mengen CymA-enthaltender Membran-Fraktionen aus *E. coli* die gereinigten Cytochrome, welche in deutlich höherer Konzentration eingesetzt werden. Dadurch kann die Reduktion des (gereinigten) Cytochroms photometrisch bei einer Wellenlänge von 552 nm verfolgt werden, während die Konzentration von CymA zu gering ist, um die Quantifizierung zu beeinflussen. Abbildung 16 zeigt Spektren von reduziertem und oxidiertem STC und den schematischen Aufbau des in vitro Assays.

Zur Aufreinigung von STC wurde ein *his-Tag* mit Hilfe von Primern an das Gen fusioniert (Primer 50 und 51), *stc_{his}* in ein pBAD Plasmid kloniert und das fertige Konstrukt in *S. oneidensis* MR-1 transformiert. Der Stamm wurde anaerob in M4 Medium (Tabelle 5) mit Lactat und Fumarat kultiviert und die Expression von *stc_{his}* mit 0,1 mM Arabinose induziert. Das Periplasma wurde isoliert und daraus STC_{his} über eine *his-trap*-Affinitätssäule aufgereinigt. Der *E. coli* Stamm JG11, welcher eine Kopie von *cymA* unter Kontrolle des AHT-induzierbaren *tet*-Promoters im Genom trägt, wurde anaerob kultiviert und die Expression von *cymA* induziert bzw. in einer Kontrolle nicht induziert. Die Membranen wurden unter anoxischen Bedingungen präpariert und eine Menge zwischen 0,038 und 0,113 mg Protein in eine anoxische Küvette mit HEPES Puffer und Glycerin-3-Phosphat gegeben. Nach Zugabe von 1,5 mmol gereinigtem STC_{his} wurde die Absorption des Cytochroms für 5 Minuten bei einer Wellenlänge von 552 nm gemessen. Die kontinuierliche Reduktion des gereinigten Cytochroms führte zu einer allmählichen Zunahme der Absorption. Aus der Steigung konnte die Reduktionsrate ermittelt werden. Diese betrug $46,9 \pm 5,6$ nmol/min x mg Membranprotein, wenn CymA in der Membran enthalten war. In Kontrollexperimenten mit Membranen uninduzierter Zellen konnte keine Reduktion von STC_{his} gemessen werden ($1,0 \pm 0,6$ nmol/min x mg Membranprotein).

Um die Integrität der verwendeten Membranen zu testen, wurden ihre NADH-Oxidationsraten verglichen. Die Membranen wiesen mit $673 \pm 8,3$ nmol/min x mg für die induzierte Membran und $554 \pm 11,4$ nmol/min x mg für die nicht induzierte Membran vergleichbare Raten auf.

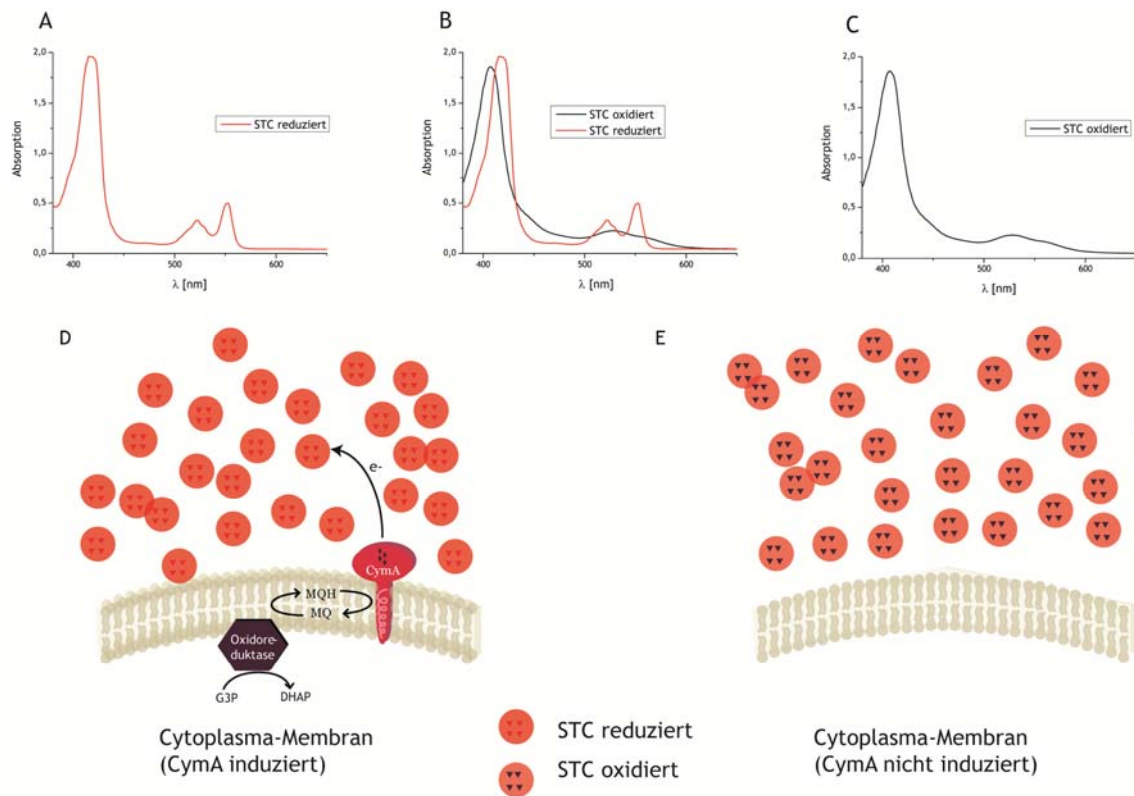


Abb. 16: **Elektronentransfer von CymA auf STC.** Repräsentative Spektren von reduziertem (A) und oxidiertem (C) STC und Überlagerung beider Spektren (B) zum besseren Vergleich. Das reduzierte Spektrum eines *c*-Typ Cytochroms weist zwei charakteristische Maxima bei 552 und 522 nm auf (α - und β -Peak). Ein weiteres Maximum (γ -Peak) liegt im reduzierten Zustand bei 420 nm. Im Spektrum von oxidiertem Cytochrom verschiebt sich der γ -Peak auf 410 nm und der α - und der β -Peak verschwinden. D und E Schematische Darstellung des *in vitro* Assays. Die Elektronen entstammen der Reduktion von Glycerin-3-Phosphat (G3P) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und werden über CymA auf STC übertragen. Dieses liegt im Überfluss vor und die allmähliche Reduktion kann bei 552 nm verfolgt werden. Fehlt CymA in der Membran, findet kein Elektronentransfer auf STC statt und das Cytochrom bleibt oxidiert. Die Dreiecke symbolisieren die Hämgruppen im Tetrahäm-Protein STC.

3.5 Genomintegration von STC

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse, welche mit STC erzielt werden konnten, sollte das Gen ins Genom des *E. coli* Stamms JG146 integriert werden; unter anderem um in den folgenden Experimenten auf eine permanente Zugabe von Antibiotikum verzichten zu können. Die Integration von STC erfolgte über die CRIM Plasmid basierte Methode von Haldimann und Wanner (Haldimann and Wanner, 2001). Hierbei können Gene über Sequenz-spezifische Rekombination an einer von fünf verschiedenen Phagenerkennungsstellen stabil ins Genom von *E. coli* integriert werden. Die Integration von STC resultierte in einem neuen Stamm (JG622), bei welchem *stc* unter der Kontrolle des Arabinose Promoters steht. Die erfolgreiche Expression des Gens wurde mit Hilfe eines SDS-Gels und anschließender Hämgruppenfärbung überprüft. Das Periplasma von JG622 zeigt eine Bande für MtrA auf der Höhe von ca. 35 kDa und die typische breite Bande für STC zwischen 12 und 25 kDa (Abbildung 14). Im Methylenblau-Assay zeigt der Stamm eine um 78% gesteigerte Reduktionsrate

verglichen mit dem Wildtyp und eine Steigerung der Rate um 19% im Vergleich zum Stamm JG146 (Abbildung 15).

3.6 Elektrochemische Experimente

Zyklische Voltammetrie von Methylenblau

Die Interaktion von Methylenblau mit einer Kohlenstoffelektrode wurde mit Hilfe der zyklischen Voltammetrie untersucht. Hierzu wurde in einer Lösung mit 100 μM Methylenblau eine Potentialspanne zwischen -0,6 und +1,1 V mit einer Sweep Rate von 10 mV/sec abgefahren und dabei der Elektronentransfer von Methylenblau auf eine Kohlenstoffelektrode und von dieser zurück auf Methylenblau gemessen. Das erhaltene zyklische Voltammogramm zeigt, dass der Prozess reversibel abläuft. Es ist die Oxidation von Methylenblau bei ca. + 0,05 V (positives Maximum) und die Reduktion bei ca. - 0,05 V (negatives Maximum) zu erkennen, was bedeutet, dass eine Interaktion von Methylenblau mit einer Kohlenstoff-Elektrode möglich ist (Abbildung 17).

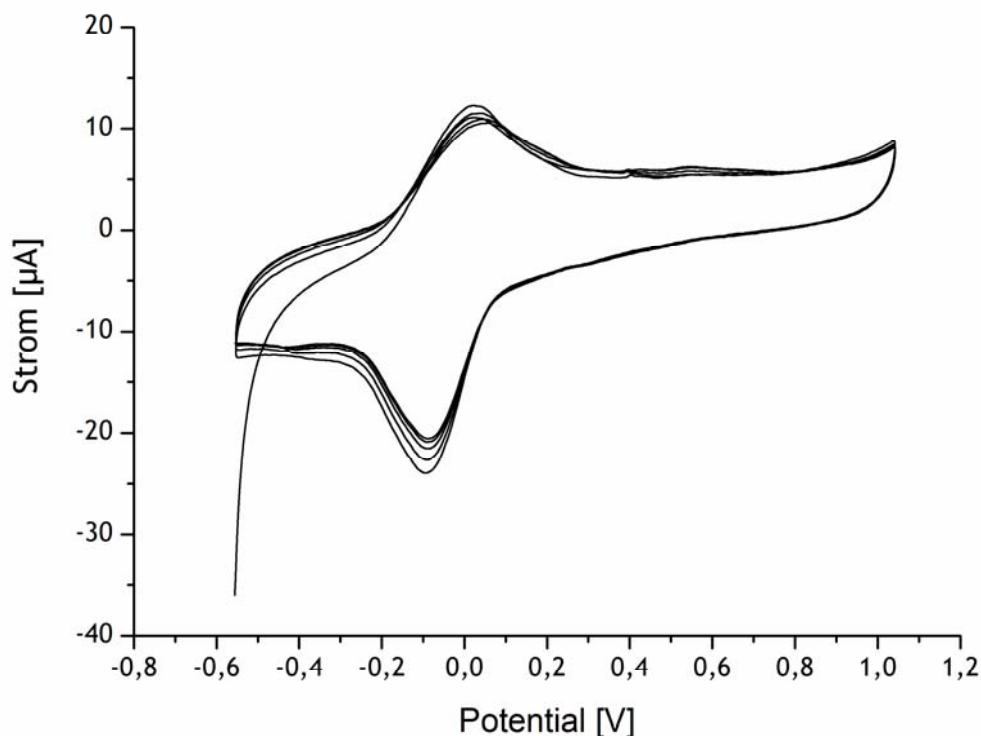


Abb. 17: **Zyklisches Voltammogramm von Methylenblau.** Eine Potentialspanne zwischen -0,6 und +1,1 V wurde mit einer Sweep Rate von 10 mV/sec für 10 Zyklen abgefahren und dabei der Strom gemessen. Eine Kalomel-Elektrode diente als Referenzelektrode; die angegebenen Potentiale sind umgerechnet gegen eine Wasserstoffelektrode (NHE).

Stromerzeugung aus Glukose und Glycerin

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, dass respiratorische Elektronen vermittelt über die heterologe Expression des CymA-MtrA-STC Moduls ins Periplasma des Stammes JG622 transportiert werden können. Um diese Fähigkeit für nicht-stöchiometrische Fermentationen nutzen zu können, war ein Ziel dieser Arbeit die Anwendung des Stamms JG622 in mikrobiellen Brennstoffzellen zu etablieren. Hierbei sollte Methylenblau Anoden-unterstützt kontinuierlich re-oxidiert und somit ein Elektronenübertrag aus dem Periplasma von *E. coli* auf eine Anode ermöglicht werden. Das elektrochemische Verhalten des Wildtyps und des Stammes JG622 sollte in Bezug auf eine Oxidation von Glukose und Glycerin miteinander verglichen werden. In den mikrobiellen Brennstoffzellen wurde an der Anode ein Potential von +200 mV gegen NHE angelegt und die Atmosphäre in der Anodenkammer mit N₂/CO₂ Gas konstant anoxisch gehalten. 10 µM Methylenblau dienten als Elektronenshuttle und vergrößerten virtuell die Anodenfläche. Alle Experimente wurden in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

Mit Glukose als Elektronendonator stieg die Stromproduktion nach einer kurzen lag-Phase schnell an und erreichte nach ca. 10 Stunden ein Maximum von $9,0 \pm 3,4 \mu\text{A pro cm}^2$ Anodenfläche im Wildtyp und $20,0 \pm 3,6 \mu\text{A pro cm}^2$ Anodenfläche im Stamm JG622, um anschließend wieder abzusinken, da die Glukose verbraucht war (Abbildung 18A). Die maximale Stromproduktion war um den Faktor 2,2 erhöht, wenn die ausgewählten Cytochrome in *E. coli* heterolog exprimiert wurden. Im Mittel ergab sich eine Stromproduktion im Wildtyp von $5,3 \pm 1,4 \mu\text{A pro cm}^2$ Anodenfläche und in JG622 von $13,4 \pm 2,6 \mu\text{A pro cm}^2$ Anodenfläche. Somit war die mittlere Stromproduktion durch Expression des Cytochrom-Moduls um den Faktor 2,5 erhöht. Beide Stämme verbrauchten Glukose mit einer ähnlichen maximalen Oxidationsrate (μ_M) von $0,129 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ (Wildtyp) bzw. $0,135 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ (JG622). Wurde kein Potential an der Anode angelegt, lag μ_M für den Wildtyp bei $0,153 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ und für JG622 bei $0,111 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 18C). In allen Ansätzen war die Glukose somit nach ca. 12 Stunden komplett verbraucht.

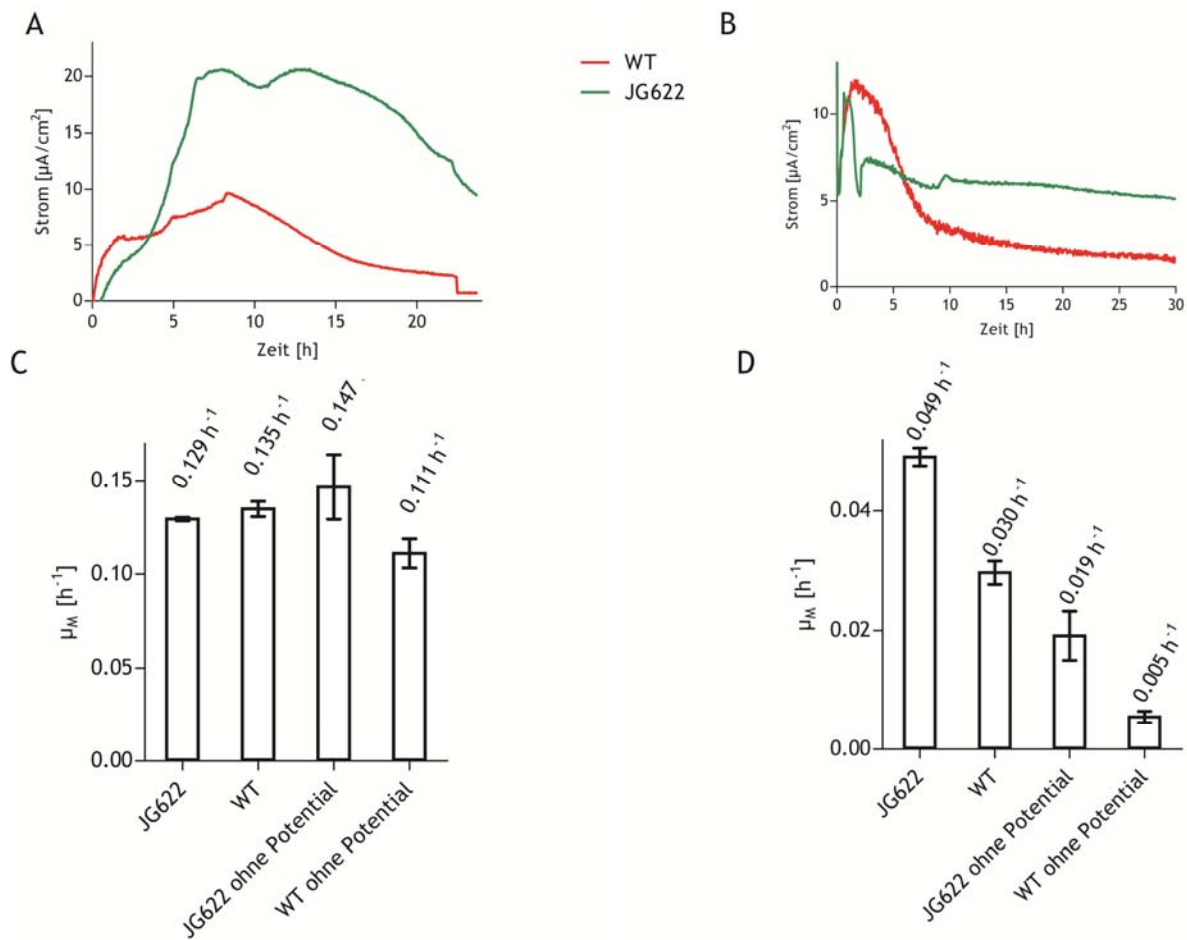


Abb 18: **Stromproduktion und Substratverbrauch in MFCs.** *E. coli*-Zellen des Wildtyps und des Stammes JG622 wurden hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit in mikrobiellen Brennstoffzellen verglichen. Glukose und Glycerin dienten als Kohlenstoffquelle. In der Anodenkammer wurde ein konstantes Potential von +200 mV (gegen NHE) angelegt und 10 μM Methylenblau als Shuttle hinzugegeben. Die Stromproduktion mit Glukose (A) und Glycerin (B) wurde für beide Stämme in unabhängigen Triplikaten gemessen und der Mittelwert in der Abbildung dargestellt. Die ermittelten Werte variierten weniger als 10%. Die maximale Oxidationsrate pro Stunde (μM) von Glukose (C) und Glycerin (D) wurden für beide Stämme in MFCs mit und ohne Potential ermittelt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Messungen in unabhängigen Triplikaten. Die Mittelwerte sind oberhalb der Balken angegeben.

Diente in den mikrobiellen Brennstoffzellen Glycerin statt Glukose als Elektronendonator, so zeigte sich ein anderes elektrochemisches und metabolisches Verhalten der Bakterien. Schon auf den ersten Blick war zu erkennen, dass die Stromkurven einen anderen Verlauf aufwiesen (Abbildung 18B). Sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante stieg der Strom direkt zu Beginn des Experiments stark an, um dann nach kurzer Zeit wieder abzusinken. In beiden Stämmen lag dieses Maximum bei ca. 12 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Nach dem Absinken pendelte sich der Strom nach 12 Stunden auf ein relativ konstantes Niveau ein; hierbei produzierte der Stamm JG622 mit durchschnittlich $5,9 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ etwa 1,5-mal mehr Strom als der Wildtyp ($3,9 \pm 0,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Innerhalb dieser konstanten Periode verbrauchte JG622 $0,84 \pm 0,06 \text{ mmol}$ Glycerin mit einer maximalen spezifischen Oxidationsrate (μ_M) von $0,049 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$. Dies entsprach einer Abnahme des Substrats um 84%. Wurde kein Potential an der Anode

angelegt, so verbrauchte JG622 weniger als 40% des Glycerins ($0,36 \pm 0,14$ mmol) mit einer Rate von nur $0,019 \pm 0,007$ h⁻¹. Brennstoffzellen mit dem Wildtyp verstoffwechselten ca. 70% Glycerin ($0,68 \pm 0,04$ mmol) mit einer Rate von $0,030 \pm 0,003$ h⁻¹, wenn ein Potential an der Anode angelegt war. Ohne Potential war die Abnahme des Glycerins langsamer (μ_M $0,005 \pm 0,002$ h⁻¹) und nur 17% des Substrats wurden verbraucht ($0,17 \pm 0,05$ mmol). Die maximale Oxidationsrate von Glycerin war in der Mutante 1,6-mal schneller als im Wildtyp (Abbildung 18D).

3.7 Exkurs: Fermentative Glycerin-Oxidation in *E. coli*

In den vorangegangenen Experimenten wurde ein Unterschied zwischen Glukose und Glycerin als Substrat in einer mikrobiellen Brennstoffzelle festgestellt. Die Oxidation von Glycerin war in *E. coli* viel stärker an das Vorhandensein eines externen Elektronenakzeptors gekoppelt als die von Glukose. Mit anderen Worten: Glycerin wurde nicht so leicht fermentiert wie Glukose. In den folgenden Experimenten sollten daher zunächst die Bedingungen für die fermentative Oxidation von Glycerin genauer untersucht werden, um dann die Anoden-basierte Glycerin-Oxidation verbessern zu können.

Hierzu wurden zunächst *E. coli* Zellen (JG22) anoxisch mit Glycerin in Carbonat-gepuffertem Medium (Tabelle 7) ohne Zugabe eines externen Elektronenakzeptors bei 37°C kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Glycerin-Abnahme untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Oxidation des Glycerins ohne Zugabe eines terminalen Akzeptors recht langsam abläuft (μ_M $0,005 \pm 0,0008$ h⁻¹) und unter diesen Bedingungen in 100 Stunden nur ca. 60% des Substrats verbraucht wurden. Der pH sank rasch von 7,3 auf 6,6 ab (Abbildung 19). Die Analyse des Endproduktspektrums ergab die Entstehung von Succinat, Acetat, Ethanol und Formiat; Lactat wurde nicht detektiert. Ethanol und Formiat machten dabei mit $0,75 \pm 0,24$ mol Ethanol pro mol verbrauchtem Glycerin und $0,70 \pm 0,14$ mol Formiat pro mol verbrauchtem Glycerin den größten Anteil am Produktspektrum aus. Succinat und Acetat entstanden mit $0,23 \pm 0,01$ bzw. $0,32 \pm 0,02$ mol pro mol Glycerin in geringerem Maße (siehe Abbildung 21).

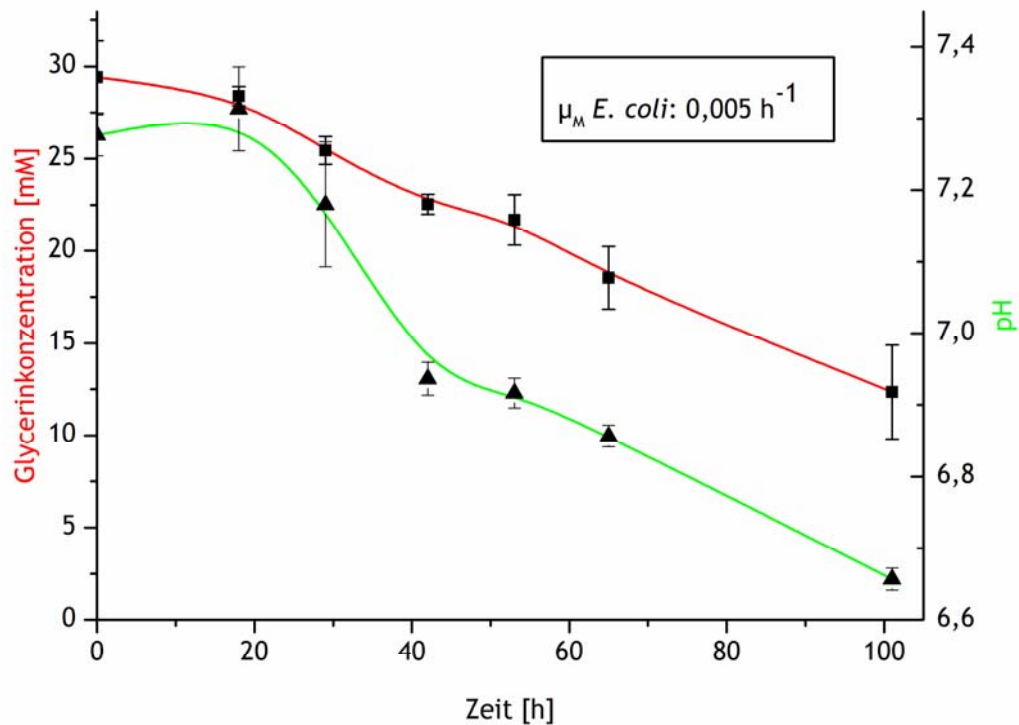
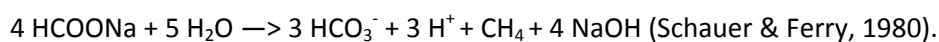


Abb. 19: Anaerobe Fermentation von Glycerin und pH Verlauf in einer Einzelkultur von *E. coli*. Die Zellen wurden ohne Elektronenakzeptor kultiviert und die Glycerinkonzentration sowie der pH Wert bestimmt. Die rote Linie repräsentiert die Glycerinabnahme; die grüne Linie den pH-Verlauf. Die Symbole stellen die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Messungen in unabhängigen Triplikaten dar. Im Kasten ist die maximale Glycerinoxidationsrate der Zellen angegeben.

Um zu untersuchen, ob sich eine Veränderung des Produktspektrums und ein möglicherweise daraus resultierender konstanter pH Wert auf die Oxidationsrate von Glycerin auswirkt, wurde das Experiment in einer Co-Kultur von *E. coli* mit *Methanobacterium formicicum* wiederholt. *M. formicicum* ist ein methanogenes Archaeum und oxidiert Formiat zu CO_2 und Methan, wobei NaOH entsteht:



Beide Stämme wurden zusammen in Carbonat-gepuffertem Medium (Tabelle 7) bei 37°C mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle inkubiert. Die Co-Kultivierung führte zu einer um das 11-fache gesteigerten Oxidationsrate ($\mu_M 0,057 \pm 0,0067 \text{ h}^{-1}$) und somit zu einem kompletten Verbrauch des Substrats nach 53 Stunden. Während des gesamten Experiments blieb der pH stabil bei Werten zwischen 7,2 und 7,3 (Abbildung 20).

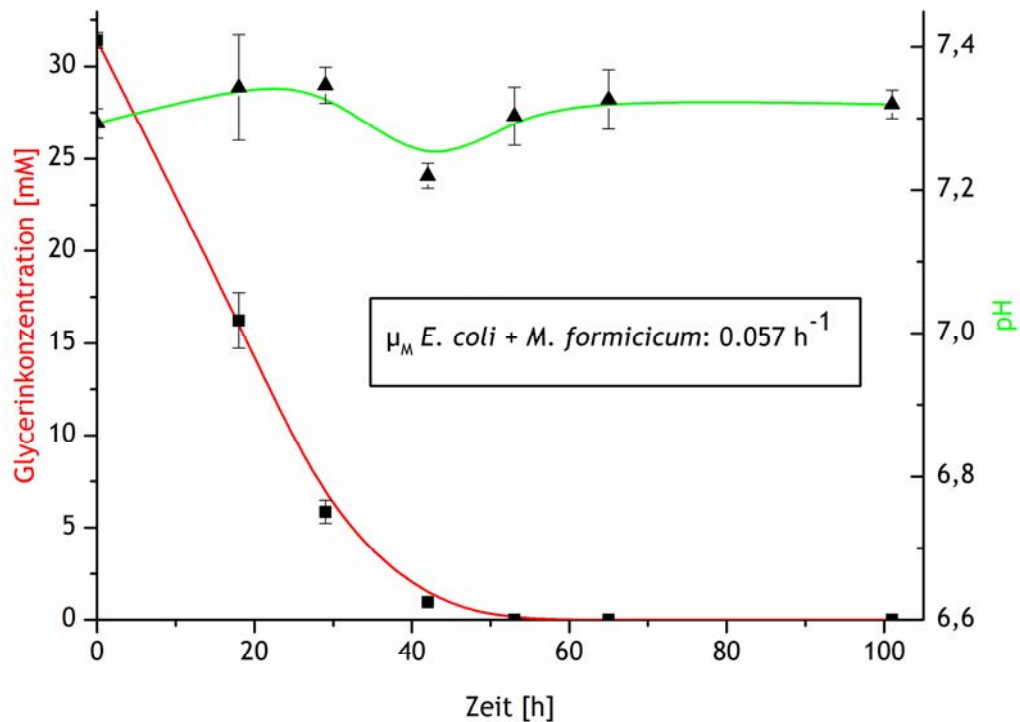


Abb. 20: **Anaerobe Fermentation von Glycerin und pH Verlauf in einer Co-Kultur von *E. coli* und *M. formicicum*.** Die Zellen wurden ohne Elektronenakzeptor kultiviert und der Verlauf der Glycerinkonzentration und des pH-Werts bestimmt. Die rote Linie stellt die Glycerinabnahme; die grüne Linie den pH-Verlauf dar. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Messungen in unabhängigen Triplikaten. Im Kasten ist die maximale Glycerinoxidationsrate der Co-Kultur angegeben.

Formiat konnte als Endprodukt nicht gemessen werden. Die Zusammensetzung des Produktspektrums verschob sich zu mehr Succinat und weniger Ethanol verglichen mit der reinen *E. coli* Kultur. Es entstanden $0,48 \pm 0,03$ mol Succinat pro mol verbrauchtem Glycerin und $0,49 \pm 0,02$ mol Ethanol pro mol Glycerin. Zudem wurde in der Co-Kultur etwas weniger Acetat produziert als in der Einzel-Kultur ($0,25 \pm 0,00$ mol Acetat pro mol Glycerin; Abbildung 21).

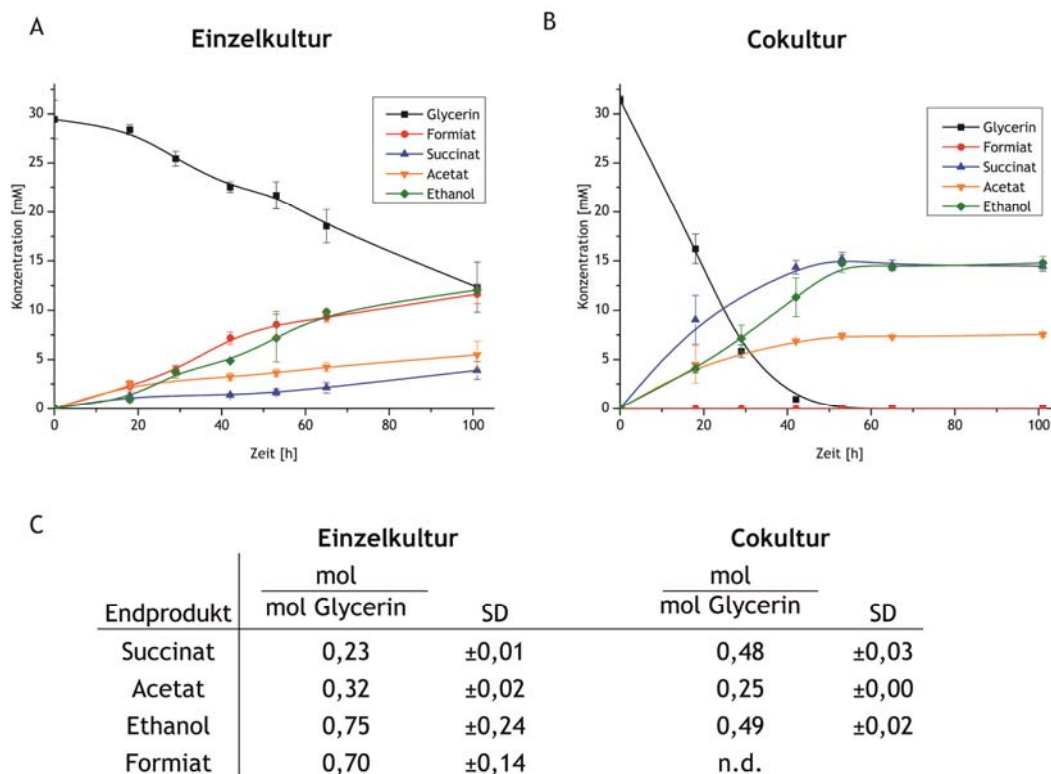


Abb. 21: Produktspektrum der Glycerin-Oxidation und Ermittlung der Stöchiometrie der Glycerin-Fermentation in einer Einzelkultur von *E. coli* (A) und einer Co-Kultur (B) aus *E. coli* und *M. formicicum*. Der Glycerin-Verbrauch und die Entstehung von Endprodukten wurden für eine Einzelkultur von *E. coli* (A) und einer Co-Kultur (B) aus *E. coli* und *M. formicicum* quantifiziert. Die Glycerin-Konzentration ist in schwarzen Quadraten, die Formiat-Konzentration in roten Kreisen, die Succinat-Konzentration in blauen Dreiecken, die Acetat-Konzentration in orangenen Dreiecken und die Ethanol-Konzentration in grünen Rauten dargestellt. Alle Messungen wurden in unabhängigen Triplikaten durchgeführt. C Die Stöchiometrie der Glycerin-Fermentation in der Einzel- und der Co-Kultur wurde nach 101 Stunden berechnet. In der Einzelkultur waren 17,1 mM und in der Co-Kultur 30,0 mM Glycerin verbraucht. In der Co-Kultur konnte kein Formiat detektiert werden. Die Mittelwerte der Tabelle sind aus der Messung unabhängiger Triplikate berechnet. SD: Standardabweichung (*standard deviation*); n. d.: nicht detektierbar.

3.8 Analyse des Endprodukt-Spektrums der Anoden-unterstützten Glycerin-Oxidation

Die elektrochemischen Experimente, die bisher beschrieben wurden, wurden in Polycarbonat-Reaktoren durchgeführt, in welchen die Anodenkammer durchgehend mit N_2/CO_2 Gas durchspült wurde, um anoxische oder suboxische Bedingungen zu erhalten. Im Zuge dieser Experimente wurde festgestellt, dass leicht flüchtige Produkte wie Ethanol oder Formiat als Folge der Begasung ausgetrieben wurden und somit keine vollständige Kohlenstoff- oder Elektronenbilanz aufgestellt werden kann. Die quantitative Bestimmung und Analyse der Endprodukte ist jedoch entscheidend, um Rückschlüsse auf eine respiratorische oder fermentative Natur des Metabolismus von *E. coli* JG622 in einer mikrobiellen Brennstoffzelle ziehen zu können. Daher wurde ein neuer Glas-Reaktor entworfen, welcher eine konstante Begasung zur Aufrechterhaltung anoxischer Verhältnisse überflüssig machte. Der Reaktor ist gasdicht und ermöglicht somit eine Quantifizierung der oben

erwähnten flüchtigen Produkte der Substrat-Oxidation (Abbildung 22). In den folgenden Experimenten wurde Glycerin als Kohlenstoffquelle gewählt, da bereits eine verstärkte Anoden-Abhängigkeit der Oxidation gezeigt werden konnte (3.6 Elektrochemische Experimente).

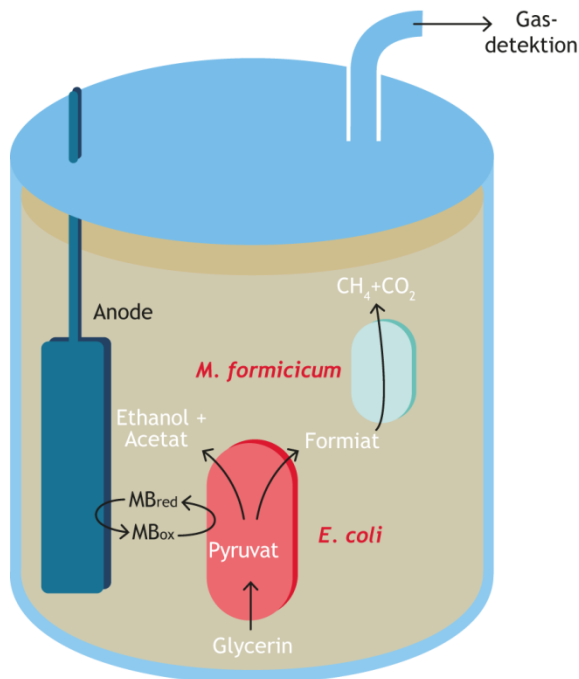


Abb. 22: **Illustration des Reaktor-Aufbaus für das Co-Kultivierungsexperiment.** Dargestellt ist der metabolische Fluss von Glycerin zu Acetat, Ethanol und Formiat und von Formiat zu Methan und CO_2 . Der rote Organismus repräsentiert den *E. coli* Stamm JG622; der blaue Organismus das Archaeum *M. formicicum*. Methylenblau (MB) wird von *E. coli* reduziert und an der Anode re-oxidiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung von Kathode und Referenzelektrode verzichtet.

Wie in Kapitel 3.7 (Exkurs: Fermentative Glycerin-Oxidation in *E. coli*) gezeigt, limitieren eine Akkumulation von Formiat und ein rasch sinkender pH-Wert die Glycerin-Oxidation von *E. coli*. Diese Effekte können jedoch durch Co-Kultivierung mit dem methanogenen Archaeum *M. formicicum* abgeschwächt werden. Dieser Ansatz sollte auch in einer mikrobiellen Brennstoffzelle zur Anwendung kommen und es sollte untersucht werden, ob die positiven Effekte der Co-Kultivierung auch unter Anoden-reduzierenden Bedingungen genutzt werden können.

Beide Stämme wurden vorinkubiert und gemeinsam in die Glasreaktoren gegeben. Es wurde ein Potential von + 200 mV gegen NHE an der Anode angelegt und 30 mM Glycerin sowie 10 μM Methylenblau zugegeben. Insgesamt verbrauchte JG622 $56,6 \pm 2,7$ mmol Glycerin in 114 Stunden. Dies entspricht ca. 90% des Substrats. Die Entstehung der Stoffwechselprodukte Ethanol, Acetat, Formiat, Methan und CO_2 wurde gemessen und analysiert (Abbildung 23A). Die Bilanzierung der Produkte zeigt, dass in der mikrobiellen Brennstoffzelle $0,30 \pm 0,01$ mol Acetat und $0,53 \pm 0,07$ mol Ethanol pro mol verbrauchtem Glycerin entstanden sind. Es konnte kein Formiat detektiert werden, jedoch lässt sich das entstandene Formiat aus den gemessenen Mengen für Acetat und Ethanol unter

Annahme einer Pyruvat-Umsetzung durch die Pyruvat-Formiat-Lyase theoretisch berechnen, woraus sich ein Wert von $0,83 \pm 0,08$ mol Formiat pro mol Glycerin ergibt (Abbildung 23B).

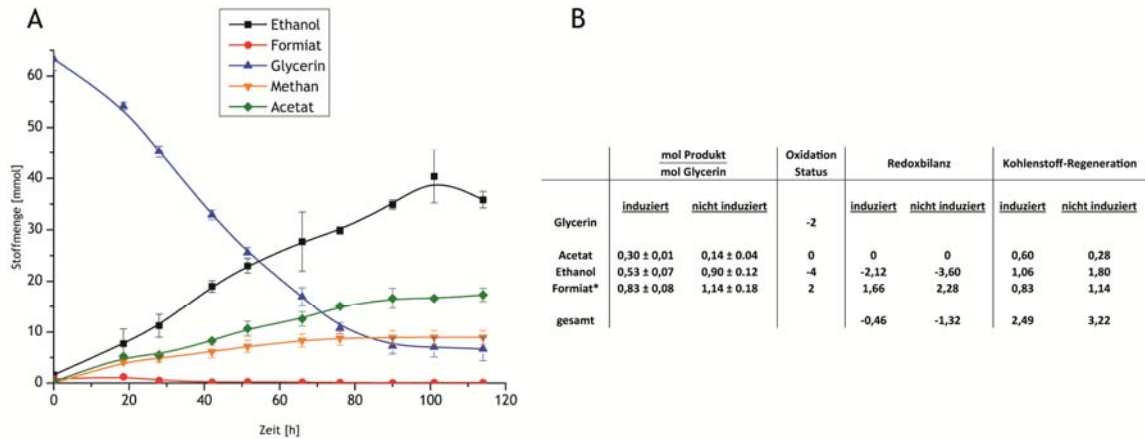


Abb. 23: **Endprodukt-Spektrum der Anoden-unterstützten Glycerin-Oxidation.** JG622 wurde mit *M. formicicum* für 114 Stunden und mit 30 mM Glycerin in einer Einkammer-MFC co-kultiviert. **A** Die Glycerin-Abnahme und das Endprodukt-Spektrum wurden quantifiziert und **B** die Redox-Bilanz und die Kohlenstoff-Regeneration kalkuliert. Die Kohlenstoff-Regeneration wurde in (mol Produkt/mol Glycerin) x Zahl der Kohlenstoff-Atome des Moleküls und die Redox-Bilanz in (mol Produkt/mol Glycerin) x Oxidationsstatus des Moleküls berechnet. * In dem elektrochemischen Aufbau konnte kein Formiat detektiert werden. Daher wurde die entstandene Menge an Formiat anhand der gemessenen Mengen für Acetat und Ethanol theoretisch bestimmt.

Die Zellen produzierten insgesamt $193 \pm 47,5$ ml Gas, davon waren $40,2 \pm 1,7\%$ Methan und $58,5 \pm 10,2\%$ CO₂. Unter Annahme einer Löslichkeit in Wasser von Methan von 27,7 mg/l ergab sich die Entstehung von $9,0 \pm 1,6$ mmol Methan in den Reaktoren. Insgesamt wurden $4,5 \times 10^{21} \pm 0,37 \times 10^{21}$ Elektronen auf die Anode übertragen. Dies entspricht $7,5 \pm 0,62$ mmol. In einem Kontrollexperiment ohne Expression des Cytochrom-Moduls wurden fast 4 x weniger Elektronen transferiert ($1,13 \times 10^{21} \pm 0,51$ bzw. $1,9 \pm 0,86$ mmol Elektronen; Abbildung 24). Normalisiert man die Zahl der Elektronen, welche auf die Anode geflossen sind auf die Menge an verbrauchtem Glycerin, so ergibt sich ein um das 2,7-fache gesteigerter Wert für die Zellen, in denen die heterologen Cytochrome exprimiert wurden. Hierbei wurden $0,13 \pm 0,017$ mol Elektronen pro mol Glycerin übertragen, wohingegen es $0,048 \pm 0,009$ mol Elektronen pro mol Glycerin waren, wenn die Elektronentransportkette ins Periplasma fehlte. Ohne Induktion des Cytochrom-Moduls wurden mehr Ethanol und Formiat und weniger Acetat produziert (Abbildung 23).

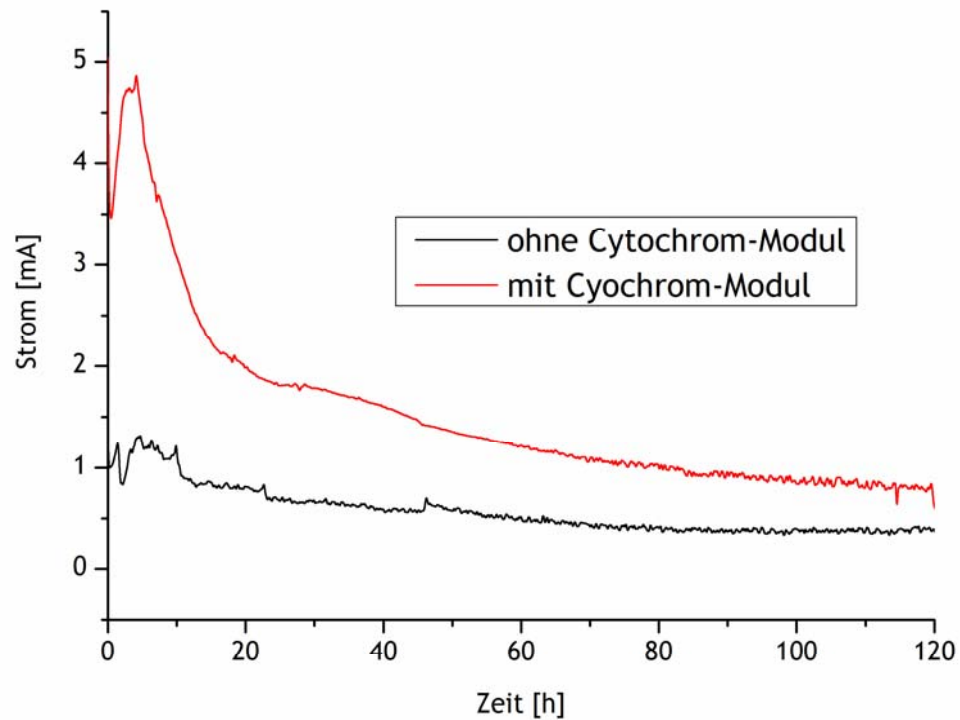


Abb. 24: **Abhängigkeit der Stromproduktion von der Expression des heterologen Cytochrom-Moduls in *E. coli*.** JG622 wurde mit 30 mM Glycerin in MFCs mit einer Anode als einzigem terminalem Elektronenakzeptor kultiviert und die Stromproduktion gemessen. 10 mM Methyleneblau dienten als Mediator zwischen Periplasma und Anode. Verglichen wurde der Stamm JG622 mit und ohne Induktion des Cytochrom-Moduls, bestehend aus den Cytochromen CymA, MtrA und STC. Die Stromproduktion wurde für beide Bedingungen in unabhängigen Triplikaten gemessen und der Mittelwert in der Abbildung dargestellt. Die ermittelten Werte variierten um weniger als 10%.

Teil 1 B: Untersuchungen zum Elektronentransfer über die äußere Membran

Für die Reduktion eines extrazellulären Akzeptors wie einer Anode, müssen bei Abwesenheit eines Membran-permeablen Shuttles wie Methylenblau (in Gram-negativen Organismen) die Elektronen über die äußere Membran transportiert werden können. In *S. oneidensis* wird dieser Elektronentransfer über sogenannte äußere Membrancytochrome (*outer membrane cytochromes*; OMCs) vermittelt. Diese terminalen Reduktasen sind auf der äußeren Membran lokalisiert und katalysieren die Reduktion von unlöslichen Akzeptoren. Dabei spielt das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS) eine wichtige Rolle für den Transport der OMCs in die äußere Membran. In *S. oneidensis* (und vielen anderen Proteobakterien) setzt sich das T2SS aus zwei Genclustern zusammen; einem großen Operon mit 12 Genen von *gspC* bis *gspN*, welche u. a. für die Pore und den Pilus des T2SS codieren, und einem kleinen Operon aus den Genen *gspA* und *gspB*. Einige Komponenten des T2SS in *S. oneidensis* sind essentiell für eine korrekte Orientierung der OMCs. *GspD*⁻ und *gspG*⁻ Mutanten können nicht mehr mit extrazellulären Akzeptoren wachsen und ihre OMCs sind falsch orientiert (Shi et al., 2008, Richter et al., 2010)

3.9 Deletion von *gspBA* in *S. oneidensis*

Die Rolle von *gspA* und *gspB* bei der Sekretion von Proteinen ist für die meisten Organismen nicht bekannt (Strozen et al., 2011). In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss des *gspBA* Operons in *S. oneidensis* auf die Reduktion von extrazellulärem Eisen untersucht werden.

Das *gspBA* Operon wurde mit Hilfe des Suizid-Vektors pMQ150_*gspBA* deletiert. Hierzu wurde pMQ150 mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *Sall* linearisiert, *gspBA* mit Hilfe der Primer 88 und 89 amplifiziert und die beiden Fragmente in einer isothermalen Ligation nach Gibson zusammengesetzt (2.3.5 Klonierungsmethoden). pMQ150_*gspBA* wurde in den WM3064 Stamm transformiert und von dort in *S. oneidensis* MR-1 konjugiert. Mittels zweier crossover-Ereignisse wurde das *gspBA* Operon aus dem Genom deletiert.

Der Einfluss von *gspBA* auf die Eisenreduktion wurde in einem Wachstumsexperiment mit Eisen(III)citrat untersucht. Triplikate von *S. oneidensis* MR-1 (JG7), *S. oneidensis* Δ *gspBA* (JG786) und *S. oneidensis* Δ *gspD* (JG443) wurden mit einer Start OD₆₀₀ von 0,03 in M4 Medium (Tabelle 5) mit Lactat als Elektronendonator und Eisen(III)citrat als Elektronenakzeptor angeimpft. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und OD und Eisen(II)-Konzentration bestimmt. Sowohl die OD als auch die Eisen(II)-Konzentration nahmen im Wildtyp und in der Δ *gspAB* Mutante in vergleichbarem Maße zu, wohingegen in der Δ *gspD* Mutante kein Wachstum und keine Eisenreduktion messbar waren (Abbildung 25). Somit konnte gezeigt werden, dass das *gspBA* Operon in *S. oneidensis* keinen entscheidenden Einfluss auf die Reduktion von extrazellulärem Eisen hat.

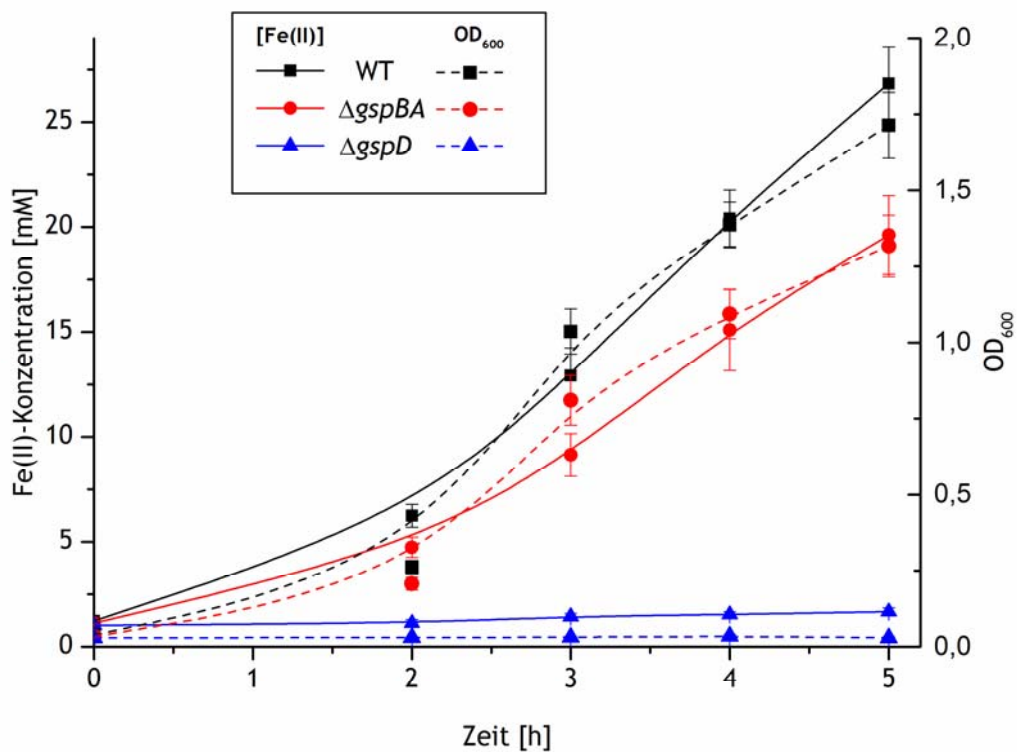


Abb. 25: **Reduktion von extrazellulärem Eisen(III) in verschiedenen *S. oneidensis* Stämmen.** *S. oneidensis* WT, $\Delta gspBA$ und $\Delta gspD$ wurden anoxisch in Eisencitrat-Medium kultiviert und die Eisenkonzentration sowie die OD gemessen. Die schwarzen Kurven repräsentieren *S. oneidensis* WT, die roten Kurven die $\Delta gspBA$ Mutante und die blauen Kurven die $\Delta gspD$ Mutante. Die Eisen(II)-Konzentration ist in durchgezogenen und die OD in gestrichelten Linien dargestellt. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der unabhängigen Triplikate.

3.10 Transfer des T2SS aus *S. oneidensis* in *E. coli*

Aus einer früheren Studie war bekannt, dass eine Aktivierung des nativen T2SS in *E. coli* nicht zu einer korrekten Orientierung von heterolog exprimierten OMCs oder zur Sekretion von löslichen Cytochromen aus *S. oneidensis* ausreicht (Richter, 2009). Daher sollte versucht werden mit Hilfe der *galk*-Methode das große Gencluster des T2SS (*gspC-gspN*) aus *S. oneidensis* in *E. coli* zu übertragen, um eine korrekte Orientierung der finalen Eisenreduktasen in der äußeren Membran zu ermöglichen. Für die *galk*-Selektion wurde das *galk* Gen unter der Kontrolle des konstitutiven CP6-Promotors in den pT7blue Vektor kloniert. Hierfür wurde das CP6-Promotor Fragment über eine PCR mit dem *galk*-Gen fusioniert und anschließend in den pT7blue Vektor kloniert (Primer 1 und 2 sowie 55 und 56). Dieser Vektor diente als *galk*-Matrize für die folgenden Klonierungen.

Eine schematische Illustration der Integrationsstrategie der *gsp*-Gene ist in Abbildung 26 dargestellt. Zunächst wurde das native T2SS in *E. coli* deletiert. Hierzu wurde ein Konstrukt aus *galk* und flankierenden homologen Bereichen zu *gspC* und *gspO* erstellt. Die flankierenden Bereiche wurden

mit den Primern 3 und 4 sowie 5 und 6 und das *galk* Gen mit den Primern 1 und 2 amplifiziert, die 3 Fragmente mit den Primern 7 und 8 zusammengesetzt und anschließend in den Vektor pT7 kloniert, welcher zuvor mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sac*I linearisiert worden war. Mit dem fertigen Vektor wurde das native T2SS mit Hilfe der *galk*-Methode in dem *E. coli* Stamm JG155 deletiert und durch *galk* ersetzt, wodurch der Stamm JG287 entstand. Anschließend wurde ein neuer Vektor nach derselben Methode erstellt. Dieser enthielt die gleichen homologen Bereiche, jedoch die Gene *gspH* bis *gspN* des T2SS aus *S. oneidensis* an Stelle des *galk*-Gens. Die flankierenden Bereiche wurden mit den Primern 4 und 11 sowie 6 und 12 amplifiziert; das T2SS-Fragment mit den Primern 9 und 10. Die Fragmente wurden wie oben beschrieben zusammen gesetzt und in pT7 kloniert. Das fertige Plasmid diente dazu, im Stamm JG287 das *galk*-Gen durch einen ca. 5 kb großen Teil des T2SS aus *S. oneidensis* zu ersetzen. Um den fehlenden Teil des T2SS in *E. coli* einzubringen wurde zunächst ein neues *galk* Plasmid erstellt und ins Genom von *E. coli* JG380 vor den bereits integrierten Bereich eingebracht. Die 3 Fragmente des Inserts wurden mit den Primerpaaren 3 und 4, 14 und 15 sowie 1 und 2 erstellt und wie beschrieben in den pT7 Vektor ligiert. Das *galk* Gen wurde vor die 5 kb des T2SS ins Genom des Stamms JG380 inseriert. In einem letzten Schritt erfolgte die Integration der fehlenden ersten Hälfte des T2SS aus *S. oneidensis*. Dieses hatte eine Größe von ca. 6,5 kb und enthielt die Gene *gspC* bis *gspH*. Zusätzlich wurde der *tet*-Promoter mit einem Primer vor das *gspC* Gen eingefügt, um die Expression des T2SS induzieren zu können. Wie bereits oben beschrieben wurde ein Plasmid mit homologen Bereichen und den Zielgenen erstellt (Primerpaare 4 und 13, 16 und 17 sowie 18 und 19) und *galk* durch *gspC* bis *gspH* ersetzt, wodurch der Stamm JG520 entstand. Somit war gesamte große Operon des T2SS aus *S. oneidensis* in das Genom von *E. coli* eingefügt und unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters gestellt worden.

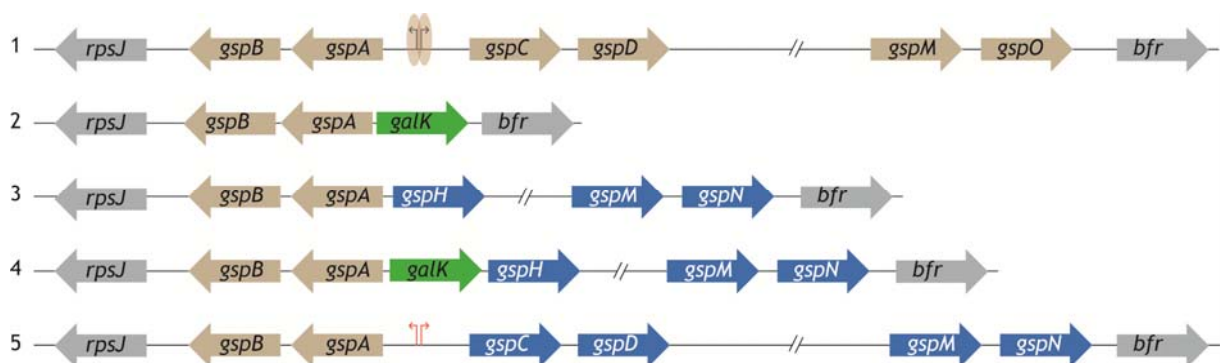


Abb. 26: Schematische Darstellung der Genom-Integration des T2SS aus *S. oneidensis* in *E. coli*. 1 nativer Genlocus in *E. coli* zu Beginn. *E. coli*-Gene des T2SS sind in beige dargestellt und angrenzende Gene in grau; der native Promoter in schwarz. Der Promoter ist in *E. coli* von dem Silencer-Protein H-NS blockiert (dargestellt in beige, (Francetic et al., 2000)) 2 Deletion der Gene *gspC* bis *gspO* inklusive des Promoter-Bereichs durch Integration von *galk* (grün). 3 Integration der Gene *gspH* bis *gspN* von *S. oneidensis*, einhergehend mit einer Deletion von *galk*. T2SS-Gene von *S. oneidensis* sind in blau dargestellt. 4 Integration von *galk* vor *gspH*. 5 Ersetzen von *galk* durch *gspC* bis *gspH* aus *S. oneidensis*, begleitet von der Integration des *tet*-Promoters (rot).

3.11 Funktionaler Test des heterologen T2SS

Um das heterolog exprimierte T2SS auf seine Funktionalität hin zu untersuchen, wurde das Plasmid pBAD_ *mtrF*_{löslich} in den Stamm JG520 transformiert. Das Plasmid trägt eine lösliche Form der finalen Eisenreduktase MtrF aus *S. oneidensis*. In dem klonierten Gen wurden die korrespondierenden Basenpaare für die ersten 32 Aminosäuren deletiert und durch die Sec-Signalsequenz aus dem Membranprotein OmpF ersetzt. Dadurch wurde die natürliche Modifikation mit einem Lipidanker verhindert und eine Sekretion des Cytochroms erreicht. Der Stamm JG788 wurde in M4 Medium (Tabelle 5) mit Glycerin und DMSO unter anoxischen Bedingungen für 24 h bei 30°C kultiviert, die Expression des T2SS mit 0,43 µM AHT und von MtrF_{löslich} mit 0,1 mM Arabinose induziert und anschließend der Zellüberstand gewonnen und ankonzentriert. Als Negativ-Kontrolle wurde die Expression von MtrF_{löslich} in einem zweiten Ansatz nicht induziert. Als Positiv-Kontrolle diente der *S. oneidensis* Stamm JG642. Die Zellen von JG642 wurden anoxisch in M4 Medium (Tabelle 5) mit Fumarat und Lactat kultiviert, die Expression von MtrF_{löslich} ebenfalls mit 0,1 mM Arabinose induziert und der Zellüberstand gewonnen. Alle drei Überstände wurden auf das gleiche Volumen ankonzentriert, auf ein SDS Gel geladen und die Hämgruppen angefärbt (Abbildung 27). In Stamm JG788 ist weder in der induzierten noch in der nicht-induzierten Probe eine Bande in der Hämfärbung zu erkennen. In Spur 3 ist der Zellüberstand des Stamms JG642 geladen. Hier ist auf der Höhe von ca. 60 kDa eine Bande zu sehen. Diese entspricht der löslichen Form von MtrF und zeigt, dass in *S. oneidensis* das Cytochrom als lösliche Form produziert und sekretiert wird. Eine Sekretion des Proteins in *E. coli* konnte nicht nachgewiesen werden.

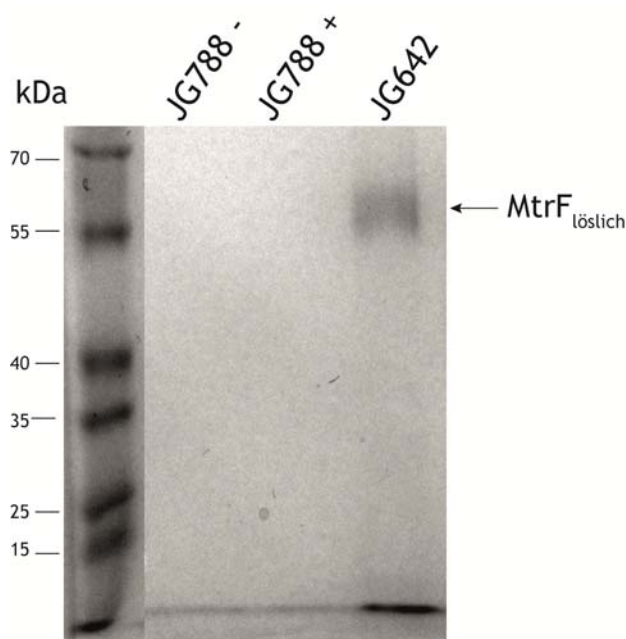


Abb. 27: **Hämgruppenfärbung von Zellüberständen verschiedener T2SS-Mutanten.** Zellen von *E. coli* JG788 sowie *S. oneidensis* JG642 wurden anoxisch kultiviert. Beide Stämme enthalten die lösliche Version des OMCs MtrF auf einem pBAD Plasmid; JG788 trägt die heterologen Gene *gspC* bis *gspN* aus *S. oneidensis* unter Kontrolle des *tet*-Promoters. Die Expression der Gene des T2SS wurde in diesem Stamm mit 0,43 µM AHT induziert und in einer Kontrolle im selben Stamm nicht induziert. In allen Stämmen wurde *mtrF*_{löslich} mit 0,1 mM Arabinose induziert. Jeweils 50 ml Zellüberstand wurden auf 500 µl ankonzentriert. Von dem ankonzentrierten Zellüberstand wurden jeweils 15 µl auf ein SDS-Gel geladen und die Hämgruppen angefärbt.

3.12 Transkriptionskontrolle der Gene des T2SS in *E. coli*

Da eine Funktionalität des T2SS in *E. coli* nicht nachgewiesen werden konnte, sollte die Transkription der einzelnen Gene genauer untersucht werden. Hierzu wurden unabhängige Triplikate des Stammes JG788 unter denselben Bedingungen kultiviert, wie im vorangegangenen Experiment beschrieben (3.11 Funktionaler Test des heterologen T2SS) und die Zellen geerntet. Die Triplikate wurden zusammengeführt und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und die Transkription der Gene des T2SS sowie von Kontrollgenen über PCR analysiert. Dazu wurde für jedes Gen des T2SS ein Primerpaar erstellt, welches einen kurzen, ca. 300-500 nt langen Bereich innerhalb des Gens amplifiziert (Primer 26-49, Abbildung 28).

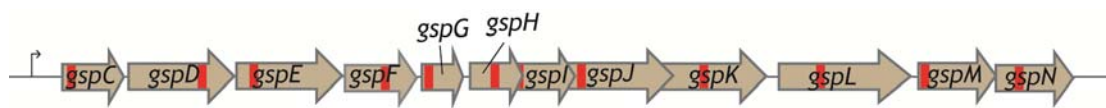


Abb. 28: Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen innerhalb der *gsp*-Gene. Die Bindestellen der Primer sind in rot markiert. Ihre Position, die Größe der Gene und ihr Abstand zueinander innerhalb des Clusters sind näherungsweise maßstabsgetreu.

Primer, welche an (c)DNA von housekeeping Genen binden, dienten als Positiv-Kontrolle (Primer 20-23, Gene *gyrA* und *rpoA*). Eine Kontamination der Proben durch genomische DNA wurde mit Hilfe von Primern ausgeschlossen, welche an intergene, nichttranskribierte Bereiche der DNA binden. In einer cDNA Probe ohne Verunreinigung mit genomischer DNA finden diese Primer kein Template und zeigen somit keine Bande im Agarose-Gel. Die Primer 24 und 25 dienten zur Negativ-Kontrolle. Abbildung 29 zeigt das Agarose-Gel. Dargestellt sind jeweils nebeneinander die Proben, in denen cDNA von JG788 ohne Induktion des T2SS (-), JG788 mit Induktion des T2SS(+) als Matrize diente und eine Kontrolle mit genomischer DNA von JG788 (K). PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren von *gyrA* und *rpoA* amplifizierten DNA-Fragmente mit cDNA von JG146 und JG788, ebenso wie mit genomischer DNA als Matrize; mit Kontrollprimern zum Ausschluss von Verunreinigungen mit genomischer DNA waren für die cDNA von JG788 - und JG788 + keine Banden sichtbar. Die Primer, welche in den Genen für *gspC*, *gspE*, *gspH*, *gspI*, *gspK* und *gspM* binden, ergaben PCR-Produkte in JG788 +; die Gene für *gspF*, *gspG*, *gspL* und *gspN* nicht. Für *gspI* ist eine sehr schwache Bande zu sehen. In JG788 - war für keines der Primerpaare eine Bande zu erkennen. Das Primerpaar zur Amplifikation von DNA aus *gspD* erbrachte auch in der Kontrolle mit genomischer DNA kein Produkt.

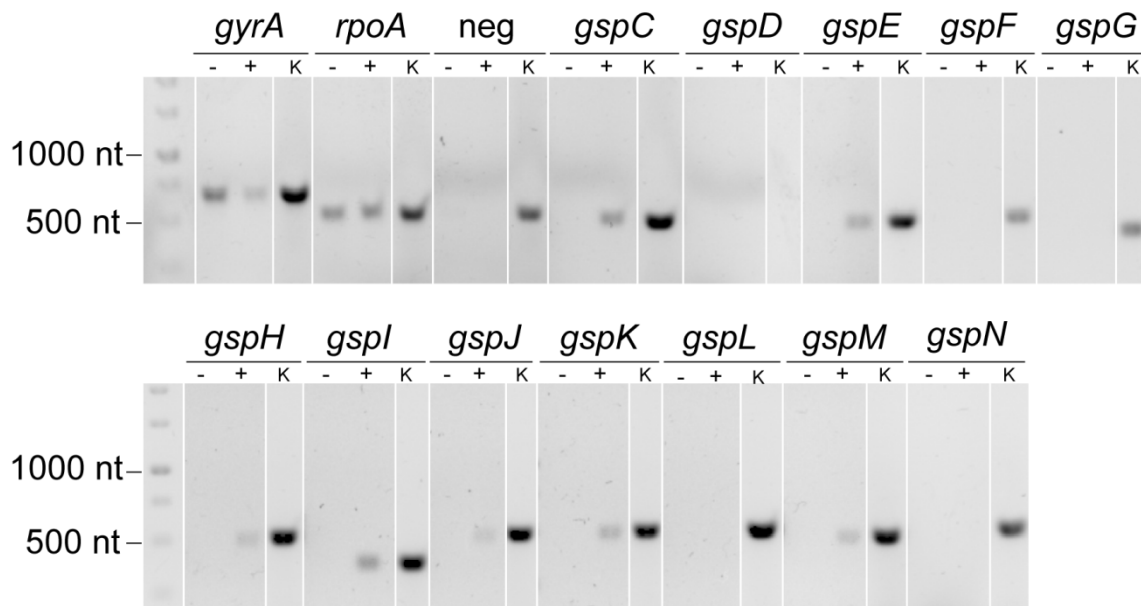


Abb. 29: **Transkription des T2SS in *E. coli*.** Die RNA des Stammes JG788 ohne (-) und mit (+) Induktion des T2SS wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA von JG788 (-) und JG788 (+) sowie genomische DNA von JG788 (K) dienen als Matrize für PCRs mit der Polymerase des Mango-Mix und 15 verschiedenen Primerpaaren. Die PCR Produkte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Gene aus denen Bereiche amplifiziert wurden sind eingezeichnet. Bereiche aus *gyrA* und *rpoA* wurden als positiv-Kontrollen ausgewählt. Das Primerpaar „neg“ amplifiziert einen intergenen, nicht-transkribierten Bereich der (chromosomalen) DNA und dient somit als Negativ-Kontrolle. Die Primerpaare *gspC* bis *gspN* amplifizieren Fragmente der heterolog exprimierten T2SS-Gene aus *S. oneidensis*. In JG788 - wurde keine Transkription der *gsp*-Gene detektiert. In JG788 + konnte nur für die Gene *gspC*, *gspE*, *gspH*, *gspI*, *gspK* und *gspM* eine eindeutige Transkription gezeigt werden. Die Gene für *gspF*, *gspG*, *gspL* und *gspN* werden in JG788 nicht transkribiert. Für *gspJ* ist nur eine sehr schwache Bande im Gel zu erkennen. Das Primerpaar zur Amplifikation von *gspD* zeigt auch in der Kontrolle keine Bande.

Teil 2: Intensivierung der Mikroben-Anoden-Interaktion natürlich-exoelektrogene Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin die Wirkung des Biofilm-induzierenden Peptids TisB auf *S. oneidensis* und sein Einfluss auf eine Intensivierung der Mikroben-Anoden-Interaktion in mikrobiellen Brennstoffzellen untersucht werden.

TisB ist ein 29 Aminosäuren langes Peptid, welches bei der SOS-Antwort von *E. coli* ausgeschüttet wird. Es induziert den Übergang der Zellen in ein dormantes Stadium und kann somit zum Schutz z. B. vor Antibiotika dienen. TisB wurde in der Arbeitsgruppe von Anne Ulrich synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Das Peptid wurde steril in 50%igem Ethanol in einer Konzentration von 1024 µg/ml gelöst und bei -20 °C gelagert. Der verwendete *S. oneidensis*-Stamm JG714 trägt ein *gfp*-Gen und eine Chloramphenicol-Resistenz im Genom. Die Expression von *gfp* ermöglichte eine gute Darstellung der Biofilme im Fluoreszenz-Mikroskop.

3.13 Analyse der Biofilmbildung

Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die optische Kohärenztomografie (OCT) ist ein bildgebendes Messverfahren und diente zur Quantifizierung der TisB-induzierten Biofilmbildung in *S. oneidensis*. Mit Hilfe der OCT-Messung wurde die mittlere Bedeckung der Wells einer Mikrotiterplatte mit Biofilm bei verschiedenen TisB-Konzentrationen ermittelt und verglichen. Die Auflösungsgrenze der Methode liegt bei 10 µm lateral und 2,1 µm axial. In Abbildung 30 ist die durchschnittliche Abdeckungsrate der Wells bei verschiedenen TisB-Konzentrationen und der entsprechenden Ethanol-Kontrollen ohne TisB dargestellt. Bei der höchsten TisB-Konzentration (256 µg/ml) wurde mit $32,5 \pm 10,4\%$ die größte Bedeckung gemessen, mit sinkender TisB-Konzentration nahm auch die Biofilmbildung annähernd linear auf Werte von $2,4 \pm 1,3\%$ Bedeckung bei einer Konzentration von 16 µg/ml TisB ab. Konzentrationen unterhalb von 16 µg/ml ergaben keine messbare Aggregatbildung. Für die Kontrollproben (Ethanol ohne TisB) konnte ebenfalls keine erhöhte Biofilmbildung gemessen werden.

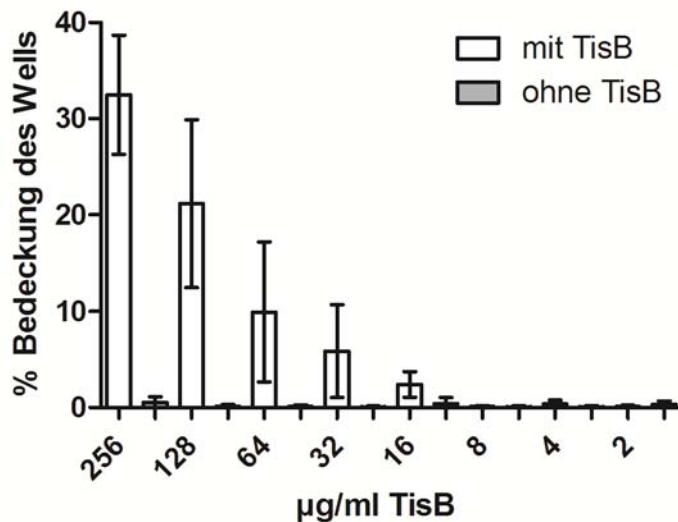


Abb. 30: **Prozentuale Bedeckung von Wells durch *S. oneidensis* bei verschiedenen TisB Konzentrationen.** *S. oneidensis* JG714 wurde bei verschiedenen TisB-Konzentrationen und den korrespondierenden Ethanol-Kontrollen in einer Mikrotiterplatte inkubiert und anschließend die Bedeckung der einzelnen Wells mit Biofilm mit Hilfe der OCT-Messung ermittelt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Messungen in unabhängigen Triplikaten.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biofilmbildung

Zum Vergleich der OCT Messungen mit einer weiteren bildgebenden Methode wurden die Zellen unter denselben Bedingungen kultiviert und die Aggregatbildung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops sichtbar gemacht. Hierzu wurden aus jedem Ansatz 5 µl entnommen, auf einen Objektträger pipettiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung untersucht. Jeder Ansatz wurde mehrfach mikroskopiert. In Abbildung 31 ist jeweils eine repräsentative Aufnahme abgebildet. Eine Zugabe von TisB führte bei allen Konzentrationen zur Bildung von Zellaggregaten. Bei 256 µg/ml waren diese nicht klar voneinander abgegrenzt und bildeten eine locker vernetzte Fläche. Verglichen dazu waren die Aggregate der nächst niedrigeren Konzentrationen sehr viel distinkter und es hatten sich einzelne, größere Flocken ausgebildet. Bei Konzentrationen von 128 und 64 µg/ml waren die Aggregate sehr dick und daher in der mikroskopischen Aufnahme nur leicht unscharf darzustellen. Mit abnehmender TisB Konzentration wurden die einzelnen Flocken kleiner und es traten vermehrt planktonische Zellen auf. Jedoch waren auch unter Zugabe von 2 µg/ml TisB noch distinkte Aggregate zu erkennen; während Ansätze bei denen TisB nicht zugegeben wurde, eine ausschließlich homogene Verteilung einzelner Zellen aufwiesen.

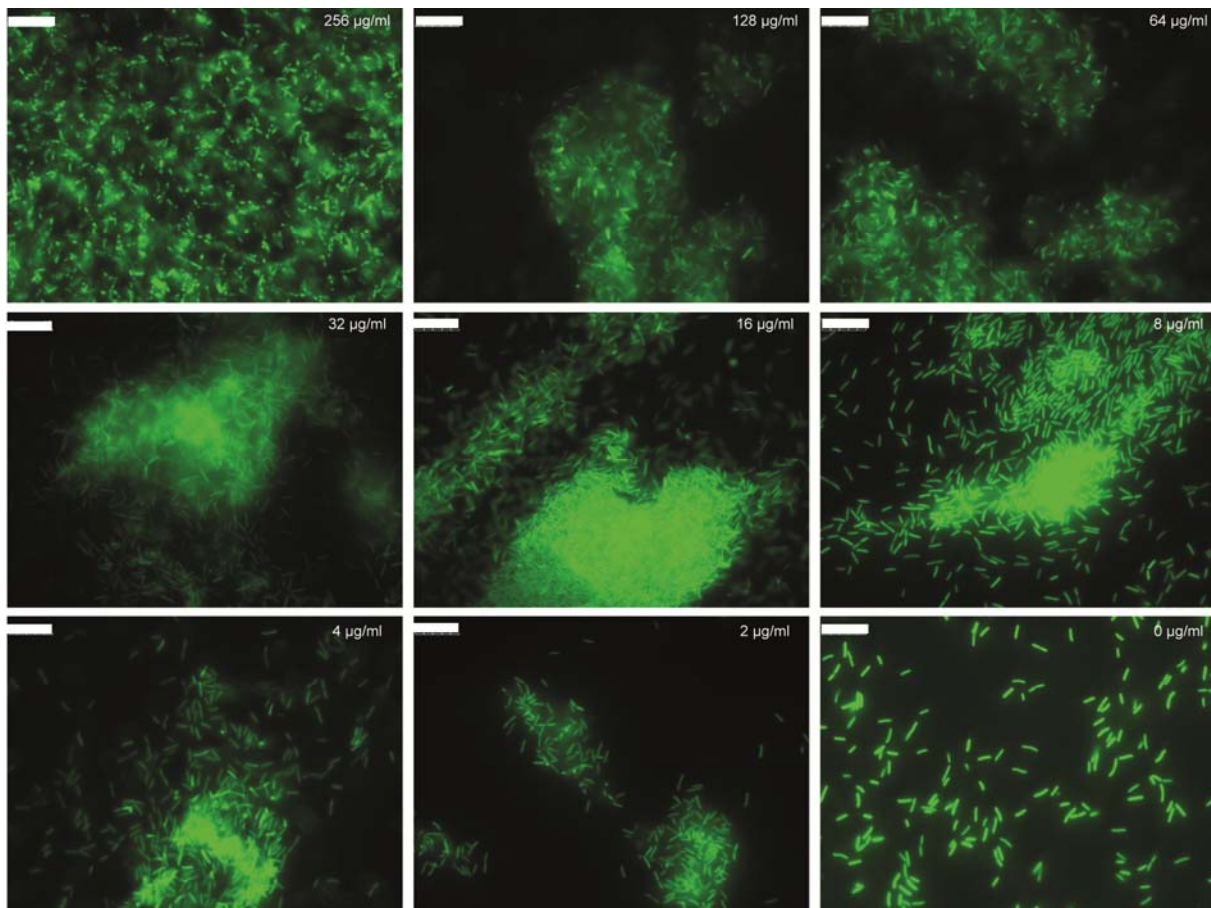


Abb. 31: **Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung von *S. oneidensis* Zellen bei verschiedenen TisB-Konzentrationen.** *S. oneidensis* JG714 wurde bei verschiedenen TisB Konzentrationen und den korrespondierenden Ethanol-Kontrollen inkubiert und mikroskopische Bilder von unabhängigen Triplikaten angefertigt. In der Abbildung ist jeweils eine repräsentative Aufnahme abgebildet. Die entsprechenden TisB-Konzentrationen und ein Größenmarker (10 µm) sind angegeben. In der Kontrolle (0 µg/ml) wurde eine zum Experiment mit 256 µg/ml äquivalente Menge Ethanol zugegeben, um einen rein auf Alkoholzugabe basierenden Effekt ausschließen zu können.

3.14 Mikrobielle Brennstoffzellen mit und ohne TisB

Um den Einfluss der verstärkten Biofilmbildung auf die Stromproduktion von *S. oneidensis* in mikrobiellen Brennstoffzellen zu untersuchen, wurde die Stromproduktion in unabhängigen Triplikaten von *S. oneidensis* JG714 mit und ohne Zugabe von TisB verglichen. In den mikrobiellen Brennstoffzellen wurde an der Anode ein Potential von 0 mV gegen NHE angelegt und die Atmosphäre in der Anodenkammer mit N₂ Gas konstant anoxisch gehalten.

Abbildung 32A zeigt den Stromverlauf der Brennstoffzellen über 48 Stunden. TisB wurden in einer Konzentration von 8 µg/ml zugegeben („mit TisB“). In den Kontrollen erfolgte die Zugabe einer äquivalenten Menge Ethanol („ohne TisB“). Unter beiden Bedingungen stieg die Stromproduktion in den ersten 10-12 Stunden rasch an und verblieb dann für ca. 24 h relativ konstant. In den Brennstoffzellen, in welchen TisB zugegeben wurden, begann nach etwa 30 Stunden der Strom

wieder abzusinken. Die mittlere Stromstärke wurde daher in der konstanten Phase zwischen 12 und 36 Stunden ermittelt. Ohne Zugabe von TisB produzierten die Zellen im Mittel $13,6 \pm 0,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ Strom. Die Zugabe von TisB resultierte in einer Steigerung der Stromproduktion um den Faktor 2,2 auf $29,9 \pm 2,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abbildung 32B).

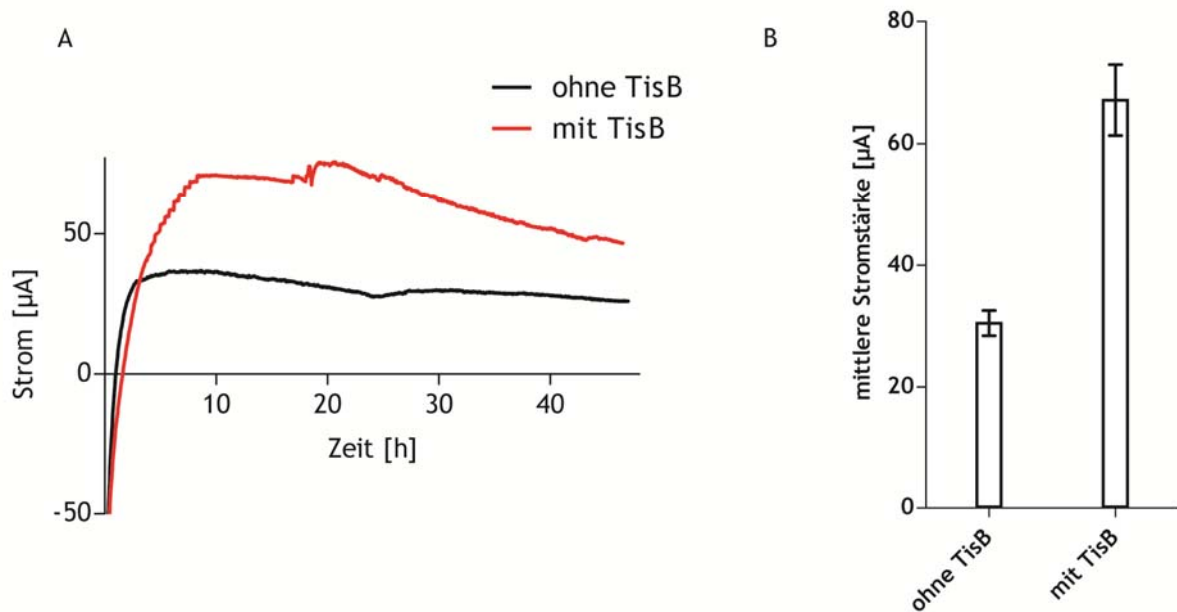


Abb. 32: **Stromproduktion durch *S. oneidensis* JG714 in MFCs bei gesteigerter Mikrogen-Anoden-Interaktion.** *S. oneidensis* Zellen von JG714 wurden hinsichtlich der Stromproduktion mit und ohne Zugabe von TisB in mikrobiellen Brennstoffzellen verglichen. Lactat diente als Kohlenstoffquelle. In der Anodenkammer wurde ein konstantes Potential von 0 mV (gegen NHE) angelegt. **A** Die Stromproduktion wurde mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) TisB in unabhängigen Triplikaten gemessen und der Mittelwert in der Abbildung dargestellt. Die ermittelten Werte variierten um weniger als 10%. **B** Die mittlere Stromstärke wurde im Zeitraum von 12 und 36 Stunden ermittelt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung der unabhängigen Triplikate.

3.15 Transkriptom-Analyse unter Biofilm-induzierenden Bedingungen

Um einen Einblick in einen möglichen Regulationsmechanismus der Biofilm-Bildung in *S. oneidensis* zu bekommen wurde das Transkriptom von Zellen mit und ohne Zugabe von TisB verglichen. Dazu wurden die Zellen in LB-Luria-Medium anaerob bei 30°C inkubiert. Dem Medium wurde eine Konzentration von 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TisB (in Ethanol gelöst) bzw. eine äquivalente Menge Ethanol zugegeben, um einen rein auf Alkoholzugabe basierenden Effekt ausschließen zu können. Nach vier Stunden wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und verbleibende Reste von genomischer DNA abverdaut. Die mRNA wurde angereichert und auf einem HiSeq1000 Sequenzer in der Arbeitsgruppe von Andreas Dötsch sequenziert. Die Daten der mRNA von Zellen mit und ohne TisB wurden miteinander verglichen. Die einzelnen Gene, ihre (putative) Funktion und die Änderungen der Transkription sind in Tabelle 35 dargestellt. Die Abbildung zeigt die sog. log2fc, d.h. eine Änderung wurde über den zweifachen Logarithmus berechnet. Eine Änderung von +1 bedeutet somit eine Verdopplung der Transkription eines Gens nach Zugabe von TisB; eine Änderung von -1

zeigt eine Halbierung der Transkription an. Insgesamt waren 34 Gene unter Zugabe von TisB signifikant reguliert; davon war die Transkription von 32 Genen hoch- und von 2 Genen runterreguliert. Werte, mit einer Änderung höher als +1 oder kleiner als -1 bei gleichzeitigem padj von kleiner gleich 0,05 wurden als signifikant erachtet. Der Padj-Wert (P-value adjusted) bezeichnet die angepasste Varianz der Transkripte. Im Anhang sind die Änderungen und padJ-Werte aller regulierten Gene aufgeführt.

Tab. 35: **Transkriptom-Analyse unter Biofilm-induzierenden Bedingungen.** Dargestellt sind die signifikanten Änderungen der Genexpression in *S. oneidensis* Zellen ohne TisB im Vergleich zu Zellen, die mit TisB inkubiert wurden. Änderungen in der Expression wurden als signifikant erachtet, wenn die Änderung über einem Wert von +1 oder unter einem Wert von -1 lagen, bei gleichzeitigem padj von kleiner gleich 0,05.

Gen	Genname	Änderung	Funktion des Proteins
SO0314	<i>speF</i>	2,15	Ornithin-Decarboxylase SpeF
SO0401		2,75	Putative NADPH-abhängige Quinon-Oxidoreduktase
SO0727		1,47	nicht charakterisiertes Protein
SO0728		1,36	nicht charakterisiertes Protein
SO0798		1,34	TonB-Abhängiger Rezeptor
SO0843		1,17	Transkriptioneller Regulator der LysR-Familie
SO0939		3,48	Split-soret Dihäm Cytochrom c
SO1326	<i>yhcC</i>	1,17	Protein der Radikal-SAM-Superfamilie YhcC
SO1532		1,37	periplasmatisches Protein
SO1760		-1,41	Protein der Aminosäure-Efflux-Pumpen-Permease
SO1917		1,31	Transporter für Wachstum mit DMSO der MFS-Superfamilie
SO1956		1,32	Phosphatidylthanolamin-bindendes Protein
SO2389	<i>emrD</i>	1,10	Multidrug Efflux Protein EmrD
SO2953	H	1,44	Schwanzlängen-messendes Protein H des Phagen Lambda
SO2955	G	1,59	Schwanzlängen-messendes Protein G des Phagen Lambda
SO2963		1,31	Hauptkapsid-Protein des Phagen Lambda
SO2964		1,57	proteolytische Untereinheit der ATP-abhängige Clp Protease
SO2968	A	1,35	Terminase A des Phagen Lambda
SO2973	R	1,31	Lysozyme R des Phagen Lambda
SO2978		1,22	Integrase des Phagen Lambda
SO2985	O	1,35	Replikationsprotein O des Phagen Lambda
SO3342		1,01	Homotrimerer Kationenkanal (TRIC)
SO3495		1,13	Protein der OsmC-Superfamilie

Ergebnisse

SO3542	<i>xfp</i>	1,04	D-Xylose 5-Phosphat/D-fFuctose 6-Phosphat Phosphoketolase Xfp
SO3667	<i>hmuZ</i>	1,03	FMN-bindendes Protein
SO3668	<i>hmuX</i>	1,08	Häm-Eisen bindendes Protein HmuX
SO3719		1,23	Cytochrom b561
SO3720	<i>hemG</i>	1,22	Sauerstoff-unabhängige Protoporphyrinogenoxidase HemG
SO3874		1,03	Transkriptioneller Regulator der LysR-Familie
SO4060	<i>phsC</i>	1,95	Membran-gebundene Komponente der Schwefelreduktase PhsC
SO4516		1,17	TonB-abhängiger Siderophorrezeptor
SO4700		1,03	Porin der äußeren Membran
SO4742	<i>glmR</i>	-1,12	Glucosamin-6-Phosphat sensitiver transkriptioneller Repressor der Lipopolysaccharid-Biosynthese GlmR
SO4761		1,81	nicht charakterisiertes Protein

4 Diskussion

Mikrobielle Brennstoffzellen (MFCs) sind eine neue und vielversprechende Technologie auf dem Gebiet der angewandten Biologie. In einer MFC wandeln Bakterien als Katalysatoren chemische in elektrische Energie um. Hierzu müssen die Organismen Elektronen des Stoffwechsels auf eine Anode übertragen können. Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen Mikroorganismen und einer Elektrode besser zu verstehen und somit intensivieren oder de novo etablieren zu können. Hierzu wurden zwei Strategien verfolgt: in einem synthetischen Ansatz wurde auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe aufgebaut und versucht, einen *E. coli*-Stamm in einen exoelektrogenen Organismus zu verwandeln, welcher in der Lage ist, effektiv Anoden-Atmung zu betreiben. Das zweite Ziel war es, in *S. oneidensis*, einem natürlich-exoelektrogenen Bakterium den Kontakt zur Anode zu intensivieren und somit die Stromproduktion in einer MFC zu verbessern.

Teil 1 A: Etablierung der Mikroben-Anoden-Interaktion in einem synthetischen exoelektrogenen Stamm

E. coli ist per se nicht in der Lage, Eisen zu reduzieren oder Elektronen direkt auf eine Anode zu übertragen. In Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Gescher konnte jedoch gezeigt werden, dass mit Hilfe der synthetischen Biologie *E. coli* durch eine heterologe Expression der Menaquinol-Oxidase CymA aus dem exoelektrogenen Modellorganismus *S. oneidensis* in einen dissimilatorischen Eisenreduzierer überführt werden kann. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese Fähigkeit zu optimieren und auf die Reduktion einer Anode hin auszuweiten.

4.1 Inventur des Periplasmas von *S. oneidensis*

S. oneidensis ist ein Modellorganismus für die Erforschung der Mechanismen der dissimilatorischen Eisenreduktion und der mikrobiellen Anodenreduktion. Bei dem Prozess der extrazellulären Fe(III)-Atmung wird die Energieerzeugung mit Hilfe eines Protonengradienten an der Cytoplasmamembran an die extrazelluläre Reduktion von Eisen-(III)-Verbindungen gekoppelt (Myers and Nealson, 1990). Die Herausforderung bei dieser Form der Atmung besteht darin, dass dreiwertiges Eisen unter neutralen pH-Bedingungen als unlöslicher Elektronenakzeptor vorliegt und die Zelle zur Reduktion die respiratorischen Elektronen auf ihre Oberfläche transportieren muss. Trotz intensiver Forschungsarbeiten ist zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt, welche Proteine an der verlängerten Elektronentransportkette von der Cytoplasmamembran, durch das Periplasma, über die äußere Membran und auf den extrazellulären Akzeptor beteiligt sind. Ein Grund dafür ist, dass in *S. oneidensis* die individuelle Expression von Genen für unterschiedliche Atmungswege kaum reguliert

ist und an der Atmung beteiligte Proteine funktionelle Überschneidungen aufweisen (Myers and Myers, 2003b). Besonders das Periplasma von *S. oneidensis* enthält eine große Zahl an Cytochromen, über deren Funktion bisher wenig bis gar nichts bekannt ist. Da klassische Herangehensweisen wie Deletionsmutanten oder Transposonmutagenesen zur Funktionsanalyse einzelner Proteine ausscheiden (Bretschger et al., 2007), verfolgte diese Arbeit einen anderen, neuen Ansatz um die Bedeutung einzelner periplasmatischer Cytochrome in *S. oneidensis* zu beleuchten. Die Cytochrome welche unter Eisen-reduzierenden Bedingungen im Periplasma von *S. oneidensis* exprimiert werden, sollten in dem ebenfalls Gram-negativen γ -Proteobakterium *Escherichia coli* charakterisiert werden. *E. coli* eignet sich besonders als Modellorganismus zur Untersuchung der dissimilatorischen Eisenreduktion, denn es ist genetisch gut verstanden und leicht zu manipulieren, besitzt nur 7 endogene *c*-Typ-Cytochrome und ist selbst nicht zur Eisenreduktion fähig. Ein *E. coli*-Stamm mit den Genen von zwei essentiellen Proteinen der dissimilatorischen Eisenreduktion im Genom (*cymA* und *mtrA*) war zu Beginn dieser Arbeit bereits vorhanden. Dieser Stamm (JG146) kann lösliches Eisen, zum Beispiel Eisen-NTA, reduzieren (Gescher et al., 2008).

Um herauszufinden, welche Cytochrome im Periplasma unter Eisen-reduzierenden Bedingungen exprimiert werden, wurde dieses mittels massenspektrometrischer Methoden analysiert und 12 verschiedene, lösliche Cytochrome detektiert. Nur für einige dieser Proteine ist eine Rolle in der anaeroben Atmung bekannt. MtrA (SO1777) ist neben CymA das einzige periplasmatische Cytochrom, was essentiell am Elektronentransfer auf die Zelloberfläche beteiligt ist. Eine Deletionsmutante dieses Cytochroms kann nicht mehr mit extrazellulären Eisenspezies als terminalem Elektronenakzeptor wachsen (Bretschger et al., 2007). Daher war es nicht überraschend, dieses Protein in der periplasmatischen Fraktion identifizieren zu können. FccA (SO0970) ist ein Flavo-Cytochrom, welches eine Rolle in der anaeroben Fumarat-Atmung in *S. oneidensis* spielt (Gordon et al., 1998, Schütz et al., 2009). Im Vergleich mit anderen Fumaratreduktasen ist dieses Enzym einzigartig, da es ein lösliches, monomeres Protein ist und eine Flavin-Domäne mit nicht-kovalent-gebundenem FAD und eine Tetrahäm-Domäne besitzt (Pessanha et al., 2009). Interessanterweise zeigt FccA unter Eisen-reduzierenden Bedingungen die deutlichste Bande in einer Hämgruppenfärbung im SDS-Gel. NrfA (SO3980), ein Penta-Häm-Cytochrom, katalysiert die Reduktion von Nitrit zu Ammonium und erhält seine Elektronen direkt von CymA (Gao et al., 2010). ScyA (SO0264) wird ebenfalls direkt von CymA reduziert und transferiert dann die Elektronen weiter auf die periplasmatische Peroxidase CcpA (SO2178). ScyA kann jedoch weder auf MtrA noch auf FccA Elektronen übertragen und stellt daher zusammen mit CcpA den seltenen Fall einer isolierten periplasmatischen Atmungskette in *S. oneidensis* dar (Schütz et al., 2011).

Das kleine Tetrahäm-Cytochrom STC zeigt ebenfalls eine prominente Bande im SDS-Gel, jedoch konnte diesem Protein bisher keine eindeutige physiologische Rolle zugeordnet werden (Ross et al., 2007, Bretschger et al., 2008). Eine Interaktion zwischen *CymA* und STC sowie *MtrA* und STC wird basierend auf NMR-Daten diskutiert (Fonseca et al., 2013). Eine Doppelmutante für STC und *FccA* zeigt starke Wachstumsdefizite auf Eisen, DMSO, Nitrat und Fumarat, kann aber durch eine einzelne Expression der Cytochrome gerettet werden (Sturm et al., 2014). Möglicherweise spielen beide Proteine also eine entscheidendere Rolle in *S. oneidensis* als bisher angenommen. Eine physiologische Rolle aller anderen detektierten Cytochrome ist bisher nicht bekannt.

4.2 Entwicklung eines Assays zur Charakterisierung der periplasmatischen Cytochrome und Etablierung eines neuen *E. coli*-Stammes

Um die im Periplasma detektierten, löslichen Cytochrome schnell und parallel in *E. coli* analysieren und charakterisieren zu können, wurde ein neuer Assay zum Vergleich der periplasmatischen Reduktionskraft entwickelt. Grundlage bildet Methylenblau, ein membran-gängiger Redox-Indikator. Dieser kann von verschiedensten Oxidoreduktasen reduziert werden (Roller, 1984), darunter den heterolog exprimierten *c*-Typ Cytochromen. Es wurde für unterschiedliche Redoxindikatoren getestet, ob und wie gut sie sich von *E. coli* reduzieren lassen, jedoch war nur bei Methylenblau eine Reduktion erkennbar. Dies begründet sich möglicherweise im Redoxpotential von Methylenblau, was mit 11 mV am höchsten lag und somit einen adäquaten Elektronenakzeptor für eine Vielzahl an Oxidoreduktasen darstellt (Roller, 1984). Basis für die Etablierung der neuen Testmethode bildeten drei *E. coli*-Stämme: der Wildtyp *E. coli* DH5 α ZI, der Stamm JG11, welcher *cymA* exprimiert und JG146, welcher neben *cymA* zusätzlich *mtrA* exprimiert. Für die beiden letzteren Stämme wurde bereits gezeigt, dass sie lösliche Eisenspezies reduzieren können und dass die gekoppelte Expression zu einer Erhöhung der Reduktionsrate führte (Gescher et al., 2008, Schütz et al., 2009). Daher eigneten sich die Stämme hervorragend, um einen Einfluss der Cytochromexpression auf die Methylenblau-Reduktion untersuchen zu können. Alle drei Stämme waren in der Lage, Methylenblau zu reduzieren, jedoch zeigte sich zwischen dem Wildtyp und JG11 eine Steigerung der Rate um fast 40%, welche auf die Expression von *cymA* und eine daraus resultierende größere Zahl an Elektronen im Periplasma zurück zu führen ist. Die zusätzliche Expression von *mtrA* erhöht die Methylenblau-Reduktionsrate um weitere 13%, was darauf hindeutet, dass *MtrA* als eine weitere Methylenblau-Reduktase im Periplasma fungieren kann. Die kombinierte Expression von *cymA* und *mtrA* führt zu einer deutlicheren Erhöhung der Eisen-Reduktionsrate (ca. 50%) als die der Methylenblau-Reduktionsrate. Möglicherweise funktioniert der Elektronentransfer von *MtrA* auf Eisen-NTA also besser als der auf Methylenblau. Dennoch konnte gezeigt werden, dass der neu entwickelte Assay eine geeignete Testplattform zur Analyse des Einfluss von periplasmatischen Cytochromen auf die

Reduktionskraft von *E. coli* darstellt und durch die schnellen und parallelen Messungen in einem Plattenlesegerät deutliche Vorteile gegenüber Wachstumskurven mit Eisen als terminalem Elektronenakzeptor bietet.

Anschließend an die Entwicklung des Methylenblau-Assays wurden die massenspektrometrisch detektierten periplasmatischen *c*-Typ Cytochrome aus *S. oneidensis* heterolog in JG146 co-exprimiert und ihre Methylenblau-Reduktionsraten verglichen. In den meisten Fällen war die Reduktionsrate im Vergleich zu JG146 nur leicht erhöht oder sogar erniedrigt; lediglich die Co-Expression des kleinen Tetrahäm-Proteins STC, des Monohäms SO4666, des Flavo-Cytochroms FccA und der Nitratreduktase NrfA steigerten die Reduktionsrate deutlich über die von JG146. Vergleicht man die Daten der Methylenblau-Reduktion mit einer Hämgruppenfärbung der periplasmatischen Fraktion von unter gleichen Bedingungen kultivierten Zellen, so wird deutlich, dass in vielen Fällen die wenig oder gar nicht gesteigerte Reduktion im Vergleich zu JG146 möglicherweise auf eine mangelhafte Expression der Cytochrome zurückzuführen ist. CcpA, IfcA, SoxA, FccA, SO3420, NrfA und SO4485 sind im Gel nur sehr schwach erkennbar oder nicht zweifelsfrei zu identifizieren. Nur für STC, SO4666, SO3300 und ScyA ist in eine deutliche Bande zu erkennen, die auf eine gute Expression des entsprechenden Cytochroms schließen lässt. Interessanterweise zeigen mit NrfA und FccA zwei der schwach exprimierten Cytochrome eine hohe Methylenblau-Reduktionsrate. Dies deutet entweder auf eine sehr gute Methylenblau-Reduktase-Aktivität dieser Proteine oder auf eine schlechte Expression oder fehlerhafte Maturisierung der Cytochrome und eine daraus resultierende Zelllyse hin. Durch die lysierenden Zellen kommen vermehrt zelluläre Oxidoreduktasen in Kontakt mit Methylenblau, was zu einer verfälscht erhöhten Rate führen kann. Hingegen werden SO3300 und ScyA gut exprimiert, ihre Produktion führt aber dennoch zu keiner erhöhten Reduktionsrate. Für SO3300 könnte dies bedeuten, dass das Cytochrom nicht von CymA reduziert werden kann. Die niedrige Reduktionsrate von ScyA ist überraschender, wurde seine Reduktion durch CymA doch bereits *in vitro* gezeigt (Schütz et al., 2009). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte jedoch das hohe Reduktions-Potential dieses Monohäm-Cytochroms sein, was es schwer oxidierbar macht (Fonseca et al., 2013). Von allen heterolog exprimierten Cytochromen ist besonders STC hervorzuheben, da eine Expression dieses Cytochroms in *E. coli* JG146 die Reduktionsrate von Methylenblau um über 183% steigert. Daher wurde in den folgenden Experimenten die CymA-abhängige *in vivo* und *in vitro* Reduktion von STC in *E. coli* untersucht.

4.3 Reduktion von STC in Abhängigkeit von CymA

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der Methylenblau-Reduktion von STC in JG146 wurde nun untersucht, ob die Elektronen von CymA auf STC übertragen werden und somit

respiratorischen Ursprungs sind. Hierzu wurde das Methylenblau-Reduktionsexperiment mit STC in einem *E. coli*-Stamm wiederholt, welcher sowohl defizient für CymA als auch für das orthologe Protein NapC ist. NapC ist eine Quinol-Reduktase und CymA sowohl in Größe als auch in der Aminosäuresequenz sehr ähnlich. Es übernimmt in *E. coli* daher im periplasmatischen Elektronentransfer eine ähnlich Rolle wie CymA in *S. oneidensis* (Richardson et al., 2001, Gescher et al., 2008). Die Reduktionsrate des Stammes $\Delta cymA \Delta napC$ pMAL_{stc} war nicht wesentlich über die des Wildtyps erhöht, was darauf hinweist, dass der positive Effekt der Expression von STC auf die Methylenblau-Reduktion von dem CymA-basierten Elektronentransfer ins Periplasma abhängig ist. Ebenso konnte der direkte Elektronentransfer von CymA auf STC in vitro gezeigt werden. Zusammengenommen zeigen die beiden zuletzt beschriebenen Experimente also, dass es möglich ist die Reduktion von STC an das respiratorische System in *E. coli* zu koppeln und so vermehrt Elektronen ins Periplasma transferieren zu können. Da diese Verbindung eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer Interaktion von *E. coli* mit einer Anode spielt, wurde STC ins Genom von JG146 integriert und der neue Stamm JG622 im Methylenblau-Assay getestet. Hier zeigte sich eine Erhöhung der Reduktionsrate um 78% verglichen mit dem Wildtyp und um 19% im Vergleich zum Stamm JG146. Eine niedrigere Reduktionsrate als in dem Stamm, welcher STC vom Plasmid aus exprimiert, wurde erwartet und ist durch eine geringere Kopienzahl des korrespondierenden Gens bei genomischer Expression in JG622 zu erklären. Trotzdem zeigt das Ergebnis, dass der Elektronentransfer über CymA ins Periplasma nicht limitierend und eine weiterer Erhöhung der Methylenblau-Reduktionsrate zu erwarten ist, wenn höhere Expressionslevel erreicht werden. Der neue, verbesserte *E. coli*-Stamm JG622 wurde daraufhin bezüglich seines elektrochemischen und metabolischen Verhaltens bei der Methylenblau-basierten Anoden-Reduktion in einer MFC untersucht.

4.4 Elektrochemische Charakterisierung von *E. coli* JG622

Der zelluläre Stoffwechsel ist eine Abfolge von eng aufeinander abgestimmten Oxidations- und Reduktionsprozessen, welche von der Elektronenbilanz her betrachtet ausgeglichen sein müssen. Das Recycling von internen Elektronenüberträgern wie NADH bei fermentativen Prozessen führt dabei in der Biotechnologie häufig zu unerwünschten (reduzierteren) Nebenprodukten. Ein Ansatz zur Vermeidung dieser Nebenprodukte ist die nicht-stöchiometrische Fermentation in MFCs. Hier dient eine Anode als Elektronenakzeptor, der nicht verbraucht werden kann und „überzählige“ Elektronen können auf die Anode statt auf reduzierte Nebenprodukte übertragen werden. Darüber kann eine größere Reinheit der Fermentationsprodukte erzielt werden (Flynn et al., 2010). Die vorangegangenen Experimente hatten klar gezeigt, dass über das heterolog exprimierte Cytochrom-

Modul bestehend aus CymA, MtrA und STC Elektronen respiratorischen Ursprungs ins Periplasma des Stammes JG622 transportiert werden können. Um dieses Vermögen für nicht-stöchiometrische Fermentationen nutzen zu können, wurde eine Anodeninteraktion auf Basis der Methylenblau-Reduktion etabliert. Eine Interaktion von Methylenblau mit der Anode konnte mit Hilfe der zyklischen Voltametrie gezeigt werden. Anschließend wurde das elektrochemische und metabolische Verhalten des Wildtyps und von JG622 bezüglich Stromproduktion und Substratverbrauch für Glukose und Glycerin als Kohlenstoffquelle verglichen.

Hierbei zeigte sich bei der Oxidation von Glukose eine um den Faktor 2,2 gesteigerte Stromproduktion, wenn das Cytochrom-Modul exprimiert wurde. Dieser Wert korreliert mit der um das 1,8 fache erhöhten Rate im Methylenblau-Assay und weist darauf hin, dass durch die heterologe Expression von CymA, MtrA und STC Methylenblau-vermittelt mehr Elektronen aus dem Periplasma auf die Anode transferiert werden können. Es ist erwähnenswert, dass die maximale spezifische Reduktionsrate von Glukose in JG622 und dem Wildtyp sowohl mit als auch ohne Potential in der MFC annähernd gleich schnell abnimmt. Dies führt zu dem Schluss, dass der größte Teil der Glukose fermentativ verstoffwechselt wird und die Anode nicht als essentieller Elektronenakzeptor dient. Dennoch verstärkt die Expression des Cytochrom-Moduls die Elektronentransferrate auf die Anode und unterstreicht, dass der synthetische Elektronentransferweg auch unter fermentativen Bedingungen aktiv ist.

Die Verwendung von Glycerin statt Glukose als Kohlenstoffquelle verändert das Bild der Stromproduktion ebenso wie die Unterschiede der Oxidationsraten zwischen den Stämmen. Glycerin wird deutlich langsamer verbraucht und die Stromproduktion bleibt daher länger auf einem relativ konstanten Niveau. Der Stamm JG622 produziert etwa 1,5-mal mehr Strom als der Wildtyp und verbraucht das Glycerin 1,6-mal schneller. Im Gegensatz zur Oxidation von Glukose ist der Verbrauch von Glycerin verstärkt an das Vorhandensein einer Anode als Elektronenakzeptor gekoppelt. In MFCs, in denen kein Potential angelegt wurde, verbraucht der Stamm JG622 das Substrat weniger als halb so schnell, was darauf hinweist, dass respiratorische Elektronen zur Glycerin-Oxidation beitragen. Im Wildtyp ist die Glycerin-Oxidation langsamer als in JG622 und ohne Zugabe von Methylenblau und Anlegen eines Potentials an der Anode kann kaum Substrat verbraucht werden. Der Elektronentransfer ist somit abhängig von der Expression des Cytochrom-Moduls und der Verfügbarkeit von Methylenblau als Elektronenshuttle. Da eine Anoden-gekoppelte Oxidation für Glycerin gezeigt werden konnte, diente dieses Substrat für alle weiteren Experimente als Kohlenstoffquelle.

4.5 Verbesserte fermentative Glycerin-Oxidation in *E. coli* durch Co-Kultivierung von *M. formicicum*

Erst seit einiger Zeit ist bekannt, dass *E. coli* Glycerin unter bestimmten Bedingungen fermentativ oxidieren kann. Als Voraussetzungen dafür gelten hohe Glycerin- sowie niedrige Phosphat- und Kaliumkonzentrationen im Medium ebenso wie ein niedriger pH-Wert (Dharmadi et al., 2006) (Gonzalez et al., 2008). Um die Oxidation von Glycerin unter anoxischen Bedingungen besser zu verstehen und dadurch die Anoden-basierte Glycerin-Oxidation verbessern zu können, wurde der fermentative Verbrauch bei unterschiedlichen Bedingungen verglichen. 30 mM Glycerin wurden sowohl einer reinen *E. coli*-Kultur (DH5 α ZI) als auch einer Mischkultur bestehend aus *E. coli* und dem methanogenen Archaeum *Methanobacterium formicicum* ohne Zugabe eines Elektronenakzeptors als Substrat angeboten und es wurden die Abnahme des Substrats, die Produktentstehung und der pH-Verlauf in der Kultur gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Oxidation des Glycerins vergleichbar langsam wie bei DH5 α ZI-Zellen in den MFCs ohne angelegtes Potential abläuft und unter diesen Bedingungen in 100 Stunden nur ca. 60% des Substrats verbraucht wurden. Die Co-Kultivierung von *E. coli* und *M. formicicum* resultierte in einer um das 11-fache gesteigerten Glycerin-Oxidationsrate und führte zu einem kompletten Verbrauch des Substrats in nur 53 Stunden. Außerdem blieb der pH-Wert unter diesen Bedingungen annähernd konstant, während er in der reinen *E. coli*-Kultur schnell absank. Dies liegt zum einen daran, dass *M. formicicum* Formiat zu CO₂ und Methan oxidiert und somit eine organische Säure aus dem Medium entfernt und zum anderen daran, dass bei der methanogenen Formiat-Oxidation NaOH entsteht und das Medium zusätzlich alkalisier wird. Das Entfernen von Formiat aus dem Gleichgewicht und der konstantere pH-Wert führten zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung des Produktspektrums zu mehr Succinat und weniger Ethanol verglichen mit der reinen *E. coli* Kultur.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wachstumsbedingungen sind entgegengesetzt zu denen, die bisher als optimal für die Fermentation von Glycerin beschrieben wurden. In vorangegangenen Studien lag der optimale pH-Wert bei 6,3 und die Glycerin-Konzentration war mit 110 mM fast 4-mal höher. Außerdem war es notwendig, die Zellen unter einer offenen Argon-Atmosphäre zu kultivieren, um eine Anreicherung von Wasserstoff zu verhindern, welche das Zellwachstum einschränkte (Murarka et al., 2008, Beyer et al., 2013). Neben einem höheren pH-Wert und einer niedrigeren Glycerin-Konzentration war es in dieser Arbeit auch möglich, die Experimente in geschlossenen Gefäßen durchzuführen. Es stellt sich also die Frage, warum *M. formicicum* so eine bedeutende Auswirkung auf die katabolische Aktivität von *E. coli* hat. Ein Grund könnte der stabile pH-Wert sein, welcher für höhere Umsatzraten unter optimalen pH-Bedingungen sorgt. Der neutrale pH-Wert hat weiterhin Einfluss auf den Formiat-Kanal FocA, welcher kürzlich als genereller Transporter für Endprodukte der gemischten Säuregärung beschrieben wurde (Beyer et al., 2013).

Die Aktivität dieses Proteins ist pH-abhängig. Wenn der pH-Wert unter 6,8 sinkt, fungiert FocA als Protonen/Formiat-Importer, was zu einer Anhäufung von Endprodukten der gemischten Säuregärung im Cytoplasma führt (Trchounian et al., 2012a, Trchounian, 2012b). Die Co-Kultivierung verhindert das Absinken des pH-Werts und kann so die generelle Aktivität von FocA als Formiat-Exporter stabilisieren. Dennoch zeigten Dharmadi et al. hohe Glycerin-Oxidationsraten bei niedrigen pH-Werten. Eine mögliche Erklärung liegt in einer erhöhten Aktivität des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes unter leicht sauren Bedingungen (Dharmadi et al., 2006, Trchounian et al., 2013).

Ein weiterer Grund für eine erhöhte Glycerin-Oxidation unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen scheint auch die Umwandlung von Formiat zu Methan und CO₂ zu sein, welche eine Anhäufung von Wasserstoff reduziert. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Wasserstoffkonzentration in der Gasphase der Kultur eine Haupt-Limitierung der Glycerin-Fermentation darstellen (Dharmadi et al., 2006, Gonzalez et al., 2008). Somit ist die erhöhte Glycerin-Oxidation vermutlich auf eine Mischung aus stabilerer FocA-Aktivität und reduzierter Wasserstoffkonzentration in der Atmosphäre zurückzuführen.

Interessanterweise sind in der Co-Kultur gleiche Mengen an Succinat und Ethanol entstanden, während in der reinen *E. coli*-Kultur mehr Ethanol und weniger Succinat produziert wurden. Somit wurde das Produktspektrum von Alkohol zu organischen Säuren verschoben, möglicherweise begründet durch den konstant neutralen pH-Wert. In der Co-Kultur wurde 1 g Glycerin zu 0,6 g Succinat umgesetzt, was 50% mehr ist verglichen mit der Glycerin-Fermentation eines genetisch veränderten *E. coli*-Stammes, welcher die Dihydroxyaceton-Kinase von *Citrobacter freundii* überexprimiert (Gonzalez et al., 2008). *M. formicicum* kann in einer Vielzahl von Standard-Medien wie LB, PBS oder BG11 Medium kultiviert werden (Richter and Gescher, 2014), womit die beschriebenen Wachstumsbedingungen Potential bieten für eine biotechnologische Produktion von Succinat haben, das aktuell eine sehr gefragte Chemikalie zur Herstellung von Biopolymeren darstellt (Bechthold et al., 2008).

4.6 Methylenblau-basierte und Anoden-unterstützten Glycerin-Respiration in JG622

Alle bisher beschriebenen elektrochemischen Experimente wurden in Polycarbonat-Reaktoren durchgeführt, welche zu Aufrechterhaltung anoxischer Verhältnisse konstant mit einer Gasmischung aus N₂/CO₂ durchspült wurden. Im Zuge der Experimente wurde festgestellt, dass flüchtige Substanzen wie Formiat oder Ethanol durch diese Begasung ausgetrieben werden und so keine quantitative Analyse der Endprodukte möglich ist. Diese ist jedoch notwendig, um Rückschlüsse auf eine fermentative oder respiratorische Natur der metabolischen Prozesse während der Anoden-gestützten Glycerin-Oxidation ziehen zu können. Daher wurde ein neuer Glas-Reaktor entworfen, der

gasdicht geschlossen werden kann und somit eine quantitative Analyse aller Stoffwechselprodukte erlaubt. Um eine Anreicherung von Formiat und die daraus resultierende Verlangsamung der Glycerin-Oxidationsrate zu vermeiden, wurde auch in diesem Experiment der *E. coli*-Stamm zusammen mit *M. formicicum* kultiviert und der Einfluss dieser Co-Kultivierung auf die Anodengestützte Glycerin-Oxidation untersucht.

56,6 mmol Glycerin wurden von der Co-Kultur zu Acetat, Ethanol und Methan umgesetzt. Formiat konnte nicht detektiert werden; demzufolge resultierte die Methan-Entstehung höchstwahrscheinlich aus der Oxidation von Formiat zu CO₂ und Methan durch *M. formicicum*. Auch die Entstehung von Succinat und Lactat wurde nicht gemessen. Ersteres liegt in der Δ *frd*-Mutation von JG622 begründet. Die Entstehung von Lactat wird auch in anderen Studien zur anaeroben Glycerin-Oxidation in *E. coli* nicht beobachtet (Dharmadi et al., 2006).

Eine genauere Betrachtung der Substrat-Oxidation bezüglich der Elektronenbilanz zeigt, dass die Oxidation von Glycerin zu Pyruvat zu einer Freisetzung von 4 Elektronen führt. In den folgenden Schritten von Pyruvat zu Acetyl-CoA (katalysiert durch die Pyruvat-Formiat-Lyase) und dem ATP-erzeugenden Schritt vom Acetyl-CoA zu Acetat (katalysiert durch die Acetat-Kinase) werden keine weiteren Elektronen frei. Dagegen verbraucht die Reduktion von Acetyl-CoA zu Ethanol 4 Elektronen. Somit sollte bei der Glycerin-Gärung theoretisch pro mol fermentiertem Glycerin ein mol Ethanol entstehen, um die Elektronenbilanz auszugleichen. Tatsächlich liegt die Redoxbilanz in der Brennstoffzelle bei 23%, wenn das Cytochrom-Modul von JG622 induziert ist. Dieser Wert erhöht sich auf 66%, wenn eine Induktion der Cytochrom-Expression ausbleibt (berechnet aus der Gesamt-Redox-Bilanz bezogen auf Glycerin). Die Verschiebung der Redox-Bilanz zeigt sich auch in der Zahl der Elektronen, die pro verbrauchtem Glycerin-Molekül auf die Anode übertragen wurden. Die Induktion des Cytochrom-Moduls steigert diese um den Faktor 2,7. Dieser Wert spiegelt sich in der 2,9-fach erhöhten Redox-Bilanz in den Brennstoffzellen ohne Expression der Cytochrome wieder. Zusammengefasst geben diese Daten einen klaren Hinweis darauf, dass ohne das Cytochrom-Modul der Stoffwechsel von einer eher respiratorischen Lebensweise hin zur Fermentation verschoben ist. Außerdem kann mit diesem Ergebnis gezeigt werden, dass es möglich ist, durch die Expression von drei heterologen Cytochromen *E. coli* ein neues, Methylenblau-gestütztes, respiratorisches Programm zu eröffnen. Unter komplett fermentativen Bedingungen liegt die Redoxbilanz von *E. coli* bei ca. 95% (Murarka et al., 2008). Daher muss angenommen werden, dass auch ohne die Expression der respiratorischen Elektronentransportkette eine Art „erweiterte Fermentation“ (*facilitated fermentation*) stattfindet. Da Methylenblau ein Membran-gängiges Shuttle ist, können auch cytoplasmatische Reduktasen unspezifisch Elektronen darauf übertragen. Dies sorgt für eine scheinbare Verschiebung einer Gärung in Richtung einer Anoden-basierte Atmung. Diese

Eigenschaft kann auch in den mikrobiellen Brennstoffzellen mit *E. coli*-Wildtyp-Zellen beobachtet werden (Abbildung 18).

4.7 Generelle Betrachtungen zu *E. coli* als Strom-produzierendem Organismus in MFCs

In der letzten Zeit wurden einige Publikationen zu MFCs mit *E. coli* als katalytisch wirkendem Bakterium veröffentlicht, welche zeigen, dass *E. coli* sowohl durch Zugabe von exogenen Shuttle-Substanzen wie Neutralrot als auch in Mediator-freien MFCs Strom produzieren kann (Park and Zeikus, 2000, Zhang et al., 2006). Einige Autoren schlagen für letzteren Fall die endogene Sekretion von Hydrochinonen oder anderen löslichen Molekülen wie Pyocyanin als mögliche Elektronencarrier vor (Wang et al., 2007, Qiao et al., 2008, Zhang et al., 2008). In einer neuen Studie von 2014 wird gezeigt, dass *E. coli* in einer Mediator-freien MFC eine lösliche Komponente sekretiert, die sich aufgrund der schlechteren Löslichkeit im oxidierten Zustand an der Anode anreichert und so zum langsamen Abfall der Stromproduktion in Langzeit-MFCs führen kann (Nguyen et al., 2014). Yong et al. erhöhen die Stromproduktion in *E. coli* durch heterologe Expression eines Porins aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches die Membranpermeabilität erhöht und den Elektronentransfer von Riboflavin als Shuttle ermöglicht (Yong et al., 2013).

Ein Vergleich der erzielten Leistung in einem MFC-Reaktor mit Literaturdaten ist generell schwierig, da es keine allgemeine Routine für die Durchführung von elektrochemischen Experimenten gibt und die experimentellen Bedingungen meist stark bezüglich Anodenmaterial, elektrochemischem Setup, Medium und Substrat variieren (Logan, 2009). In einigen Studien werden Steigerungen der Leistung von 100 auf 600 mW/m² erzielt (Park and Zeikus, 2000, Schroder et al., 2003), jedoch dienten hier Platinelektroden als Anode und eine Stromproduktion basierend auf der elektrokatalytischen Oxidation von Glukose durch Platin scheint wahrscheinlicher als vermittelt durch die Bakterien. Auch in einer Mediator-freien MFC mit Kohlenstoffanode werden Leistungen im Bereich von mehreren 100 mW/cm² beschrieben (Zhang et al., 2006). In dem in dieser Arbeit beschriebenen MFC-Reaktor mit Methylenblau als Shuttle, in welchem Glycerin durch die Co-Kultur aus *E. coli* und *M. formicicum* Anoden-vermittelt oxidiert wird, liegt die erzielte Leistung somit mit $196,3 \pm 0,18$ mW/m² innerhalb dieser Größenordnung. Die Leistung wurde unter Annahme eines typischen Kathodenpotentials von 400 mV berechnet (Logan 2008).

Teil 1 B: Untersuchungen zum Elektronentransfer über die äußere Membran

Für eine Mediator-freie Interaktion von *E. coli* mit einer Anode ist es essentiell, dass eine terminale Reduktase an der Außenseite der äußeren Membran verankert ist. In *S. oneidensis* sind MtrC wie auch die vier anderen *c*-Typ-Cytochrome der äußeren Membran über einen Lipid-Anker in der äußeren Membran fixiert. Für eine korrekte Orientierung und damit die Fähigkeit, Eisen(hydr)oxide oder eine Anode zu reduzieren, braucht *S. oneidensis* ein funktionelles Typ-II-Sekretionssystem, welches die terminalen Reduktasen über die äußere Membran sekretiert (Shi et al., 2008). Das T2SS besteht in *S. oneidensis* und *E. coli* aus zwei Genclustern; dem kleinen Operon aus *gspA* und *gspB* sowie dem großen Operon, was sich aus den Genen *gspC* bis *gspN* bzw. *gspO* zusammensetzt.

Für das äußere Membrancytochrom OmcA wurde bereits gezeigt, dass auch in *E. coli* das T2SS für eine korrekte Orientierung notwendig ist. Dabei ist OmcA sowohl in *E. coli* K-12 als auch in *E. coli* B in der äußeren Membran lokalisiert. Der B-Stamm verfügt jedoch im Gegensatz zum Stamm K-12 über ein funktionierendes Typ-II-Sekretionssystem. In Reduktionsversuchen können nur Zellen des B-Stammes unlösliche Eisen(hydr)oxide reduzieren, was darauf schließen lässt, dass OmcA nur mit einem intaktem T2SS Zugang zum externen Akzeptor bekommt und Elektronen darauf übertragen kann (Donald et al., 2008). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des T2SS in dem K-Stamm nicht ausreichend ist für eine korrekte Orientierung von MtrC, was sich vermutlich in der hohen Spezifität und Selektivität des T2SS für bestimmte Exoproteine begründet (Richter, 2009). Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, das gesamte T2SS aus *E. coli* durch das von *S. oneidensis* zu ersetzen, um so einen Export der terminalen Reduktase in die äußere Membran zu ermöglichen.

4.8 Der Einfluss von *gspBA* auf die Eisenreduktion in *S. oneidensis*

Über die Funktionsweise des T2SS in Gram-negativen Bakterien im Allgemeinen sowie in *E. coli* und *S. oneidensis* im Besonderen ist bisher nur sehr wenig bekannt. In *E. coli* wird für die Komponenten GspA und B eine regulatorische Funktion vermutet (Francetic et al., 2000); für *S. oneidensis* ist bisher keine Funktion bekannt. Vor der Übertragung des T2SS aus *S. oneidensis* in *E. coli* wurde zunächst der Einfluss des kleinen Operons auf die Eisenreduktion in *S. oneidensis* untersucht. Hierzu wurden *gspA* und *gspB* aus dem Genom deletiert und die Zellen mit Eisen(III)citrat als Elektronenakzeptor kultiviert. Eisen(III)citrat ist eine lösliche Eisenspezies, welche jedoch nicht membrangängig ist (Pitts et al., 2003, Schickberger et al., 2012). Daher ist die korrekte Lokalisierung und Orientierung der OMCs entscheidend für eine Reduktion des Elektronenakzeptors. Es wurde kein Wachstumsunterschied zwischen dem Wildtyp und der $\Delta gspBA$ Mutante festgestellt, wohingegen eine $\Delta gspD$ Mutante (für die bereits gezeigt wurde, dass sie nicht mehr mit extrazellulären Akzeptoren wachsen kann und ihre OMCs falsch orientiert sind (Shi et al., 2008, Richter et al., 2010) Eisen(III)citrat nicht reduzieren konnte. Aus diesem Resultat kann geschlossen werden, dass das

gspBA-Gencluster in *S. oneidensis* keine entscheidende Rolle bei der extrazellulären Atmung spielt, weshalb es nicht in *E. coli* transferiert wurde.

4.9 Funktionalität des T2SS aus *S. oneidensis* in *E. coli*

Da das T2SS ein komplexes Exportsystem ist und sich aus einem Gencluster von fast 12 kb zusammensetzt, wurde es in mehreren Teilschritten und unter Zuhilfenahme verschiedener Klonierungsmethoden in das Genom von *E. coli* integriert. Das native T2SS wurde mittels der *galk*-Methode deletiert und anschließend mit einer Kombination aus *gene-gorging* und *galk*-Selektion durch das heterologe T2SS ersetzt. Um die Funktionalität des neu integrierten T2SS zu testen wurde der Export des löslichen OMCs MtrF_{löslich} untersucht. MtrF wurde gewählt, da es eine größere Aktivität als MtrC besitzt (Bücking et al., 2010) und es des Weiteren Hinweise darauf gibt, dass eine starke Expression von MtrC in *S. oneidensis* einen toxischen Effekt verursacht, welcher bei MtrF ausbleibt (Popp, 2009). Durch Deletion des Lipidankers des Proteins wurde eine Sekretion von MtrF_{löslich} in das umgebende Medium erreicht, wodurch eine Untersuchung der Aktivität des T2SS durch eine Hämgruppenfärbung des ankonzentrierten Zellüberstandes leicht möglich war. Der Vergleich der Zellüberstände von *E. coli* mit heterologem T2SS und *S. oneidensis* ergab jedoch, dass MtrF_{löslich} nur in *S. oneidensis* sekretiert wird und das T2SS in *E. coli* nicht funktional ist.

Da eine Funktionalität des T2SS in *E. coli* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Transkription der einzelnen Gene genauer untersucht und dabei festgestellt, dass nicht alle Gene des *gsp*-Operons transkribiert werden. Mit GspF, GspG, GspL und GspN fehlen wichtige Komponenten des Pseudopilus und der Plattform in der Cytoplasmamembran, wodurch sich die fehlende Funktionalität erklären lässt. Interessanterweise fehlen Transkripte von Genen an verschiedenen Orten des Operons; die nicht-erfolgte Transkription einzelner Gene lässt sich also nicht mit einer Abnahme der Transkriptionsstärke bei zunehmender Entfernung vom Promotor erklären. Vielmehr scheint es einen weiteren Regulationsmechanismus innerhalb der Expression des T2SS zu geben, über den bisher nichts bekannt ist. Eine Herangehensweise zur Aufklärung dieses Phänomens und möglicherweise zu einer erfolgreichen Aktivierung der Sekretion von OMCs in *E. coli* könnte das Einbringen von weiteren Promotoren vor die bisher nicht-transkribierten Gene sein.

Teil 2: Intensivierung der Mikroben-Anoden-Interaktion natürlich-exoelektrogener Stämme

Neben der Etablierung einer Interaktion von *E. coli* mit einer Anode sollte im Rahmen dieser Arbeit in einer Kooperation mit der Gruppe von Frau Prof. Ulrich zusätzlich versucht werden, den Elektrodenkontakt von *S. oneidensis* zu intensivieren und somit die elektrische Leistungsfähigkeit des Organismus zu verbessern.

Beim Mediator-freien Transfer von Elektronen auf eine Anode oder einen anderen unlöslichen, extrazellulären Elektronenakzeptor haben Mikroorganismen unterschiedliche Strategien entwickelt. Die Reduktion von Eisen oder einer Anode beruht in *S. oneidensis* auf einer Kombination aus dem direkten Kontakt der OMCs auf der Zelloberfläche zum Akzeptor und der Sekretion endogener Shuttle, wohingegen *G. sulfurreducens* vermehrt Biofilme auf einer Anode bildet und Elektronen über ein leitfähiges Netzwerk durch mehrere Zellschichten bis zur Anode transferieren kann (Hartshorne et al., 2009, El-Naggar et al., 2010, Jiang et al., 2010). Gegenüberstellende Analysen zwischen beiden Modellorganismen haben gezeigt, dass *G. sulfurreducens* verglichen mit *S. oneidensis* auf unterschiedlichen Anodenmaterialien stets in größerer Zahl auf der Anode vorkommt und höhere Stromdichten erzielt (Dolch et al., 2014). Daher war der Ansatz zur Intensivierung des Kontaktes von *S. oneidensis* zu einer Anode die Biofilm-Bildung des Organismus zu verstärken.

Verstärkung der Biofilm-Bildung durch TisB

Zur Induktion der Biofilm-Bildung diente TisB, ein 29 Aminosäuren langes Peptid, welches bei der SOS-Antwort von *E. coli* ausgeschüttet wird. Es konnte mit verschiedenen optischen Methoden gezeigt werden, dass unterschiedliche Konzentrationen von extern zugegebenem TisB eine Aggregatbildung von *S. oneidensis* induzieren. Aufnahmen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop zeigten Zellaggregate bei allen TisB-Konzentrationen, jedoch wurden die einzelnen Zellflocken mit abnehmender TisB Konzentration kleiner und es traten vermehrt planktonische Zellen auf. Dennoch waren auch unter Zugabe der geringsten TisB-Konzentration (2 µg/ml) noch distinkte Aggregate zu erkennen; während Ansätze bei denen TisB nicht zugegeben wurde, eine ausschließlich homogene Verteilung einzelner Zellen aufwies. Bei der parallelen Messung der Biofilme in einem OCT ergaben TisB-Konzentrationen unterhalb von 16 µg/ml keine messbare Aggregatbildung. Dies ist auf die deutlich geringere Auflösung dieser Methode zurückzuführen, da hier nur Partikel größer als 10 x 2 µm detektiert werden können. Zusammengefasst ergaben diese Ergebnisse eine Arbeitskonzentration von 8 µg/ml TisB für die weiterführenden Analysen in MFCs, da so eine ausreichende Biofilmbildung bei gleichzeitig geringem und somit kostensparendem Einsatz von TisB möglich schien.

Steigerung der Stromproduktion durch Zugabe von TisB

Die Zugabe von TisB zu einer *S. oneidensis*-Kultur in einer MFC steigerte die Stromproduktion um den Faktor 2,2 verglichen mit einer Kultur ohne TisB. Parallele Studien zur Zahl der sessilen Zellen mit oder ohne Zugabe von TisB in MFCs ergaben unter Zugabe von 8 µg/ml TisB einen prozentualen Anteil von 8,9% der Zellen auf dem Anodenmaterial, wohingegen nur 5,5% auf dem Anodenmaterial

anhafteten wenn kein TisB zugegeben wurde (Vogel, 2013). Somit kann die erhöhte Leistung in der MFC durch Zugabe von TisB mit einer verstärkten Besiedelung der Anode mit Zellen begründet werden. Weiterführende Untersuchungen mit verschiedenen TisB-Konzentrationen könnten diese These unterstützen und möglicherweise die Leistung der MFC weiter steigern.

Regulation der Transkription nach Induktion der Biofilm-Bildung

Da die Zugabe von TisB zu einer Kultur von *S. oneidensis* zu der Bildung von Zellaggregaten und einer Leistungssteigerung in der MFC führte, wurde das Transkriptom von Zellen mit und ohne Zugabe von TisB verglichen, um dadurch Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen der Biofilm-Bildung in *S. oneidensis* zu bekommen. Die signifikante Regulation von 34 Genen wurde ermittelt; einige der regulierten Gene sind potentiell an der Biofilm-Bildung der Zellen beteiligt.

Unter den transkriptionell hochregulierten Genen ist die Ornithin-Decarboxylase SpeF, ein Enzym, welches an der Umwandlung von L-Ornithin zu Putrescin beteiligt ist. Putrescin ist ein häufiges bakterielles Polyamin und spielt in *E. coli* eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der äußeren Membran und dem Schutz der Zelle vor toxischen Effekten wie reaktiven Sauerstoffspezies oder Säurestress (de la Vega and Delcour, 1996, Chattopadhyay et al., 2003, Jung and Kim, 2003, Shah and Swatlo, 2008). In *Yersinia pestis* unterstützen Polyamine die Bildung von Biofilmen (Patel et al., 2006), wohin gegen sie diese in *Vibrio cholerae* vermindern (McGinnis et al., 2009). Auch für *S. oneidensis* wurde eine Beteiligung von SpeF an der Bildung von hyperadhäsiven Biofilmen beschrieben. Hier ist jedoch der Phänotyp abhängig von einer Deletion des betreffenden Gens (Ding et al., 2014). Möglicherweise ist SpeF daher in noch unbekannter Weise an der Regulation der Biofilm-Bildung in *S. oneidensis* beteiligt.

EmrD ist ebenfalls unter TisB-Bedingungen hochreguliert. Es handelt sich hierbei um eine pmf-abhängige Translokase, die in *E. coli* auch als Membran-Pumpe zur Resistenz gegen Giftstoffe wie beispielsweise Antibiotika beschrieben wird (Naroditskaya et al., 1993, May et al., 2009). Eine *emrD*-Deletionmutante kann keinen Biofilm mehr bilden (Matsumura et al., 2011). Somit scheinen Efflux-Pumpen eventuell indirekt an der Biofilm-Bildung beteiligt zu sein und EmrD könnte auch in *S. oneidensis* eine Rolle bei der Aggregation der Zellen spielen.

GlmR ist ein Repressor des *glmS* Gens, welches an der Peptidoglykan- und Lipopolysaccharid (LPS)-Synthese beteiligt ist. Bildet *S. oneidensis* TisB-induziert einen Biofilm, so ist die Transkription von *glmR* runterreguliert. Dies könnte zu einer vermehrten LPS-Synthese führen, da weniger Repressor-Protein in der Zelle vorhanden ist. Eine verstärkte Produktion von LPS kann wiederum die Bildung von Biofilmen fördern und an der Bildung einer extrazellulären Matrix beteiligt sein (Bandara et al., 2010).

Mit SO3776, SO3668 und SO4516 sind Gene hochreguliert, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind. Dies kann daran liegen, dass der Eisenbedarf der Zelle in der frühen Phase der Biofilm-Bildung steigt, da Eisen ein Cofaktor vieler Proteine ist (Gödeke et al., 2012). In *Pseudomonas aeruginosa* verhindern ein Eisenmangel oder die ungenügende Eisenaufnahme die Bildung von dreidimensionalen Biofilmen (Banin et al., 2005) und auch in *S. oneidensis* sind die Eisenaufnahme-Systeme bei der Bildung von Biofilmen an der Grenze zwischen Luft und Medium hochreguliert (Liang et al., 2012).

Die transkriptionellen Regulatoren der LysR-Familie regulieren ein diverses Set an Genen, unter anderem solche die an Virulenz, Stoffwechsel, Quorum Sensing und Zellbewegung beteiligt sind (Maddocks and Oyston, 2008). Interessanterweise werden die Regulatoren SO3874 und SO0843 in dieser Arbeit durch TisB hochreguliert, wohingegen sie in einer anderen Transkriptom-Studie in der frühen Phase der Biofilm-Bildung in *S. oneidensis* dagegen weniger stark transkribiert wurden (Gödeke et al., 2012). Somit unterliegt die TisB-induzierte Zellaggregation möglicherweise einem veränderten Mechanismus vergleichen mit der „natürlichen“ Biofilmbildung.

Zusammengenommen geben einige der Gene Hinweise auf eine Beteiligung an der TisB-induzierten Biofilm-Bildung. Um den genauen Mechanismus zu verstehen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

4.11 Ausblick

Mikrobielle Brennstoffzellen sind eine vielversprechende Technologie mit vielfältigem Anwendungspotential. Um sich langfristig etablieren zu können, steht nicht (mehr) nur die reine Stromerzeugung im Vordergrund, sondern beispielsweise die Applikation von MFCs zur Abwasserreinigung, als Biosensor oder zur Synthese von Wertstoffen mittels nicht-stöchiometrischer Fermentation. Da die Leistung einer MFC verglichen mit der Energieerzeugung durch andere regenerative Technologien meist nicht konkurrenzfähig ist, kann so die ökonomische und ökologische Attraktivität von MFCs durch die Etablierung von Nischenanwendungen und gezielte Nutzungskombinationen wie beispielsweise die mikrobielle Abwasserreinigung bei gleichzeitig ausreichender Stromproduktion zum Betrieb der Anlage, enorm gesteigert werden.

Mit dem neu entwickelten *E. coli*-Stamm JG622 wurde ein gute Basis für einen vielfältig einsetzbaren Organismus in einer MFC geschaffen. Ein entscheidender Vorteil von *E. coli* gegenüber vielen anderen exoelektrogenen Bakterien ist seine metabolische Flexibilität. So ist JG622 ohne zusätzliche Manipulationen in der Lage Abfallstoffe wie beispielsweise Rohglycerin als Kohlenstoffquelle zu nutzen, wohingegen die meisten Arten, die bisher in MFCs zum Einsatz kommen nur „Elektronenarme“ Gärprodukte wie Lactat oder Acetat oxidieren können. Ein weiterer Vorteil von *E. coli* ist, dass

der Organismus genetisch leicht zu verändern ist und sich somit gut für das Einbringen neuer Stoffwechselwege eignet. Noch ist JG622 auf die Zugabe von Methylenblau als Shuttle angewiesen. Methylenblau ist ungiftig und wird in sehr geringen Mengen eingesetzt, dennoch ist es erstrebenswert, einen direkt-exoelektrogenen Stamm zu generieren. Beim Versuch der Etablierung des Typ-II-Sekretionssystems hat sich gezeigt, dass dieses System noch komplexer reguliert zu sein scheint als bisher angenommen und tieferegehende Forschungsarbeiten notwendig sind. Die heterologe Expression bietet hier möglicherweise einen guten Ansatz zum besseren Verständnis der Sekretion und ihrer Regulation.

Ebenfalls ein vielversprechender Ansatz ist die Leistungssteigerung von *S. oneidensis*-MFCs durch eine Intensivierung der Biofilm-Bildung auf der Anode. Durch Zugabe des Peptids TisB in einer geringen Konzentration von 8 µg/ml konnte mehr als eine Verdopplung der Stromproduktion erreicht werden. Diese kann möglicherweise durch Zugabe höherer Konzentrationen weiter verbessert werden. Eine Möglichkeit zur Kostenreduktion besteht hier in der endogenen Synthese von TisB, welche eine externe Zugabe überflüssig machen würde und auch der Einfluss von TisB auf andere Mikroorganismen in MFCs bietet ein weiteres interessantes Forschungsfeld.

5 Literaturverzeichnis

- Abendroth, J., et al., 2004. The structure of the cytoplasmic domain of EpsL, an inner membrane component of the type II secretion system of *Vibrio cholerae*: An unusual member of the actin-like ATPase superfamily. *J Molec Biol.* 344, 619-633.
- Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, 1-12.
- Arslan, E., et al., 1998. Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm.* 251, 744-7.
- Balaban, N. Q., et al., 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science.* 305, 1622-1625.
- Bandara, H. M. H. N., et al., 2010. Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of *Candida* species. *J of Med Microbiol.* 59, 1225-1234.
- Banin, E., et al., 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci.* 102, 11076-11081.
- Beaumont, H. J. E., et al., 2009. Experimental evolution of bet hedging. *Nature.* 462, 90-97.
- Bechthold, I., et al., 2008. Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chem Engin Tech.* 31, 647-654.
- Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., 1998. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol.* 180, 6292-7.
- Beliaev, A. S., et al., 2005. Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *J Bacteriol.* 187, 7138-45.
- Belkin, S., 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Op Microbiol.* 6, 206-212.
- Beyer, L., et al., 2013. Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol.* 195, 1428-35.
- Bleves, S., et al., 2010. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Intern J Med Microbiol.* 300, 534-543.
- Bonanni, P. S., et al., 2012. A long way to the electrode: how do *Geobacter* cells transport their electrons? *Biochem Soc Transact.* 40, 1274-1279.
- Bond, D. R., Lovley, D. R., 2005. Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Appl Environ Microbiol.* 71, 2186-2189.
- Boone, D. R., et al., 1995. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-reducing and Mn(IV)-reducing Anaerobe from the deep terrestrial Subsurface. *Internat J Syst Bacteriol.* 45, 441-448.

- Bouhenni, R., et al., 2005. Identification of genes involved in cytochrome *c* biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon. *Appl Environ Microbiol.* 71, 4935-7.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Bretschger, O., et al., 2007. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl Environ Microbiol.* 73, 7003-12.
- Bretschger, O., et al., 2008. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl Environ Microbiol.* 74, 553-553.
- Brutinel, E. D., Gralnick, J. A., 2012. On the role of endogenous electron shuttles in extracellular electron transfer. In: Gescher, J., Kappler, A., (Ed.), *Microbial Metal Respiration*. Springer, Heidelberg. 1, 83-106.
- Bücking, C., et al., 2010. Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett.* 306, 144-51.
- Bücking, C., Schicklberger, M., Gescher, J., 2010. The biochemistry of dissimilatory ferric iron reduction and manganese reduction. In: Gescher, J., Kappler, A., (Ed.), *Microbial Metal Respiration*. Springer, Heidelberg 1, 49-82.
- Burnes, B. S., et al., 1998. Design and application of two rapid screening techniques for isolation of Mn(IV) reduction-deficient mutants of *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* 64, 2716-20.
- Byfield, M. P., Abuknesha, R. A., 1994. Biochemical aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron.* 9, 373-400.
- Caccavo, F., et al., 1996. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. *Arch Microbiol.* 165, 370-376.
- Caccavo, F., et al., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen-oxidizing and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol.* 60, 3752-3759.
- Carpentier, W., et al., 2005. Respiration and growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 using vanadate as the sole electron acceptor. *J Bacteriol.* 187, 3293-301.
- Chang, I. S., et al., 2006. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *J Microbiol Biotechnol.* 16, 163-177.
- Chattopadhyay, M. K., et al., 2003. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc Natl Acad Sci.* 100, 2261-2265.
- Chen, S. L., et al., 2011. Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ Sci.* 4, 1417-1421.

- Clarke, T. A., et al., 2011. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc Natl Acad Sci.* 108, 9384-9.
- Coates, J. D., et al., 1995. *Desulfuromonas palmitatis* sp. nov., a marine dissimilatory Fe(III) reducer that can oxidize long-chain fatty acids. *Arch Microbiol.* 164, 406-413.
- Coates, J. D., et al., 1999. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int J Syst Bacteriol.* 49, 1615-1622..
- Cohen, B., 1931. The bacterial culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriol.* 21, 18-19.
- Coleman, M. L., et al., 1993. Reduction of Fe(III) in sediments by sulfate-reducing bacteria. *Nature.* 361, 436-438.
- Coursolle, D., Gralnick, J. A., 2012. Reconstruction of extracellular respiratory pathways for Iron(III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Front Microbiol.* 3, 56.
- Crespo, J., et al., 2007. Comparative Bioreduction of Fe(III) with *Geobacter metallireducens* and *Bacillus infernus*. *Adv Material Res.* 20-21, 561-564.
- Cruz-Garcia, C., et al., 2007. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol.* 189, 656-62.
- Degroot, A., et al., 1991. Conservation of *xcp* Genes, involved in the 2-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* Species and other Gram-negative bacteria. *Mol Genet Genomics.* 229, 278-284.
- delaVega, A. L., Delcour, A. H., 1996. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol.* 178, 3715-3721.
- Denfert, C., et al., 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO Journal.* 6, 3531-3538.
- Dharmadi, Y., et al., 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotech Bioengin.* 94, 821-9.
- Ding, Y. Z., et al., 2014. Disruption of putrescine biosynthesis in *Shewanella oneidensis* enhances biofilm cohesiveness and performance in Cr(VI) immobilization. *Appl Environ Microbiol.* 80, 1498-1506.
- Dolch, K., et al., 2014. Characterization of microbial current production as a function of microbe-electrode-interaction. *Biores Technol.* 157, 284-292.
- Dötsch, A., et al., 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PloS one.* 7, 1-11.
- Douzi, B., et al., 2012. On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Phil Trans R Soc B.* 367, 1059-1072.

- Du Plessis, D. J. F., et al., 2011. The Sec translocase. *BBA-Biomembr.* 1808, 851-865.
- Du, Z. W., et al., 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv.* 25, 464-482.
- El-Naggar, M. Y., et al., 2010. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc Natl Acad Sci.* 107, 18127-18131.
- Ferry, J. G., Wolfe, R. S., 1976. Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch Microbiol.* 107, 33-40.
- Filloux, A., 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *BBA-Molec Cell Res.* 1694, 163-179.
- Flynn, J. M., et al., 2010. Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *mBio.* 1, 1-8.
- Fonseca, B. M., et al., 2013. Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem J.* 449, 101-8.
- Francetic, O., et al., 2000. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *EMBO J.* 19, 6697-703.
- Francetic, O., et al., 2007. Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the Pu1G pseudopilin component of a type II secretion system. *J Bacteriol.* 189, 1783-1793.
- Francis, C. A., et al., 2000. Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl Environ Microbiol.* 66, 543-548.
- Fujimoto, J. G., et al., 1995. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat Med.* 1, 970-2.
- Gao, H., et al., 2010. Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microbial Biotechnol.* 3, 455-66.
- Gescher, J. S., et al., 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Mol Microbiol.* 68, 706-19.
- Gödeke, J., et al., 2012. Transcriptome analysis of early surface-associated growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *PLoS one.* 7, 1-11.
- Golitsch, F., et al., 2013. Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens Bioelectron.* 47, 285-91.
- Golitsch, F., Gescher, J., 2014. Using soluble cytochromes as catalysts for cathode-based electron transfer. *in preparation.*
- Gonzalez, R., et al., 2008. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabol Engin.* 10, 234-45.
- Gordon, E. H., et al., 1998. Physiological function and regulation of flavocytochrome c3, the soluble fumarate reductase from *Shewanella putrefaciens* NCIMB 400. *Microbiol.* 144 (Pt 4), 937-45.

- Gralnick, J. A., Hau, H. H., 2006. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol.* 61, 237-258.
- Gralnick, J. A., Newman, D. K., 2007. Extracellular respiration. *Molec Microbiol.* 65, 1-11.
- Gurnev, P. A., et al., 2012. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 586, 2529-2534.
- Gussow, D., Clackson, T., 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 4000.
- Haldimann, A., Wanner, B. L., 2001. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol.* 183, 6384-93.
- Hartshorne, R. S., et al., 2009. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 22169-74.
- Hayes, C. S., et al., 2010. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet.* 44, 71-90.
- He, Q., Sanford, R. A., 2003. Characterization of Fe(III) reduction by chlororespiring *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Appl Environ Microbiol.* 69, 2712-2718.
- Herring, C. D., et al., 2003. Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene.* 311, 153-63.
- Horstman, A. L., Kuehn, M. J., 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem.* 275, 12489-12496.
- Jiang, X. C., et al., 2010. Probing electron transfer mechanisms in *Shewanella oneidensis* MR-1 using a nanoelectrode platform and single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci.* 107, 16806-16810.
- Jung, I. L., Kim, I. G., 2003. Polyamines and glutamate decarboxylase-based acid resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 278, 22846-22852.
- Kang, C. S., et al., 2014. Enhanced current production by *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm in a mediator-less microbial fuel cell. *Biores Technol.*
- Karube, I., et al., 1977. Biochemical fuel-cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. *Biotechnol Bioengin.* 19, 1727-1733.
- Kerisit, S., et al., 2007. Molecular computational investigation of electron-transfer kinetics across cytochrome-iron oxide interfaces. *J Physical Chem.* 111, 11363-11375.
- Kiely, P. D., et al., 2011. Anode microbial communities produced by changing from microbial fuel cell to microbial electrolysis cell operation using two different wastewaters. *Biores Technol.* 102, 388-394.
- Kim, H. J., et al., 2002. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enz Microbial Technol.* 30, 145-152.

- Korotkov, K. V., Hol, W. G. J., 2008. Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Molec Biol.* 15, 462-468.
- Korotkov, K. V., et al., 2011. Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem Sci.* 36, 433-443.
- Korotkov, K. V., et al., 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol.* 10, 336-351.
- Kouzuma, A., et al., 2012. Roles of siderophore in manganese-oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol Lett.* 326, 91-98.
- Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., 2011. Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Anal Bioanal Chem.* 400, 947-964.
- Langmead, B., Salzberg, S. L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Met.* 9, 357-U54.
- Liang, Y. L., et al., 2012. Transcriptome analysis of pellicle formation of *Shewanella oneidensis*. *Arch Microbiol.* 194, 473-482.
- Lindeberg, M., et al., 1996. Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* *out* genes with *Erwinia carotovora* *out* homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. *Mol Microbiol.* 20, 175-190.
- Liu, H., et al., 2004. Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol.* 38, 2281-2285.
- Liu, H., et al., 2005. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environ Sci Technol.* 39, 5488-5493.
- Logan, B. E., et al., 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ Sci Technol.* 40, 5181-5192.
- Logan, B. E., Regan, J. M., 2006a. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512-8.
- Logan, B. E., Regan, J. M., 2006b. Microbial fuel cells - challenges and applications. *Environ Sci Technol.* 40, 5172-80.
- Logan, B. E., 2008. Voltage generation. In: Logan, B. E., *Microbial fuel cells*. John Wiley & Sons, New Jersey, USA. 1, 29-43.
- Logan, B. E., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol.* 7, 375-81.
- Lovley, D. R., et al., 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol.* 159, 336-344.

- Lovley, D. R., et al., 1995. Fe(III) and S⁰ Reduction by *Pelobacter carbinolicus*. Appl Environ Microbiol. 61, 2132-2138.
- Lutz, R., Bujard, H., 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. Nucl Ac Res. 25, 1203-10.
- Maddocks, S. E., Oyston, P. C. F., 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. Microbiol. 154, 3609-3623.
- Malvankar, N. S., et al., 2011. Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. Nat Nanotechnol. 6, 573-9.
- Marsili, E., et al., 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. Proc Natl Aca Sci. 105, 3968-3973.
- Matsumura, K., et al., 2011. Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. Biocontrol Sci. 16, 69-72.
- May, T., et al., 2009. Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. Antimicrob Agents Chemother. 53, 4628-4639.
- McGinnis, M. W., et al., 2009. Spermidine regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation via transport and signaling pathways. FEMS Microbiol Lett. 299, 166-174.
- McLean, J. S., et al., 2010. Quantification of electron transfer rates to a solid phase electron acceptor through the stages of biofilm formation from single cells to multicellular communities. Environ Sci Technol. 44, 2721-2727.
- Meyer, T. E., et al., 2004. Identification of 42 possible cytochrome *c* genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. Omics. 8, 57-77.
- Min, B., Logan, B. E., 2004. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. Environ Sci Technol. 38, 5809-5814.
- Min, B., et al., 2005. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. Water Res. 39, 4961-4968.
- Murarka, A., et al., 2008. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. Appl Environ Microbiol. 74, 1124-35.
- Myers, C. R., Nealson, K. H., 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science. 240, 1319-1321.
- Myers, C. R., Nealson, K. H., 1990. Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. J Bacteriol. 172, 6232-8.

- Myers, C. R., Myers, J. M., 1997. Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol.* 179, 1143-52.
- Myers, C. R., et al., 2000. Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Microbiol.* 88, 98-106.
- Myers, J. M., Myers, C. R., 2002. Genetic complementation of an outer membrane cytochrome *omcB* mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 requires *omcB* plus downstream DNA. *Appl Environ Microbiol.* 68, 2781-93.
- Myers, C. R., Myers, J. M., 2003a. Cell surface exposure of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Lett Appl Microbiol.* 37, 254-8.
- Myers, J. M., Myers, C. R., 2003b. Overlapping role of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 in the reduction of manganese(IV) oxide. *Lett Appl Microbiol.* 37, 21-5.
- Naroditskaya, V., et al., 1993. An *E. coli* Gene *emrD* is involved in adaptation to low energy shock. *Biochem Biophys Res Com.* 196, 803-809.
- Nevin, K. P., et al., 2009. Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS one.* 4, 1-11.
- Nguyen, U. H. P., et al., 2014. Anodic deposit from respiration metabolic pathway of *Escherichia coli*. *Electrochim Acta.* 130, 200-205.
- Nolan, M., et al., 2010. Complete genome sequence of *Ferrimonas balearica* type strain (PAT(T)). *Stand Genom Sci.* 3, 174-182.
- Oh, S. E., Logan, B. E., 2005. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* 39, 4673-4682.
- Park, D. H., Zeikus, J. G., 1999. Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: Physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *J Bacteriol.* 181, 2403-2410.
- Park, D. H., Zeikus, J. G., 2000. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Appl Environ Microbiol.* 66, 1292-1297.
- Parkhomchuk, D., et al., 2009. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucl Aci Res.* 37.
- Pasco, N. F., et al., 2011. Development and applications of whole cell biosensors for ecotoxicity testing. *Analyt Bioanalyt Chemi.* 400, 931-945.
- Patel, C. N., et al., 2006. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol.* 188, 2355-2363.

- Pessanha, M., et al., 2009. Tuning of functional heme reduction potentials in *Shewanella fumarate* reductases. *BBA-Bioenergetics*. 1787, 113-120.
- Pham, C. A., et al., 2003. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol Lett*. 223, 129-134.
- Pitts, K. E., et al., 2003. Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *J Biol Chem*. 278, 27758-65.
- Popp, F., 2009. Involvement and specificity of OM cytochromes in anaerobic respiration processes in *Shewanella oneidensis*. *Diploma Thesis*.
- Possot, O., Pugsley, A. P., 1994. Molecular characterization of Pule, a protein required for pullulanase secretion. *Molec Microbiol*. 12, 287-299.
- Potter, M. C., 1911. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc R Soc London*. 84, 260-276.
- Qiao, Y., et al., 2008. Direct electrochemistry and electrocatalytic mechanism of evolved *Escherichia coli* cells in microbial fuel cells. *Chemic Com*. 1290-1292.
- Rabaey, K., et al., 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME J*. 1, 9-18.
- Reguera, G., et al., 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. 435, 1098-1101.
- Reguera, G., et al., 2006. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl Environ Microbiol*. 72, 7345-7348.
- Reguera, G., et al., 2007. Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J Bacteriol*. 189, 2125-2127.
- Richardson, D. J., et al., 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *CMLS*. 58, 165-78.
- Richter, H., et al., 2007. Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl Environ Microbiol*. 73, 5347-5353.
- Richter, K., 2009. Synthetische Biologie am Beispiel der dissimilatorischen Eisenreduktion. *Diploma Thesis*.
- Richter, K., et al., 2010. A simple and fast method to analyze the orientation of c-type cytochromes in the outer membrane of Gram-negative bacteria. *J Microbiol Met*. 82, 184-6.
- Richter, K., Gescher, J., 2014. Accelerated glycerol fermentation in *Escherichia coli* using methanogenic formate consumption. *Biores Tech*. 162, 389-391

- Richter, K., et al., 2012. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol.* 78, 913-21.
- Riggs, P., 2001. Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions. *Curr Protoc Molec Biol.* John Wiley & Sons, Inc.
- Roller, S. D. B., et al., 1984. Electron-transfer Coupling in Microbial Fuel Cells: 1. Comparison of Redox-mediator Reduction Rates and Respiratory Rates of Bacteria. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B, 3-12.
- Romine, M. F., et al., 2008. Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome. *Appl Environ Microbiol.* 74, 3257-65.
- Rosenbaum, M., et al., 2006. Interfacing electrocatalysis and biocatalysis with tungsten carbide: A high-performance, noble-metal-free microbial fuel cell. *Angew Chem Intern Ed.* 45, 6658-6661.
- Ross, D. E., et al., 2007. Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol.* 73, 5797-5808.
- Rotem, E., et al., 2010. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc Natl Ac Sci.* 107, 12541-12546.
- Sandkvist, M., et al., 1997. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 179, 6994-7003.
- Schicklberger, M., et al., 2011. Involvement of the *Shewanella oneidensis* decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the beta-barrel protein MtrB. *Appl Environ Microbiol.* 77, 1520-3.
- Schickberger, M., et al., 2012. Genomic plasticity enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol.* 79, 150-59.
- Schröder, U., et al., 2003. A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angew Chem Intern Ed.* 42, 2880-2883.
- Schrott, G. D., et al., 2011. Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochim Ac.* 56, 10791-10795.
- Schütz, B., et al., 2009. Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol.* 75, 7789-96.
- Schütz, B., et al., 2011. Investigation of the electron transport chain to and the catalytic activity of the diheme cytochrome *c* peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol.* 77, 6172-80.
- Schwalb, C., et al., 2002. The membrane-bound tetrahaem *c*-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*. *Biochem Soc Trans.* 30, 658-62.

- Schwalb, C., et al., 2003. The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochem.* 42, 9491-7.
- Shah, P., Swlatlo, E., 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molec Microbiol.* 68, 4-16.
- Shanks, R. M., et al., 2006. *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 72, 5027-36.
- Shi, L., et al., 2008. Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. *J Bacteriol.* 190, 5512-6.
- Shirodkar, S., et al., 2010. The octahaem SirA catalyses dissimilatory sulfite reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environ Microbiol.*
- Sikora, A. E., et al., 2011. Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. *J Biol Chem.* 286, 16555-16566.
- Steinbrecher, T., et al., 2012. Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence. *Biophysic J.* 103, 1460-1469.
- Strozen, T. G., et al., 2011. Involvement of the GspAB complex in assembly of the type II secretion system secretin of *Aeromonas* and *Vibrio* species. *J Bacteriol.* 193, 2322-31.
- Strycharz-Glaven, S. M., et al., 2011. On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energ Environ Sci.* 4, 4366-4379.
- Sturm, G., et al., 2012. Metal reducers and reduction targets. A short survey about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of terminal electron acceptors. In: Gescher, J., Kappler, A., (Ed.), *Microbial Metal Respiration*. Springer, Heidelberg. 1, 49-82.
- Sturm, G., et al., 2014. A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME*, *submitted*.
- Thöny-Meyer, L., et al., 1995. *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J Bacteriol.* 177, 4321-6.
- Thormann, K. M., et al., 2004. Initial phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol.* 186, 8096-8104.
- Trchounian, K., et al., 2012a. Multiple and reversible hydrogenases for hydrogen production by *Escherichia coli*: dependence on fermentation substrate, pH and the F(0)F(1)-ATPase. *Crit Rev Biochem Molec Biol.* 47, 236-49.
- Trchounian, K., 2012b. Transcriptional control of hydrogen production during mixed carbon fermentation by hydrogenases 4 (*hyf*) and 3 (*hyc*) in *Escherichia coli*. *Gene.* 506, 156-60.
- Trchounian, K., et al., 2013. Hydrogenase activity and proton-motive force generation by *Escherichia coli* during glycerol fermentation. *J Bioenerget Biomemb.* 45, 253-260.

- Vaara, M., et al., 1981. Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*. FEBS Lett. 129, 145-149.
- Velasquez-Orta, S. B., et al., 2010. The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. Appl Microbiol Biotechnol. 85, 1373-1381.
- Venkateswaran, K., et al., 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 2, 705-24.
- Vogel, T., 2013. Enhanced biofilm formation and synthetic endogenous electron shuttles as potential tool for high efficiency microbial fuel cells. *Bachelor Thesis*.
- Voulhoux, R., et al., 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. EMBO J. 20, 6735-6741.
- Wagner, E. G. H., Unoson, C., 2012. The toxin-antitoxin system *tisB-istR1* Expression, regulation and biological role in persister phenotypes. RNA Biol. 9, 1513-1519.
- Wang, Y. F., et al., 2007. Self-excreted mediator from *Escherichia coli* K-12 for electron transfer to carbon electrodes. Appl Microbiol Biotechnol. 76, 1439-1446.
- Warming, S., et al., 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. Nucl Aci Res. 33, 1-12.
- Washburn, M. P., et al., 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol. 19, 242-7.
- Wei, J. C., et al., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. Biores Technol. 102, 9335-9344.
- Wolters, D. A., et al., 2001. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. Anal Chem. 73, 5683-90.
- Wrighton, K. C., et al., 2011. Evidence for direct electron transfer by a Gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell. Appl Environ Microbiol. 77, 7633-7639.
- Xie, X., et al., 2011. Three-dimensional carbon nanotube-textile anode for high-performance microbial fuel cells. Nano Lett. 11, 291-296.
- Yong, Y. C., et al., 2013. Enhancement of extracellular electron transfer and bioelectricity output by synthetic porin. Biotechnol Bioeng. 110, 408-416.
- Zalewska-Piatek, B., et al., 2008. Type II secretory pathway for surface secretion of DraD invasin from the uropathogenic *Escherichia coli* Dr(+) Strain. J Bacteriol. 190, 5044-5056.
- Zhang, T., et al., 2008. The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell. Electrochem Comm. 10, 293-297.
- Zhang, T., et al., 2006. A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of *Escherichia coli*. Chem Comm. 2257-2259.

Anhang

Transkriptomdaten

Locus	ID	gene_name	log2FC	adjusted P	signifikant
SO_0314,speF	SO_0314	speF	2,15	4,22E-08	WAHR
SO_0401	SO_0401		2,75	4,70E-18	WAHR
SO_0727	SO_0727		1,47	0,0001818	WAHR
SO_0728	SO_0728		1,36	3,17E-06	WAHR
SO_0798	SO_0798		1,34	1,03E-05	WAHR
SO_0843	SO_0843		1,17	6,22E-07	WAHR
SO_0939	SO_0939		3,48	0,0016285	WAHR
SO_1326,yhcC	SO_1326	yhcC	1,17	0,0002978	WAHR
SO_1532	SO_1532		1,37	6,42E-11	WAHR
SO_1760	SO_1760		-1,41	0,031373	WAHR
SO_1917	SO_1917		1,31	0,000281	WAHR
SO_1956	SO_1956		1,32	0,0020905	WAHR
SO_2389,emrD	SO_2389	emrD	1,10	0,0028553	WAHR
SO_2953,H	SO_2953	H	1,44	0,0007732	WAHR
SO_2955,G	SO_2955	G	1,59	0,0028961	WAHR
SO_2963	SO_2963		1,31	8,13E-06	WAHR
SO_2964	SO_2964		1,57	0,0090602	WAHR
SO_2968,A	SO_2968	A	1,35	0,0249291	WAHR
SO_2973,R	SO_2973	R	1,31	0,0469432	WAHR
SO_2978	SO_2978		1,22	0,0496041	WAHR
SO_2985,O	SO_2985	O	1,35	0,0015486	WAHR
SO_3342	SO_3342		1,01	0,0477132	WAHR
SO_3495	SO_3495		1,13	0,0265675	WAHR
SO_3542,xfp	SO_3542	xfp	1,04	5,87E-22	WAHR
SO_3667,hmuZ	SO_3667	hmuZ	1,03	1,73E-05	WAHR
SO_3668,hmuX	SO_3668	hmuX	1,08	2,40E-05	WAHR
SO_3719	SO_3719		1,23	0,0002978	WAHR
SO_3720,hemG	SO_3720	hemG	1,22	0,01839	WAHR
SO_3874	SO_3874		1,03	0,0007526	WAHR
SO_4060,phsC	SO_4060	phsC	1,95	0,0178965	WAHR
SO_4516	SO_4516		1,17	1,17E-09	WAHR
SO_4700	SO_4700		1,03	0,000902	WAHR
SO_4742,glmR	SO_4742	glmR	-1,12	3,58E-05	WAHR
SO_4761	SO_4761		1,81	0,0005918	WAHR