

**Untersuchung zur anaeroben Regulation des *prp*-Operons in
Escherichia coli K12 im Hinblick auf die Entwicklung eines
Propionatbiosensors**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Francesca Maria Simonte

aus

Göppingen

KIT-Dekan: Professor Dr. Willem Klopper

Referent: Professor Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Professor Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2016

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt habe und nur die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Teile, die wörtlich oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KITs beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Ort, Datum

Francesca Maria Simonte

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Johannes Gescher bedanken, der mir die Chance gegeben hat hier in Karlsruhe meine Dissertation durchführen zu können und dabei Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden. Danke, dass du mir dieses interessante Thema überlassen hast und mich dabei immer unterstützt und motiviert hast weiter zu machen. Auch wenn es mal ein paar Durststrecken gab.

Ich möchte auch der ganzen AG Gescher ganz herzlich danken, allen aktuellen aber auch ehemaligen Kollegen. Ihr seid die tollste Arbeitsgruppe, die man sich vorstellen kann. Ihr habt mich schnell aufgenommen und es macht Spaß mit euch zu arbeiten, aber auch zu schwatzen und Kuchen zu essen. Ich fühle mich wohl!

Für ihre tatkräftige Unterstützung an dieser Arbeit möchte ich mich bei all meinen Praktikanten, Studenten und Hiwis bedanken.

Meinen Kooperationspartnern danke ich dafür, dass sie mich und meine Arbeit weiter gebracht haben. Danke an alle Partner des ESE-Biogas, insbesondere dem IPHT Jena für die Bereitstellung der Mikrochips. Danke an Andreas Dötsch vom IFG für seine kompetente Hilfe bei den bioinformatischen Fragestellungen.

Danke an das allerbeste Büro!! Meine Büro1-Mädels Steffi, Tina, Thea und Kadda (auch wenn Büro2). Ihr seid die besten, liebsten und lustigsten Büronachbarn aber vor allem Freundinnen! Danke für eure gute Laune und eure Unterstützung. Danke für die schönen Trash-TV oder Koch-Abende. Tobi, vielen Dank für die Versorgung mit Schoki!! Liebe Kadda, danke dir nochmal für deine Unterstützung vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit und die entspannten Yoga-Stunden mit Markus. Lieber Sebastian und liebe Anni, sei es zum Vergnügen oder auch zum Trösten und Unterstützen, ihr wart immer bereit und zur Stelle, Danke dafür! Fredi vielen Dank für deine unermüdliche Hilfsbereitschaft und die langen Diskussion über Essen, Autos, Fußball, Politik..... und natürlich auch Elektrochemie ;)

Liebe Julia, meine beste Freundin und Mitbewohnerin, danke dir für die tolle gemeinsame Zeit in Karlsruhe. Nach dem gemeinsamen Studium in Stuttgart, fand ich es toll auch die Promotionszeit zusammen verbracht zu haben. Geteiltes Leid ist halbes Leid.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mir das alles überhaupt ermöglicht haben. Danke Mama und Papa für eure Unterstützung bei all meinen Entscheidungen.

Lieber Martin, danke, dass du da bist.

Grazie di cuore!

Inhaltsverzeichnis

Erklärung an Eides statt.....	I
Danksagung	II
Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	2
1 Einleitung.....	4
1.1 Bioenergie aus Biomasse.....	4
1.2 Biogasproduktion	5
1.2.1 Prozessstörungen	8
1.3 Mikrobielle Brennstoffzellen.....	10
1.3.1 Interaktion der Mikroorganismen mit der Anode.....	11
1.3.2 Anaerobe Atmung und dissimilatorische Metallreduktion.....	13
1.4 Mikrobieller Biosensor	18
1.5 Propionat Metabolismus von <i>E. coli</i> K12	20
1.5.1 Regulation des <i>prp</i> -Operons	23
1.5.2 Anaerober Propionatabbau in <i>E. coli</i> K12	23
1.6 Ziele der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Verwendete Mikroorganismen und Materialien	26
2.1.1 Liste der verwendeten Mikroorganismen.....	26
2.1.2 Chemikalien	26
2.2 Bakterienkultivierung und Stammkonservierung	27
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	27
2.2.2 Kultivierung von <i>S. oneidensis</i>	29

2.2.3	Stammkonservierung	31
2.3	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1	PCR (Polymerasenkettenreaktion)	31
2.3.2	Klonierungstechniken	34
2.3.3	Agarosegelelektrophorese	37
2.3.4	Reinigung und Isolierung von DNA	38
2.3.5	Reinigung und Isolierung von RNA	39
2.3.6	DNA Konzentrationsbestimmung	42
2.3.7	Sequenzierung	43
2.3.8	Transformationstechniken	43
2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.4.1	Glycerinbestimmung	45
2.4.2	Fluoreszenzmessungen	45
2.4.3	Fe(III)-Reduktionsassay	46
2.4.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	50
2.5	Mikrobielle-Elektrochemische-Zellen (MEC)	50
2.5.1	Dreikammer-MEC	51
2.5.2	Mikrofluidik-Chip	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Untersuchungen zum <i>prp</i> -Operon aus <i>E. coli</i> K12	55
3.1.1	Anaerober Propionatabbau durch <i>E. coli</i> K12	55
3.1.2	Expressionsanalysen des <i>prp</i> -Operons in <i>E. coli</i> K12	58
3.1.3	Exoribonuklease RNase R	64
3.1.4	Wachstumsversuche mit <i>E. coli</i> Δ <i>rrn</i>	65

3.1.5	Transkriptomanalyse von <i>E. coli</i> Δrnr	69
3.1.6	Wirkung von RNase R auf weitere Gene und Gencluster	70
3.1.7	Suche nach Organismen mit homologen <i>prp</i> -Gencluster	71
3.2	Entwicklung eines Biosensors für die Detektion von Propionat	73
3.2.1	Untersuchung der Promotorstärke mittels pBAD_ <i>prpR</i> _mCherry	74
3.2.2	Integration der respiratorischen Elektronentransportkette aus <i>S. oneidensis</i> in <i>E. coli</i> Δrnr	75
3.2.3	Entwicklung eines bioelektrochemischen Mikrofluidik-Chips	76
4	Diskussion	85
4.1	Anaerober Propionatabbau in <i>E. coli</i> K12	86
4.2	Transkriptomanalysen des <i>prp</i> -Operon in <i>E. coli</i> K12	88
4.2.1	3'-5' Exoribonukleasen in <i>E. coli</i>	90
4.3	Versuche mit <i>E. coli</i> Δrnr	94
4.3.1	Einfluss von RNase R auf weitere Gencluster unter anaeroben Bedingungen	96
4.3.2	Möglicher Einfluss von RNase R auf den Propionatstoffwechsel anderer Bakterien	97
4.4	Erste Versuche zum Propionatbiosensor	98
4.4.1	Untersuchung der Promotorstärke unter anaeroben Bedingungen	98
4.4.2	Eisenreduktionsversuche	99
4.5	Entwicklung eines bioelektrochemischen Mikrofluidik-Chips	99
5	Ausblick	102
6	Literaturverzeichnis	104
	Manuskript	127
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	174

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda=600$ nm
TMAO	Trimethylaminoxid
Δ	Deletion

Zusammenfassung

Propionat ist eine in der Natur weit verbreitete kurzkettige Fettsäure. Dieses Fermentationsprodukt ist auch ein häufiges Nebenprodukt in vielen biotechnologischen Prozessen. Unter diese Prozesse fällt unter anderem auch die Energiegewinnung aus Biomasse, wie beispielsweise die Biogasproduktion. Dabei wird die anfallende Biomasse aus forst- und landwirtschaftlichen Abfällen mit Hilfe unterschiedlicher Mikroorganismengruppen zu Methan und CO_2 umgewandelt. Dieser anaerobe Prozess ist allerdings sehr störanfällig, da die Ansammlung der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Butyrat und vor allem Propionat zum Umkippen des Fermenters führt. Die Anhäufung dieser Fettsäuren, resultiert, am Beispiel des Propionats, in der energetisch ungünstigen anaeroben Oxidation, da die freien Gibbs-Energien ΔG° bei +76 kJ/mol bzw. +65,3 kJ/mol liegen. Ein fermentativer Abbau von Propionat kann somit nur innerhalb eines syntrophischen Konsortiums stattfinden. Doch auch *E. coli* ist in seinem natürlichen Lebensraum hohen Konzentrationen an Propionat ausgesetzt. Wie viele andere Mikroorganismen hat *E. coli* eine Strategie entwickelt, um Propionat abzubauen und als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Der 2-Methylcitrat-Zyklus, der durch die Gene des *prpBCDE*-Genclusters kodiert wird, ermöglicht den oxidativen Abbau von Propionat zu Pyruvat. Interessanterweise beschränkt sich die Fähigkeit von *E. coli* Propionat als Kohlenstoff- und Elektronenquelle nutzen zu können auf die aerobe Atmung. In dieser Arbeit sollte daher der Propionatstoffwechsel von *E. coli* unter aeroben und anaeroben Bedingungen genauer untersucht werden.

Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass der Wildtyp *E. coli* K12 trotz Zugabe von alternativen Elektronenakzeptoren wie Nitrat oder DMSO zu keiner anaeroben Propionatoxidation fähig ist. Die typische Herunterregulierung des Citrat-Zyklus unter anaeroben Bedingungen scheint dabei nur teilweise für diese Unfähigkeit verantwortlich zu sein, da Versuche mit einem *arcA*-defizienten *E. coli* Stamm ebenfalls nur ein limitiertes Wachstum mit Propionat als alleiniger Kohlenstoffquellen zeigten. Erst die Untersuchung der

Expression des *prp*-Operons mittels RT-PCR und eine Transkriptomanalyse deckten eine mögliche posttranskriptionelle Regulation auf. Die polycistronische mRNA schien unter anaeroben Bedingungen von 3'- nach 5'-Richtung hydrolysiert worden zu sein. Weitere Untersuchungen des Transkriptoms führten zu RNase R als möglichen Kandidaten für die hydrolytische Aktivität am *prp*-Operon. Infolgedessen konnte Versuche mit einem *E. coli* Δrnr Stamm die Mitwirkung von RNase R beweisen, da dieser Stamm Propionat unter anaeroben Bedingungen verstoffwechseln konnte. Zusätzlich zeigte dieser Stamm auch einen verbesserten anaeroben Glycerinverbrauch.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Propionatbiosensors, der auf eine Kopplung der Propionatkonzentration mit einem elektrischen Signal basiert. Hierfür konnten in dieser Arbeit erste Versuche durchgeführt werden, die eine konzentrationsabhängige Induzierbarkeit des Promotors $P_{prpBCDE}$ auch unter anaeroben Bedingungen zeigten. Nicht zuletzt konnte mit Hilfe der exoelektrogenen Stämme *S. oneidensis* MR-1 und *S. oneidensis* MtrFAB die prinzipielle Funktionalität des MEC-basierten Mikrofluidik-Chips als Biosensor gezeigt werden.

1 Einleitung

1.1 Bioenergie aus Biomasse

Fossile Brennstoffe wie Erdöl, Erdgas und Kohle gelten global derzeit noch als die wichtigsten Primärenergie lieferanten. Im Jahr 2013 wurden ca. 80% des weltweiten Primärenergieverbrauchs von 13.497 Millionen Tonnen Erdöläquivalent (Jürgen Paeger, Ökosystem Erde, o. J.) durch fossile Brennstoffe gedeckt. Vor allem Erdöl zeichnet sich durch seine hohe Energiedichte und diverse Einsatzbereiche als wertvoller Rohstoff aus. Dennoch ist die Verfügbarkeit dieser Ressourcen endlich und führt auf Grund der ungleichmäßigen Verteilung der Reserven auf der Erde zu Abhängigkeiten und Machtkämpfen zwischen den Nationen. Neben der Endlichkeit der Reserven besitzt die Energiegewinnung aus Erdöl einen weiteren schwerwiegenden Nachteil. Seit der Nutzung und Verbrennung fossiler Ressourcen durch den Menschen ist der Anteil an CO₂ in der Atmosphäre erheblich gestiegen. Das bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe entstehende CO₂ stellt dabei den größten Anteil der Treibhausgase und trägt damit folglich erheblich zum Klimawandel bei (IPCC, 2013). Daher gewinnt die Erzeugung von Energie aus erneuerbaren und nachwachsenden Rohstoffen immer mehr an Bedeutung und Wichtigkeit. Auch in Deutschland stieg vor allem im Zusammenhang mit dem Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) das Interesse dezentralisiert Energie mit Hilfe von klima- und umweltfreundlichen Technologien zu produzieren. Im Jahr 2015 stieg der Anteil des produzierten Stroms aus erneuerbaren Energien bereits auf 30% (siehe Abbildung 1). Dabei leistet die Energie aus Windkraft den größten Beitrag. An zweiter und dritter Stelle befinden sich Biomasse und Photovoltaik (Agentur für erneuerbare Energie e. V.). Obwohl die Windkraft den Hauptanteil an Energie liefert unterliegt sie zusammen mit dem Solarstrom natürlichen Schwankungen und Rhythmen, die eine konstante Versorgung mit dieser Energie verhindern. Als Ausgleichsenergie für diese fluktuierenden Erzeuger kann insbesondere Energie aus Biomasse, nämlich Biogas, dienen, da diese kontinuierlich zur Verfügung gestellt werden kann

(Appels *et al.*, 2011). Durch den relativ einfachen Anlagenbau und die Vielseitigkeit ist die Bioenergiegewinnung mittels kontrollierter anaerober Gärung von Biomasse weit verbreitet. Die Biogasproduktion aus der anaeroben Gärung ist die effizienteste Methode, um Energie aus Biomasse zu gewinnen (Deublein and Steinhauser, 2008). Als Biomasse können sowohl Energiepflanzen als auch Abfälle der Land- und Forstwirtschaft, Gülle, Klärschlamm sowie kommunale Abfälle eingesetzt werden. Dadurch wird neben der CO₂ neutralen Energiegewinnung gleichzeitig die Reduktion der Umweltbelastung, wie die Verunreinigung des Frisch- und Grundwassers durch Mülldeponien und unvollständige Müllverbrennung, erzielt (Angelidaki *et al.*, 2011; Chandra *et al.*, 2012).

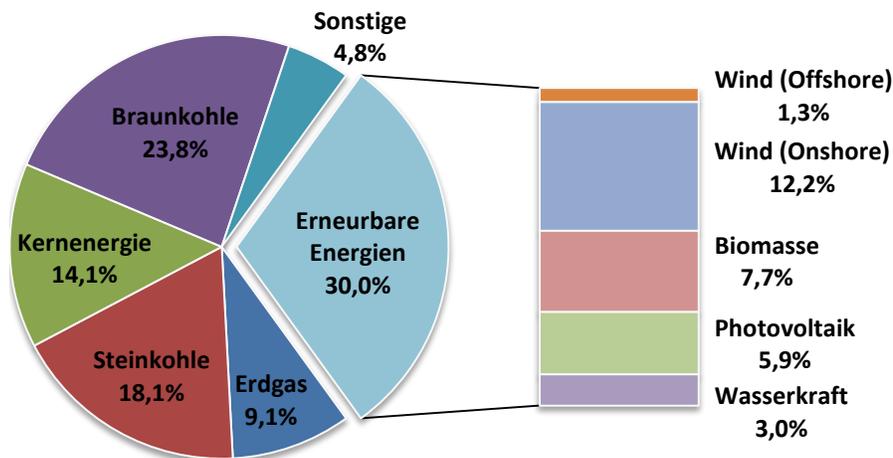


Abbildung 1: Zusammensetzung des Stroms 2015 in Deutschland. Von den insgesamt 651,8 Mrd kWh stammen ca. 196 Mrd kWh, also 30%, aus erneuerbaren Energien. Daten aus der Arbeitsgruppe Erneuerbare Energie-Statistik (AGEE-Stat) der Agentur für Erneuerbare Energien e. V..

1.2 Biogasproduktion

In Biogasanlagen kann abhängig vom Substrat fast die gesamte eingesetzte Biomasse zu 50-75% Methan und 25-50% CO₂ umgesetzt werden. Weitere entstehende Gase sind H₂, H₂S, Ammoniak und N₂ (Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V., 2013). Dieser natürliche Prozess ist sehr komplex und beansprucht das Zusammenwirken mehrerer Mikroorganismen. Er

besteht grundsätzlich aus vier Hauptschritten: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. In Abbildung 2 sind die Reaktionsschritte des Biogasprozesses dargestellt.

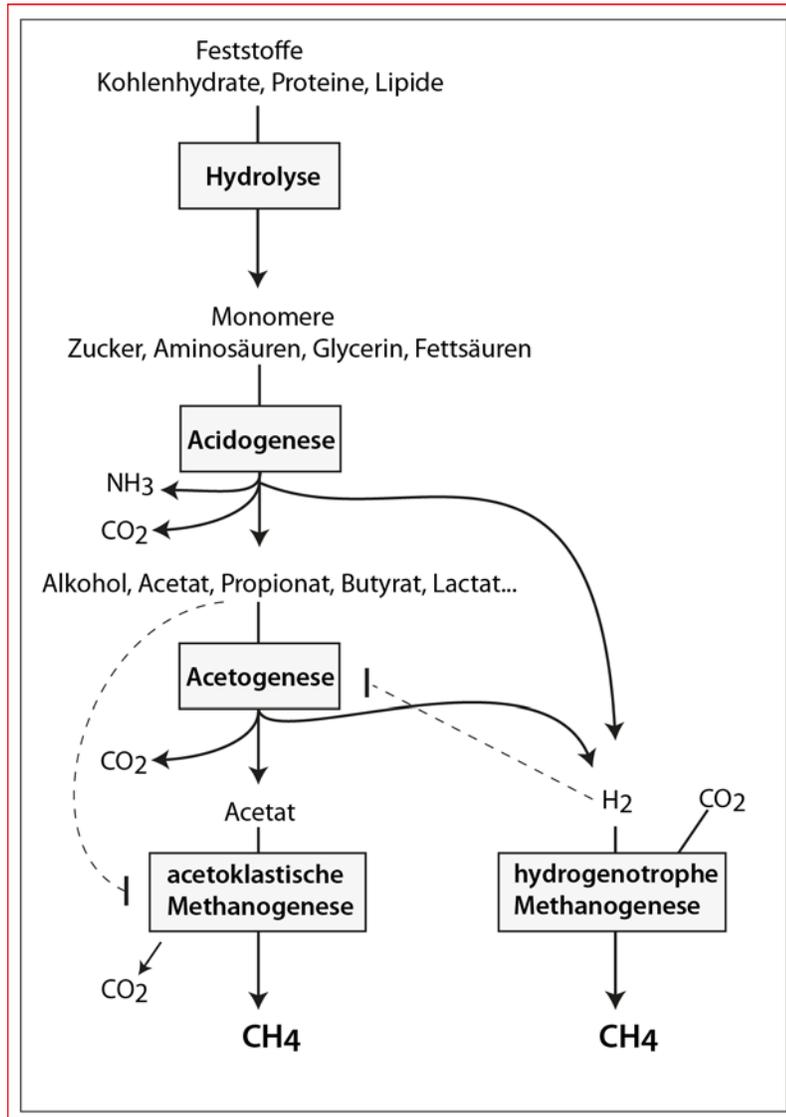


Abbildung 2: Reaktionsschritte der Biogasproduktion. Die gestrichelten Linien verweisen auf mögliche inhibierende Interaktionen.

Die Hydrolyse ist ein mehrstufiger Prozess, der durch das Zusammenspiel von extrazellulären Enzymen wie Cellulasen, Proteasen und Lipasen vermittelt wird. Dabei werden die festen und unlöslichen Ausgangssubstrate, bestehend aus Lignin, Kohlenhydraten, Cellulose, Lipiden und

Proteinen, zunächst in einfache und lösliche Bestandteile, den Monomeren Glucose, Arabinose, Xylose, Aminosäuren und fn umgewandelt. Hydrolytische Bakterien wie *Clostridium sp.*, *Proteus vulgaris*, *Peptococcus sp.*, *Bacteriodes sp.*, *Bacillus sp.*, *Vibrio sp.*, *Acetovibrio cellulitics*, *Staphylococcus sp.* und *Micrococcus sp.* sind an der Hydrolyse beteiligt (Stronach *et al.*, 1986). Die im Hydrolyseschritt gebildeten Monomere dienen acidogenen Mikroorganismen als Substrat für die Acidogenese. Durch die Abwesenheit eines anorganischen Elektronenakzeptors wird die Acidogenese auch als Fermentation oder Mischgärung bezeichnet. Es entstehen dabei kurzkettige Fettsäuren, wie Acetat, Butyrat und Propionat, sowie weitere Fermentationsprodukte wie Lactat und Alkohole und darüber hinaus die Gase H₂ und CO₂. Im nächsten, Wasserstoffpartialdruck (pH₂) abhängigen, Schritt sind acetogene Bakterien dann in der Lage, die organischen Säuren und CO₂ unter der Bildung von H₂ und Formiat weiter zu Acetat zu verstoffwechseln. Acetat, H₂ und CO₂ sind letztendlich Substrate der methanogenen Mikroorganismen, die zur Domäne der Archaea gehören. Vertreter der Methanogenen gehören beispielsweise zu den Ordnungen *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* und *Methanopyrales* (Angelidaki *et al.*, 2011). Für die Methanbildung unter anaeroben Bedingungen sind drei unterschiedliche Wege beschrieben. Zum einen gibt es die acetoklastische Methanogenese (1-1), bei der Acetat zu Methan und CO₂ gespalten wird. Dieser Weg macht ca. 70% der Methanproduktion aus. Die restlichen 30% entstehen mittels der hydrogenotrophen Methanogenese (1-2), wodurch CO₂ zu Methan reduziert wird. Als dritter Reaktionsweg zählt die methylotropische Methanogenese (1-3), bei der beispielsweise Methanol zu Methan, CO₂ und Wasser umgewandelt wird (Conrad *et al.*, 2010; Deppenmeier, 2002; Y. Liu and Whitman, 2008). Dieser Weg ist allerdings auf wenige Methanogene beschränkt. Die entsprechenden Reaktionen sind in den Gleichungen (1-1) bis (1-3) dargestellt.



1.2.1 Prozessstörungen

Da bei dem Biogasprozess verschiedene Organismengruppen beteiligt sind, ist es nicht verwunderlich, dass die Wachstumsraten und Sensitivitäten gegenüber Umweltveränderungen stark variieren. Folglich ist die Überwachung eines Biogasreaktors erforderlich, um Ungleichgewichte zwischen den Organismen sowie Prozessstörungen zu erkennen und diesen entgegen zu wirken (Nielsen *et al.*, 2007). Zu den typischen Überwachungsparametern zählen die Gasproduktion und -zusammensetzung, der pH-Wert, die Abbaurrate der organischen Trockensubstanz, pH_2 und die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren. Änderungen in diesen Parametern deuten auf Stressbedingungen und Störungen im Prozessablauf hin. Allerdings ist die Entstehung von messbaren Änderungen in Bezug auf pH-Wert, Abbaurrate der Trockensubstanz oder Gaszusammensetzung verzögert und gibt keinen Aufschluss über die aktuelle Situation im Reaktor (Angelidaki and Ahring, 1994; Nielsen *et al.*, 2007; Steyer *et al.*, 1999). Erst die Bestimmung der Konzentration und Zusammensetzung der kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat spiegelt den aktuellen Zustand der aktiven Organismen im System wieder. Geringe Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren sind ein Indiz für einen stabilen Prozess, somit werden hohe Konzentrationen einem bevorstehenden Prozessversagen zugeschrieben. Vor allem Propionat wird als guter Indikator für Prozessungleichgewichte angesehen, da selbst kleinste Störungen eine schnelle Ansammlung dieser Fettsäure auslösen (Kaspar and Wuhrmann, 1978). Die Abbaurrate des Propionats unter anaeroben Bedingungen wird zusätzlich als geschwindigkeitslimitierender Faktor im Biogasprozess angesehen (Amani *et al.*, 2011; De Bok *et al.*, 2004). Der Grund dafür liegt in der ungünstigen Thermodynamik der anaeroben Propionatoxidation. Wie in den Gleichungen (1-4) und (1-5) zu erkennen ist, beträgt die freie Gibbs-Energie ($\Delta G_0'$) +76 kJ/mol bzw. 65,3 kJ/mol. Folglich kann die Oxidation von Propionat zu Acetat nur dann erfolgen, wenn auf der Produktseite der Reaktion H_2 , Acetat und/oder Formiat ständig entzogen werden (Müller *et al.*, 2010; Thauer *et al.*, 1977).



In einem Biogasprozess geschieht dies durch die Methanogenen, die die entstehenden Produkte als Substrat für die Methanbildung benötigen. In diesem Fall bilden die protonenreduzierenden acetogenen Bakterien und die methanogenen Archaea ein syntrophes Konsortium (Stams *et al.*, 1993; Stams and Plugge, 2009). Dieses ist allerdings nur stabil, solange die Prozessbedingungen wie Temperatur und pH konstant bleiben. Kleinste Veränderungen können die empfindlichen Methanogenen inhibieren, was eine Ansammlung von Propionat im Reaktor zur Folge hat. Der Anstieg an Propionat wirkt sich wiederum inhibierend auf die methanogenen Organismen aus (Barredo and Evison, 1991; Wang *et al.*, 2009). Der Prozess der Methanogenese kommt zum Erliegen, als Resultat steigt der pH_2 weiter an und der pH-Wert sinkt. Wenn der Biogasprozess schon soweit aus dem Gleichgewicht geraten ist, ist ein Eingreifen, um das Umkippen des Biogasreaktors zu vermeiden, fast nicht mehr möglich. Daher ist die Bestimmung der Propionatkonzentration einer der effektivsten Prozessparameter zur Überwachung der Biogasproduktion. Durch die Kontrolle der Konzentration dieser Fettsäure könnte demnach nicht nur die Stabilität des Prozesses gewährleistet werden, sondern es wären auch Optimierungen in der Biogasbildung möglich (Nielsen *et al.*, 2007). Allerdings werden in frei stehenden Biogasanlagen stets *offline* Methoden verwendet, um die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren zu verfolgen. Das heißt, dass Proben aus dem Reaktor gezogen werden und diese zur Analyse in ein Labor übergeben werden müssen. Am weitesten verbreitet ist die Bestimmung des FOS/TAC-Wertes. FOS steht dabei für die flüchtigen organischen Säuren und TAC für die alkalische Pufferkapazität (totales anorganisches Carbonat) in der Probe. Der FOS/TAC Wert gibt das Verhältnis der flüchtigen organischen Säuren zur alkalischen Pufferkapazität als Maß für die Versäuerungsgefahr der Biogasanlage an. Dabei wird der Säuregehalt über eine Titration bestimmt und der FOS/TAC-Wert mittels empirisch erstellter Berechnungsformeln ermittelt. Diese Methode berücksichtigt allerdings die Pufferwirkung zusätzlicher Puffersysteme, wie beispielsweise den Ammonium/Ammoniak-Puffer, nicht. Präziser aber dafür kostenintensiver ist die Bestimmung des Fettsäurespektrums mittels Gaschromatographie (GC) oder Flüssigchromatographie (HPLC = high pressure liquid chromatography) (Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V., 2013; Rieger and Weiland, 2006). In Pilot- und Biogasanlagen im Labormaßstab ist die *online* Messung von kurzkettigen Fettsäuren bereits etabliert (Boe *et al.*, 2008; Pind *et al.*, 2003; Slater *et al.*, 1990; Ward *et al.*,

2011; Zumbusch *et al.*, 1994). Die Messung funktioniert dabei hauptsächlich über, an die Anlage angeschlossene, GC- und HPLC-Systeme. Dies geht mit einer intensiven Probenvorbereitung, unter anderem durch Filtration, einher um Verstopfungen und Bewuchs (fouling) der Chromatographie-Anlagen zu vermeiden. Für die direkte Messung von kurzkettigen Fettsäuren wie Propionat würde sich ein Biosensor besser eignen, da zum einen geringere Kosten entstehen (Anschaffung und Wartung) und zum anderen mit Hilfe eines bakteriellen Biosensors auch gleichzeitig Informationen über die biologische Funktion und Verfügbarkeit des Analyten gesammelt werden können (M. Park *et al.*, 2013).

1.3 Mikrobielle Brennstoffzellen

Eine weitere biotechnologische Methode zur nachhaltigen Energiegewinnung aus organischen Substanzen stellen mikrobielle Brennstoffzellen (MFC = microbial fuel cell) dar (Rabaey and Verstraete, 2005). Vor allem in der Abwasserreinigung finden MFC eine Anwendung, da in kommunalem, industriellen oder landwirtschaftlichen Abwasser viele unterschiedliche abbaubare Kohlenstoffe vorhanden sind, die durch Mikroorganismen in elektrische Energie umgewandelt werden können (Du *et al.*, 2007; H. Liu *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2005; Min and Logan, 2004; Oh and Logan, 2005). Eine andere Art der Anwendung für MFC ist auch der Einsatz als Biosensor. Darauf wird jedoch in Kapitel 1.4 genauer eingegangen.

Eine Brennstoffzelle ist ein galvanisches Element, in welchem chemische Energie in elektrische Energie umgewandelt wird. Der oxidative und reduktive Prozess finden in zwei durch eine protonenpermeable Membran getrennten Kompartimenten statt. Im anoxischen Anodenkompartiment einer mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC) dienen Mikroorganismen als Katalysatoren für die Oxidation von organischem Substrat zu CO₂ und Protonen. Dabei entstehende Elektronen werden durch Mikroorganismen an die Anode übertragen. Diese fließen weiter über einen externen Stromverbraucher zur Gegenelektrode, der Kathode. Im Kathodenkompartiment wird dann der Sauerstoff, der als Elektronenakzeptor dient, zu Wasser reduziert. Durch die protonenpermeable Membran wird ein Ladungsausgleich gewährleistet (Logan *et al.*, 2006). In Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung einer MFC zu sehen.

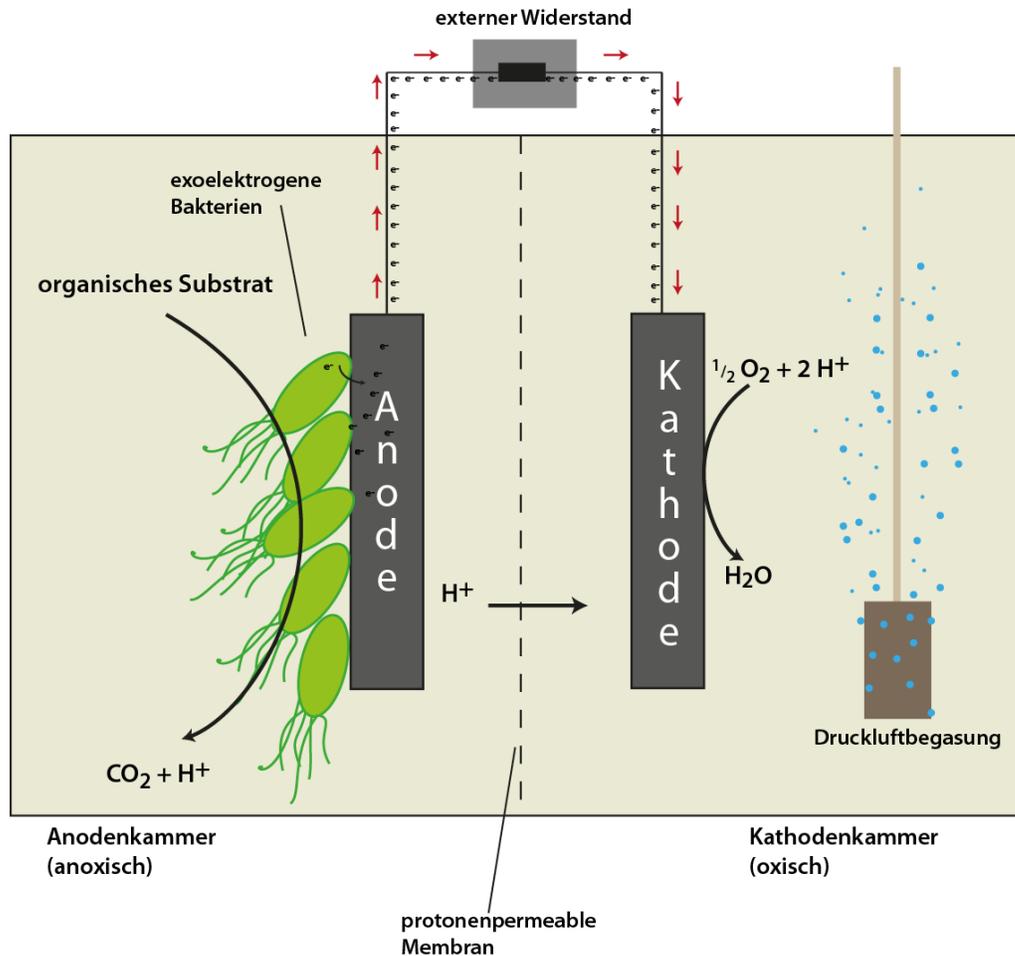


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC). In der anoxischen Anodenkammer befinden sich exoelektrogene Mikroorganismen, die das organische Substrat zu einem oder mehreren Produkten oxidieren und die dabei frei werdenden Elektronen auf die Anode übertragen. Auf Grund des Potentialunterschieds zwischen Anode und Kathode wandern die Elektronen über einen externen Widerstand zur Kathode. Dort werden sie auf Sauerstoff übertragen und Wasser entsteht. Mittels einer protonenpermeablen Membran können die Protonen von der Anodenkammer zur Kathodenkammer wandern.

1.3.1 Interaktion der Mikroorganismen mit der Anode

Damit die Elektronen überhaupt auf eine Elektrode übertragen werden können, müssen bestimmte Voraussetzungen gegeben sein. Zunächst sollte das Anodenkompartiment anoxisch sein, damit die Organismen respiratorische Elektronen nicht auf Sauerstoff übertragen, sondern auf die zur Verfügung gestellte Anode (siehe 1.4). Diese sollte zudem biokompatibel und chemisch inert sein. Während Platin und Titan sich in der Vergangenheit bereits als gute Elektrodenmaterialien bewährt haben, werden nun vermehrt auch günstigere Materialien, wie

Graphit-Vlies oder Kohlenstoff-Granulate verwendet (Kumar *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2011). Auch die eingesetzten Mikroorganismen spielen bei der Elektronenübertragung eine signifikante Rolle. Man unterscheidet drei Arten der Elektronenübertragung auf eine Anode. Bei der direkten Übertragung liegen die Bakterienzellen direkt auf der Anode auf und die Elektronen fließen über Cytochrome als terminale Reduktasen der Zelloberfläche auf den Akzeptor, die Anode. Der direkte Transfer erfordert dabei einen Abstand von weniger als 15 Å zwischen der Hämgruppe des Cytochroms und dem unlöslichen Akzeptor (Kerisit *et al.*, 2007) (Abbildung 4 I.). Zusätzlich zum direkten Kontakt über die Cytochrome der äußeren Membran können Bakterien auch leitfähige Fortsätze (*nanowires*) bilden, die es den Zellen erlauben, Elektronen auch über gewisse Distanzen auf die extrazellulären Elektronenakzeptoren oder Anoden zu übertragen. Diese Fortsätze sind im Falle von *S. oneidensis* Ausstülpungen der äußeren Membran, die ebenfalls die Cytochrome der verlängerten Elektronentransportkette enthalten (Pirbadian *et al.*, 2014). Andere exoelektrogene, wie *Geobacter sulfurreducens*, bilden Pili ähnliche Strukturen aus, die wahrscheinlich metallähnliche Leitungsmechanismen aufweisen (Lovley and Malvankar, 2015; Malvankar *et al.*, 2015; Snider *et al.*, 2012) (siehe Abbildung 4 II.). Eine indirekte Übertragung kann mit Hilfe von sogenannten „Redox-Shuttles“ oder „Mediatoren“ stattfinden. Shuttles sind redox-aktive Moleküle, die an der Zelloberfläche reduziert werden und in die Umgebung diffundieren. Dort können sie extrazelluläre Substrate oder weiter entfernte Anoden reduzieren (Gralnick and Newman, 2007; Marsili *et al.*, 2008; Velasquez-Orta *et al.*, 2010). Der Vorteil dieser Shuttles ist, dass sie mehrere Redox-Zyklen durchlaufen können. Sie werden entweder endogen hergestellt und sekretiert, wie Riboflavin oder Flavinmononukleotid (FMN), oder aus der Umgebung bezogen (siehe Abbildung 4 III.). Eine weitere Möglichkeit schwerlösliche Metalle zu reduzieren ist die Sekretion von Metall-Chelatoren, welche schwerlösliche Metalle solubilisieren können. Der gelöste Metallkomplex kann so durch die Zellmembranen diffundieren und cytoplasmatisch reduziert werden (nicht dargestellt) (Kouzuma *et al.*, 2012).

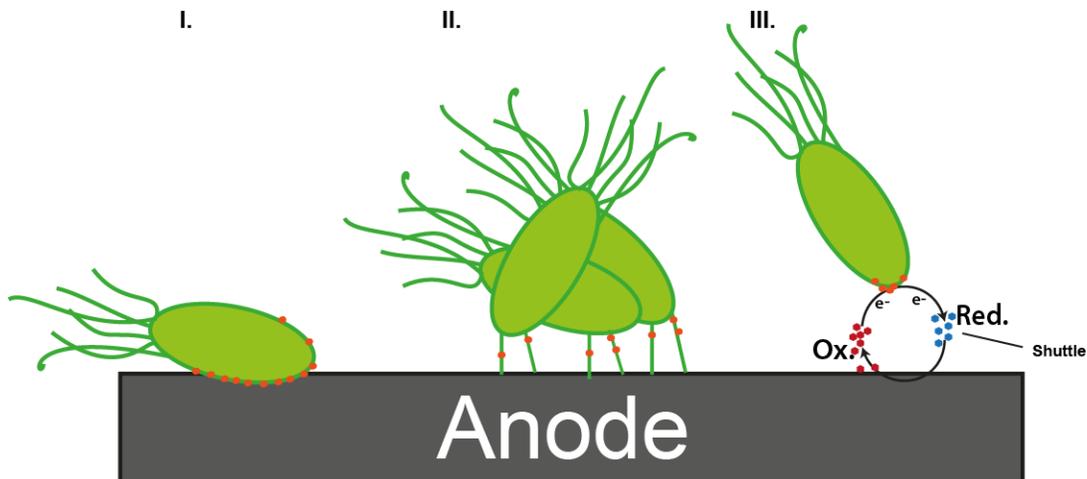


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen exoelektrogenen Mikroorganismen und der Anode. I. Direkte Übertragung der Elektronen auf den Akzeptor über Cytochrome (orange). II. Konduktive Pili und Zellausstülpungen mit löslichen Cytochromen durchziehen einen Biofilm bis zur Anodenoberfläche. III. Elektronen werden von den Cytochromen auf lösliche extrazelluläre Shuttles übertragen (reduzierte Form blau). Diese diffundieren zur Anodenfläche und geben die Elektronen dort ab. Die oxidierten Shuttles (rot) können wieder durch die Cytochrome der Bakterienzelle reduziert werden.

1.3.2 Anaerobe Atmung und dissimilatorische Metallreduktion

Die zur Vermehrung und zum Aufrechterhalten des Stoffwechsels benötigte Energie kann durch unterschiedliche Mechanismen, wie Atmung, Gärung oder Photosynthese bereitgestellt werden. Die theoretische Energieausbeute aus der Atmung ergibt sich dabei aus der Differenz des Standardredoxpotentials (E_0') des Elektronendonors und des Elektronenakzeptors. Da Sauerstoff ein sehr hohes Redoxpotential ($E_0' = +810 \text{ mV}$) besitzt, ist die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff mit einem sehr hohen Energiegewinn verbunden (Thauer *et al.*, 1977). Viele Mikroorganismen sind allerdings auch in der Lage alternative Elektronenakzeptoren zu nutzen, also anaerob zu atmen. Zu den häufigsten alternativen Elektronenakzeptoren zählen unter anderem Nitrat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Trimethylaminoxid (TMAO), Fumarat und Sulfat (Burns and DiChristina, 2009; Gralnick *et al.*, 2006; C. R. Myers and Nealson, 1988a; Styrvold and Strom, 1984; Thauer *et al.*, 1977; Wood, 1981). Mit den sinkenden Redoxpotentialen gewinnen die Organismen allerdings auch weniger Energie. Daher nutzen Organismen von mehreren alternativen Elektronenakzeptoren bevorzugt die mit der größtmöglichen Energieausbeute zuerst (Unden and Bongaerts, 1997).

Eine besondere Form der anaeroben Atmung ist die dissimilatorische Metallreduktion (DMR), bei der Metalloxide wie Fe(III) oder Mn(IV) als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden. Da diese Metalloxide bei neutralem pH unlöslich sind, mussten eisenreduzierende Bakterien, wie *S. oneidensis* oder *G. metallireducens*, besondere Mechanismen entwickeln, um diese zu reduzieren (Lovley *et al.*, 2004). An der erweiterten Elektronentransportkette von *S. oneidensis* soll exemplarisch der Mechanismus des Elektronentransfers aus den intrazellulären Atmungsketten auf die Zelloberfläche dargestellt werden.

1.3.2.1 Erweiterte Elektronentransportkette von *Shewanella oneidensis*

S. oneidensis ist ein nicht-fermentatives, fakultativ anaerobes γ -Proteobakterium, das 1988 aus dem Lake Oneida (New York, USA) durch Myers und Nealson isoliert wurde (C. R. Myers and Nealson, 1988b). Dieses Bakterium hat die Fähigkeit eine Vielzahl an alternativen Elektronenakzeptoren für die anaerobe Atmung nutzen zu können. Von Nitrat, Nitrit, Sulfat, Sulfit, elementarem Schwefel, Fumarat, DMSO, TMAO bis hin zu Mn(IV)-Oxid und Fe(III)-Verbindungen (Gralnick *et al.*, 2006; Lovley *et al.*, 2004). Für die Übertragung der Elektronen an die Zelloberfläche hat *S. oneidensis* eine erweiterte Elektronentransportkette entwickelt. Viele der daran beteiligten Proteine gehören zur Familie der *c*-Typ Cytochrome. Die Redoxeigenschaften der Cytochrome werden durch die Anzahl der Häm-Gruppen, die als Co-Faktoren kovalent mit dem Protein verbunden sind, bestimmt (Bücking *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2008). Das Genom von *S. oneidensis* kodiert sogar für 41 *c*-Typ Cytochrome mit hauptsächlich mehreren Häm-Gruppen. Davon sind neun cytoplasmatisch, fünf auf der äußeren Zellmembran und die restlichen 27 im Periplasma lokalisiert (Gao *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2004; Romine *et al.*, 2008). Die erweiterte Elektronentransportkette bei *S. oneidensis* beginnt an der Cytoplasmamembran mit der Übertragung der Elektronen vom Menachinonpool auf das Tetrahäm-Cytochrom CymA (cytoplasmic membrane protein A) (C. R. Myers and Myers, 1993; Judith M. Myers and Myers, 2000). Die Elektronen im Menachinonpool stammen dabei beispielsweise aus der Oxidation von Formiat an der membranständigen Formiatdehydrogenase. Menachinon ist aufgrund seines niedrigeren Redoxpotentials von $E_0 = -74$ mV im Vergleich zu Ubichinon mit $E_0 = +113$ mV notwendig, um eine Vielzahl anaerober

Atmungsvorgänge zu ermöglichen, da alternative Elektronenakzeptoren meist ein niedrigeres Redoxpotential als Sauerstoff besitzen (Thauer *et al.*, 1977). Von CymA aus können verschiedene periplasmatische Cytochrome mit Elektronen versorgt werden, wie z. B. FccA (Flavocytochrom A), STC (small tetraheme cytochrome) oder MtrA (metal reducing protein A) (Judith M. Myers and Myers, 2000;Schwalb *et al.*, 2003). STC und FccA, die am häufigsten vorkommenden Cytochrome im Periplasma, sind für die Weiterverteilung der Elektronen im Periplasma und auf weitere Cytochrome der äußeren Zellmembran zuständig. Untereinander können STC und FccA allerdings nicht interagieren (Fonseca *et al.*, 2013;Sturm *et al.*, 2015). FccA ist zusätzlich die einzige respiratorische Fumarat-Reduktase in *S. oneidensis* (Maier *et al.*, 2003;Meyer *et al.*, 2004;Sturm *et al.*, 2015). Für die Übertragung der Elektronen vom Periplasma zur äußeren Membran spielt das Decahäm-Cytochrom MtrA eine wichtige Rolle (Pitts *et al.*, 2003;Schuetz *et al.*, 2009). Durch die Deletion des *mtrA* Gens in *S. oneidensis* konnte nämlich gezeigt werden, dass unlösliche Verbindungen wie Fe(III)-Citrat und Mn(IV)-Oxid nicht mehr reduziert werden konnten, wohingegen die Reduktion anderer Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Nitrit, DMSO, Thiosulfat und Sulfat nicht beeinträchtigt wurde (Beliaev *et al.*, 2001;Bretschger *et al.*, 2007). Die Elektronen können direkt von FccA auf MtrA und auch umgekehrt übertragen werden (Schuetz *et al.*, 2009). Dabei kann MtrA sowohl löslich im Periplasma vorkommen als auch zusammen mit MtrB und MtrC einen stabilen Komplex an der äußeren Membran bilden, den sogenannten MtrABC-Komplex. Das periplasmatische MtrA bindet an das äußere Membranprotein MtrB, welches wiederum auf der extrazellulären Seite mit dem Decahäm-Cytochrom MtrC verbunden ist. MtrC wirkt an der Zelloberfläche als terminale Reduktase (Hartshorne *et al.*, 2007;J M Myers and Myers, 2003;Ross *et al.*, 2011). Durch die Aufklärung der Proteinstruktur von MtrF, welches ein Homolog zu MtrC ist, konnte gezeigt werden, dass zwei Hämgruppen an der Außenseite des Proteins exponiert sind. Diese katalysieren wahrscheinlich die direkte Übertragung der Elektronen auf unlösliche Akzeptoren oder Anoden (T. A. Clarke *et al.*, 2011). In Abbildung 5 ist die erweiterte Elektronentransportkette von *S. oneidensis* schematisch dargestellt.

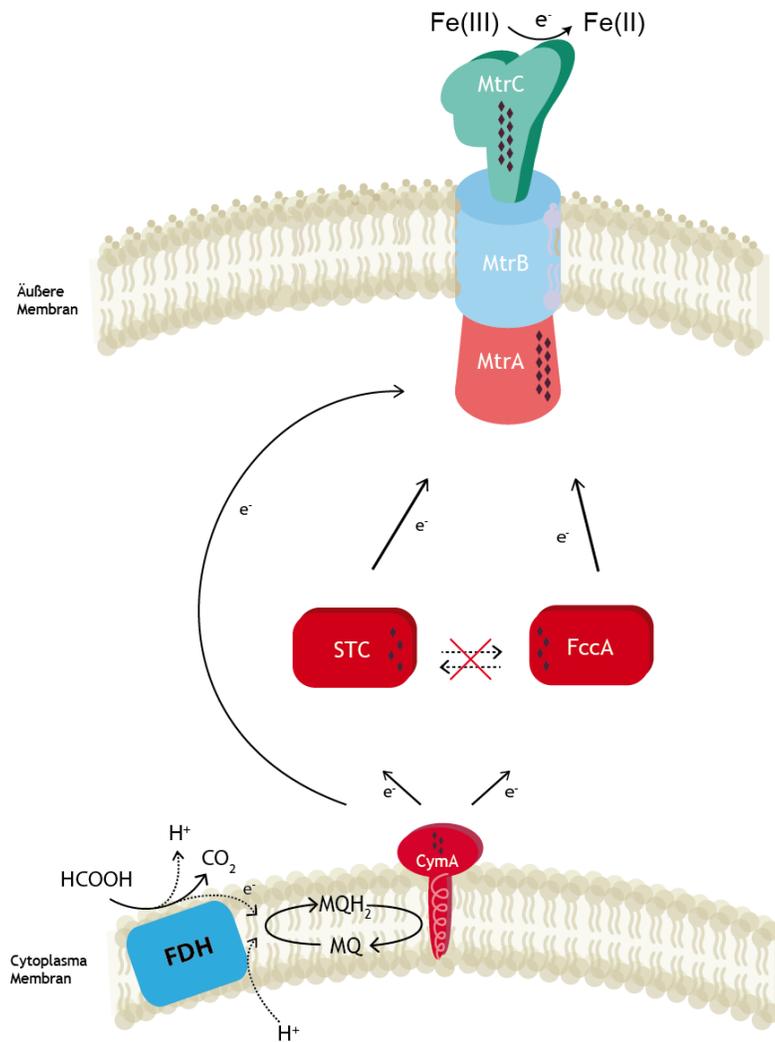


Abbildung 5: Schematische Darstellung der erweiterten Elektronentransportkette zur Eisenreduktion in *S. oneidensis* (nach Sturm 2014). Der Elektronentransport erfolgt von der Formiatdehydrogenase über den Menachinonpool auf CymA. CymA überträgt die Elektronen auf die periplasmatischen Cytochrome MtrA, STC und FccA, die wiederum die Elektronen auf den MtrABC-Komplex transportieren, wodurch extrazelluläre Akzeptoren wie Fe(III) mittels MtrC zu Fe(II) reduziert werden können. Der Austausch an Elektronen zwischen STC und FccA ist nicht gegeben (Fonseca *et al.*, 2013;Sturm *et al.*, 2015). Die Rauten in den Proteinen symbolisieren die Anzahl der Häm-Gruppen in dem jeweiligen Protein.

Wie bereits beschrieben besitzt *S. oneidensis* fünf Gene, die für potentielle äußere Membrancytochrome (OMC = outer membrane cytochrome) kodieren. Neben *mtrC* zählen dazu *mtrF*, *omcA*, *SO_1659* und *SO_2931*. Unter physiologischen Bedingungen konnte allerdings nur die Expression von *mtrC* und *omcA* nachgewiesen werden (Bücking *et al.*, 2010). Das Gen des zu

MtrC homologen Cytochroms MtrF befindet sich ebenfalls in einem Gencluster mit den Genen *mtrD* und *mtrE*, nämlich *mtrDEF*. Dieses Gencluster hat eine sehr große Ähnlichkeit zum *mtrCAB*-Operon (Reyes *et al.*, 2010), was eine Austauschbarkeit der Proteine der beiden Komplexe auf Grund der hohen Homologie vermuten lässt. Coursolle and Gralnick (2010) konnten tatsächlich zeigen, dass MtrF mit MtrA und MtrB einen funktionellen Komplex bilden kann. Darauf aufbauend konnten Golitsch *et al.* (2013) durch genetische Manipulation an einem *S. oneidensis* Δ OMC Stamm (Bücking *et al.*, 2010), das *mtrF* Gen mit vorgeschaltetem Arabinose-induzierbaren Promotor P_{BAD} vor das Gencluster *mtrAB* genomisch integrieren. Dabei konnten sie zeigen, dass die Expression des MtrFAB-Komplexes und folglich die Fähigkeit der Elektronenübertragung auf eine Anode erst durch die Induktion mit Arabinose möglich war. Der Genotyp und der MtrFAB-Komplex der äußeren Membran sind in der Abbildung 6 schematisch dargestellt. Diese induzierbare Fähigkeit zu Elektronenübertragung an die Zelloberfläche eignet sich sehr gut für den Einsatz des Stammes als universeller Plattformstamm für die Entwicklung von mikrobiellen Biosensoren.

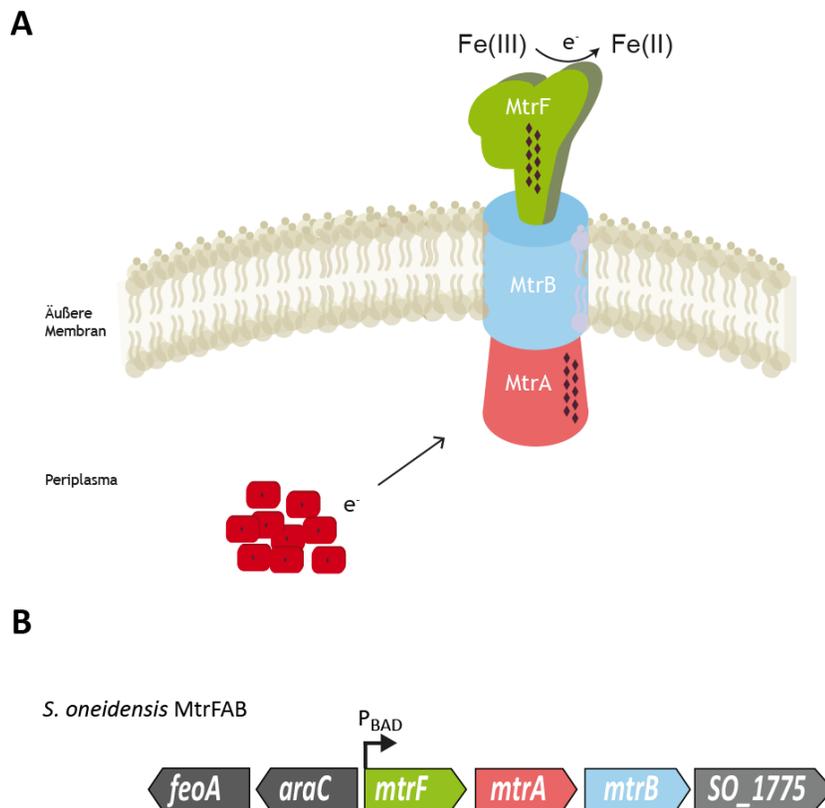


Abbildung 6: A) Schematische Darstellung des MtrFAB-Komplexes des Stammes *S. oneidensis* MtrFAB in der äußeren Membran. Die roten Rechtecke mit den schwarzen Rauten symbolisieren die periplasmatischen Cytochrome. **B) Ausschnitt des veränderten Genlokus in *S. oneidensis* MtrFAB mit flankierenden Genen *feoA* und *SO_1775*.** Die Gene des MtrFAB-Komplexes sind in den entsprechenden Farben eingezeichnet. Das Gen *araC* kodiert für den Regulator AraC des Arabinose-induzierbaren Promotors P_{BAD} (schwarzer Pfeil).

1.4 Mikrobieller Biosensor

Seit der Entwicklung eines Biosensors für die Glucosebestimmung im Blut (Clark Jr. and Lyons, 1962) wurden immer mehr Biosensoren und deren Anwendungsgebiete erforscht. Diese reichen vom Gesundheitsbereich bis hin zur Lebensmittel- und Umweltüberwachung. Es gibt daher auch unterschiedliche sensorische biologische Elemente, die für eine Entwicklung von Biosensoren verwendet werden können. Dies können Enzyme, Co-Faktoren, Antikörper, Organellen oder auch ganze Mikroorganismen sein (D'Souza, 2001; Lei *et al.*, 2006). Obwohl Enzyme auf Grund ihrer hohen Spezifität zu Substraten oder Inhibitoren, das am meisten verwendete biologische Element in Biosensoren darstellen, ist deren zeit- und

kostenaufwendige Aufreinigung und der Bedarf an Co-Faktoren auch eine große Schwachstelle. Mikroorganismen bieten dafür eine geeignete Alternative, da sie die Enzyme und die nötigen Co-Faktoren innerhalb der Zelle bereitstellen können. Durch einfache Manipulationen kann zudem das Substratspektrum erweitert und optimiert werden (D'Souza, 2001). Mikrobielle Biosensoren koppeln zwei biologische Komponenten in einem genetischen Konstrukt. Die eine Komponente ist ein sensorisches Element, welches die Anwesenheit einer Chemikalie oder physischen Änderung wahrnimmt. Das andere Element wandelt die Wahrnehmung in ein proportionales, messbares Signal um (M. Park *et al.*, 2013). Einer der ersten angewandten mikrobiellen Biosensoren war beispielsweise der Naphthalin Biosensor für die Überwachung der Bodenkontamination an Gas-Kraftwerken (manufactured gas plant). Dabei wurde ein Naphthalin-induzierbarer Promoter vor die *luxCDABE* Gene aus *Vibrio fischeri* in den Organismus *Pseudomonas fluorescens* kloniert, wodurch die Lumineszenz als Signal messbar wurde (Bousse, 1996; King *et al.*, 1990). Nach demselben Prinzip wurden weitere Sensoren für die Detektion von Verunreinigungen durch Schwermetalle wie Quecksilber, Aluminium, Arsen und Cadmium entwickelt (Barkay, 1993; Bousse, 1996; Guzzo *et al.*, 1992). Erst vor kurzem haben Li und Yu (2014) einen ersten Ansatz für einen mikrobiellen Biosensor für die Propionatdetektion in anaeroben Gärungsprozessen vorgestellt, der ebenfalls auf der Signaltransduktion über die *lux*-Kassette basiert. Hierfür wurden das *prpR* Gen und der Promotor P_{BCDE} aus *Escherichia coli* entnommen und vor die *luxCDABE* Gene in einen Vektor kloniert. Dieses Konstrukt wurde in den *E. coli* W3110 Stamm transformiert und die Lumineszenz in Abhängigkeit von der Propionatkonzentration getestet. Eine Dosiswirkung konnte allerdings nur bei reinen Propionatstammlösungen gezeigt werden. Proben aus anaeroben Fermentern ergaben kaum signifikante Signale, was auf eine mögliche Inhibition des Sensorstammes durch die Probenzusammensetzung und Trübung hindeutete (Girotti *et al.*, 2008; Hirmann *et al.*, 2007). Neben den optischen Messmethoden, wie Lumineszenz, Fluoreszenz oder Kolorimetrie, werden heutzutage auch immer mehr elektrochemische Techniken zur Detektion eingesetzt. Diese werden in amperometrische, potentiometrische, konduktometrische und voltametrische Methoden eingeteilt (Su *et al.*, 2011). Bioelektrochemische Systeme (BES), wie sie z.B. in mikrobiellen Brennstoffzellen genutzt werden, sind eine neue Abwandlung der oben aufgeführten Methoden. Vor allem BES-basierte Biosensoren haben den Vorteil der

Langzeitstabilität und bieten dadurch die Möglichkeit für eine *online* Überwachung (Chang *et al.*, 2004;Kim *et al.*, 2003). Diese Technik wird daher auch in Bezug auf die Untersuchung des BSB (Biologischer Sauerstoffbedarf), also die Bestimmung der biologisch abbaubaren organischen Masse in Abwässern, erfolgreich angewandt (Chang *et al.*, 2004;Gil *et al.*, 2003;Kim *et al.*, 2003;Kumlanghan *et al.*, 2007;Di Lorenzo *et al.*, 2009). Mit dieser Technik können folglich auch spezifische Analyten quantifiziert werden, wenn beispielsweise, die eingesetzten Mikroorganismen ein spezifisches Spektrum für Elektronendonoren haben. Tront *et al.* (2008a;b) konnten durch den Einsatz der substratspezifischen Organismen *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* MR-1 in MFC basierten Biosensoren Acetat- sowie Lactatkonzentrationen bestimmen. Nicht zuletzt ist der von Golitsch *et al.* (2013) entwickelte Stamm *S. oneidensis* MtrFAB zu erwähnen. Dieser bereits in Abschnitt 1.3.2.1 beschriebene Stamm gilt als universeller Plattformstamm für den Einsatz als mikrobiellen Biosensor. Die Fähigkeit dieses Stammes zur Stromproduktion wurde dabei unter die Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors gesetzt. Dies führte zu einer Arabinose-abhängigen Stromproduktion, die sich bei einer Induktorkonzentration zwischen 0 und 1 mM sogar linear proportional verhielt. Durch die Austauschbarkeit der Promotorregion entsprechend des Analyten, könnte dieser Stamm eine gute Grundlage für die Entwicklung eines Propionat-induzierbaren mikrobiellen Biosensors bilden.

1.5 Propionat Metabolismus von *E. coli* K12

Propionat ist eine der meist verbreiteten kurzkettigen Fettsäuren in der Natur. Wie bereits für die Biogasproduktion beschrieben ist Propionat ein häufiges Nebenprodukt der bakteriellen Fermentation (Ahring *et al.*, 1995;Nielsen *et al.*, 2007;Ullah *et al.*, 2014). Interessanterweise wird Propionat auch als Konservierungsmittel für Backwaren oder Tierfutter verwendet. Die antimikrobielle Wirkung scheint auf der Auflösung der protonenmotorischen Kraft zu beruhen, da das protonierte Molekül durch Diffusion in das Cytoplasma der Zellen gelangt und dort dissoziiert. Dieser Effekt ist auch für andere kurzkettige Fettsäuren bekannt (Salmond *et al.*, 1984). Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die intrazelluläre Ansammlung des Propionats

Stoffwechselwege blockiert und somit das Zellwachstum verhindert (Horswill *et al.*, 2001). Darmbakterien wie *Salmonella* spp. oder *E. coli* sind in ihrem Umfeld oft hohen Propionatkonzentrationen ausgesetzt, da viele fermentierende Bakterien, wie *Propionibacteria*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Selenomonas*, *Megasphaera*, *Bacteroides* und *Fusobacterium* dieselben Lebensräume besiedeln (Border *et al.*, 1987). Um den antimikrobiellen Effekten des Propionats zu entgehen, haben Prokaryoten unterschiedliche Stoffwechselwege entwickelt dieses Molekül zu verwerten oder abzubauen. *Salmonella enterica* und *E. coli* nutzen beispielsweise den 2-Methylcitrat-Zyklus (Horswill and Escalante-Semerena 1999; Textor *et al.* 1997). Die Gene, die für die Oxidation von Propionat zu Pyruvat über 2-Methylcitrat benötigt werden, werden als *prp*-Gene bezeichnet. Diese fünf Gene bilden ein Operon mit zwei divergenten Transkriptionseinheiten, ein sogenanntes Divergon (Suvorova *et al.*, 2012). Die erste Transkriptionseinheit wird gebildet durch das Gen *prpR*, welches für den Transkriptionsregulator PrpR kodiert. Dieser Transkriptionsregulator ist ein Mitglied der σ^{54} -Faktor abhängigen Regulatorfamilie. Das Gencluster *prpBCDE*, welches die zweite Transkriptionseinheit bildet, setzt sich zusammen aus den Genen *prpB*, *prpC*, *prpD* und *prpE*, die jeweils für die Enzyme des Propionatabbauweges kodieren (siehe Abbildung 7) (Horswill and Escalante-Semerena, 1997; Tsang, Horswill, and Jorge, 1998). Weiterhin sind im *prp*-Operon von *E. coli* K12 zwei intergene Regionen, sogenannte REP-Regionen (*repetitive extragenic palindromic sequences*), nämlich REP25 und REP26, annotiert (Blattner *et al.*, 1997).

A



B

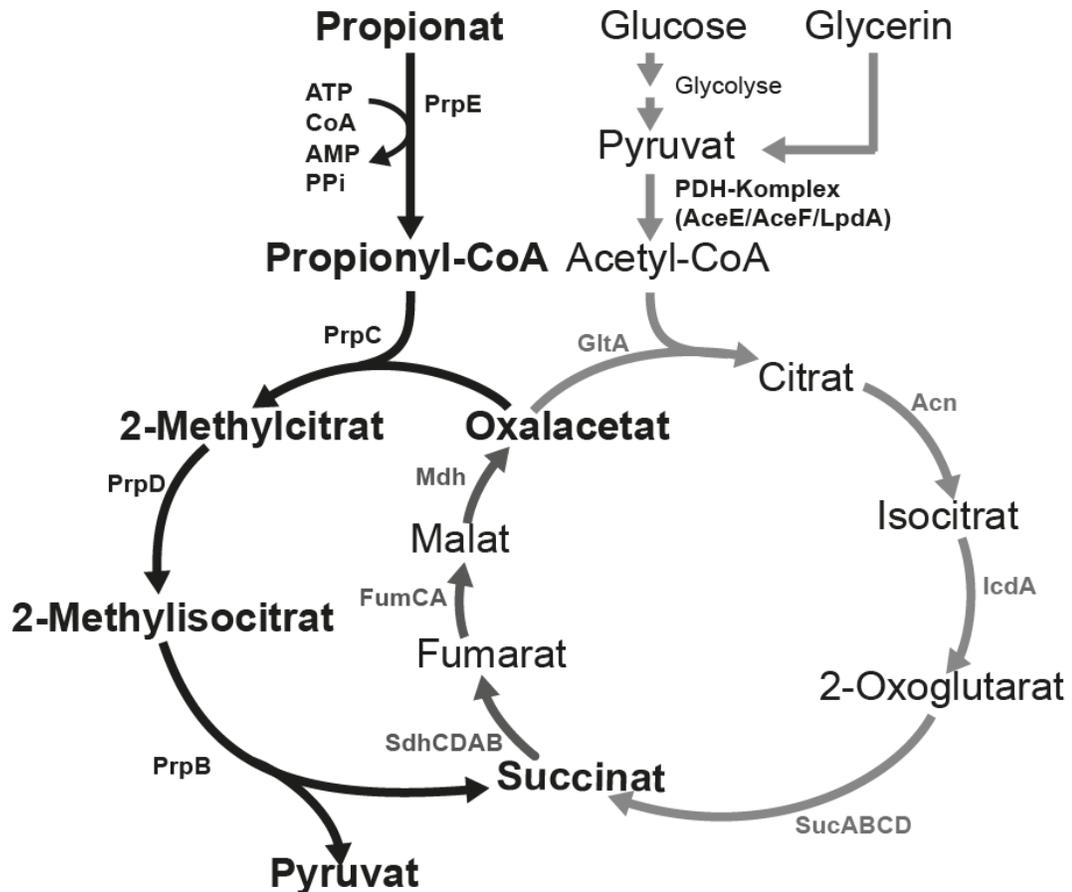


Abbildung 7: A) Schematische Darstellung des *prp*-Operons mit dem bidirektionalen Promotor und den extragenen Regionen REP25 und REP26 im Genom von *E. coli* K12. B) Überblick des 2-Methylcitrat-Zyklus und den Schnittstellen zum Citrat-Zyklus. Der Citrat-Zyklus ist in grau dargestellt.

Der Propionatabbau beginnt mit der Aktivierung des Propionats zu Propionyl-CoA mittels der Propionyl-CoA-Synthetase (PrpE), unter Verbrauch von einem ATP (Horswill and Escalante-Semerena, 1999b, 2002; F. Liu *et al.*, 2014; Textor *et al.*, 1997). Es folgt eine Verknüpfung des

Propionyl-CoA mit Oxalacetat durch die 2-Methylcitrat-Synthase (PrpC) zu 2-Methylcitrat. Die Ansammlung von 2-Methylcitrat wirkt inhibierend auf das Zellwachstum, da eine Inhibierung der Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase), dem Schlüsselenzym der Gluconeogenese, durch 2-Methylcitrat gezeigt werden konnte (Rocco and Escalante-Semerena, 2010). Im nächsten Schritt katalysiert das Enzym 2-Methylcitrat-Dehydratase (PrpD) die Isomerisierung von 2-Methylcitrat zu 2-Methylisocitrat, welches weiter durch die 2-Methylisocitrat-Lyase (PrpB) zu Pyruvat und Succinat gespalten wird. Die abschließende oxidative Regenerierung von Succinat zu Oxalacetat erfolgt im Citrat-Zyklus (Textor *et al.*, 1997).

1.5.1 Regulation des *prp*-Operons

Die Regulation des *prp*-Operons ist sehr komplex, da schon frühere Studien mit *S. enterica* zeigten, dass die Transkription des *prpBCDE* Genclusters die Funktion des Transkriptionsregulators PrpR benötigt, welcher wiederum durch 2-Methylcitrat, den σ^{54} Faktor RpoN und den globalen Regulationsfaktor IHF (integration host factor) aktiviert werden muss (Horswill & Escalante-Semerena 1997; Palacios & Escalante-Semerena 2000; Rocco & Escalante-Semerena 2010; Tsang *et al.* 1998). Eine putative CRP-Bindestelle (c-AMP receptor protein) auf der Promoterregion des *prp*-Operons suggeriert eine mögliche Beteiligung des CRP-Komplexes. Dies bedeutet, dass das *prp*-Operon einer Katabolitrepression unterliegen könnte. (S. K. Lee *et al.*, 2005). Dennoch ist der Promotor $P_{prpBCDE}$ induzierbar durch Propionat und reagiert proportional auf steigende Propionatkonzentrationen. Aus diesem Grund wurde der Promotor als eine kostengünstigere Alternative zu den IPTG-induzierbaren Expressionssystemen vorgeschlagen (S. K. Lee and Keasling, 2005, 2008). Gerasimova *et al.*, (2003) schlagen zudem eine sauerstoffabhängige Transkriptionsregulation vor, da die bioinformatische Recherche eine putative ArcA-Bindestelle in der Promotorregion des P_{prpR} ergab.

1.5.2 Anaerober Propionatabbau in *E. coli* K12

Es ist kaum etwas über die anaerobe Expression und Regulation des *prp*-Operons bekannt. Wie bereits in Gleichung (1-4) und (1-5) beschrieben, ist die anaerobe Oxidation von Propionat ohne Elektronenakzeptor endergon (Müller *et al.*, 2010; Thauer *et al.*, 1977) und benötigt das Zusammenspiel weiterer Organismen, um den Wasserstoffpartialdruck, sowie die

Produktkonzentrationen möglichst gering zu halten (Stams *et al.*, 1993; Stams and Plugge, 2009). Hierbei muss erwähnt werden, dass die acetogenen Bakterien Propionat üblicherweise über den Methylmalonyl-CoA (MMC) Weg verstoffwechseln (Houwen *et al.*, 1990; Kosaka *et al.*, 2006; Plugge *et al.*, 1993; Wallrabenstein *et al.*, 1994). Bei diesem Stoffwechselweg werden die Elektronen in drei Reaktionsschritten freigesetzt: der Oxidation von Succinat zu Fumarat sowie von Malat zu Oxalacetat und der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Die Oxidation von Succinat zu Fumarat bildet dabei den limitierenden Schritt (Kosaka *et al.*, 2006). Man vermutet, dass in der Syntrophie der Mechanismus, der die Succinatoxidation zu Fumarat vorantreibt, möglicherweise ähnlich zum reversen Mechanismus ist, der die Energiekonservierung während der Fumaratatmung bei *Wolinella succinogenes* verursacht. Die Elektronen, die während der Oxidation des Succinats entstehen, werden mittels des umgekehrten Elektronentransports (RET, reversed electron transport) auf ein niedrigeres Redoxpotential verschoben. Obwohl der anaerobe Propionatabbau energetisch ungünstig ist, ergibt jedoch die anaerobe respiratorische Propionatoxidation gekoppelt mit der Ammonifizierung von Nitrat oder einer DMSO-Reduktion energetisch günstige ΔG° Werte von -835,5 kJ/mol bzw. -527,7 kJ/mol (Thauer *et al.*, 1977). In dieser Arbeit konnte dennoch gezeigt werden, dass *E. coli* K12 selbst mit Nitrat oder DMSO als Elektronenakzeptor mit Propionat als einzige Kohlenstoffquelle nicht wachsen kann. Dies könnte im Falle der DMSO-Reduktion darauf zurückzuführen sein, dass diese Menachinon abhängig ist, aber das Redoxpotential von Menachinon ($E^\circ = -74$ mV) für die Propionat-Oxidation zu niedrig ist. Da *E. coli* keine RET-gekoppelte Succinatoxidation nutzen kann, ist die Kopplung der DMSO-Reduktion mit der respiratorischen Propionatoxidation nicht möglich. Der anaerobe Propionatabbau mit Nitrat als Elektronenakzeptor sollte hingegen den Schritt der Succinatoxidation ermöglichen, da Prohl *et al.* zeigen konnten, dass der Glycerinstoffwechsel gekoppelt mit der Nitrat-Reduktion über den Citrat-Zyklus läuft und die Oxidation von Succinat zu Fumarat dadurch nicht blockiert ist (Prohl *et al.*, 1998).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, den anaeroben Propionatmetabolismus von *E. coli* K12 genauer zu untersuchen und durch genetische Manipulation einen Stamm zu generieren, der in der Lage sein sollte Propionat unter anaeroben Bedingungen abzubauen.

Hierfür sollte zunächst der *E. coli* K12 Wildtyp Stamm unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert und die Propionatabnahme in An- und Abwesenheit des Co-Substrats Glycerin chromatographisch verfolgt werden, um mögliche Limitierungen auf Grund des anaeroben Stoffwechsels aufzudecken. Weiterhin sollte durch die Herstellung und Analyse von Transkriptomdaten auf eine mögliche differenzielle Expression des *prp*-Operons unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht werden. Mit den daraus gewonnenen Informationen sollte ein möglicher Regulationsmechanismus abgeleitet und getestet werden.

Das Interesse und die Notwendigkeit eines anaerob funktionierenden Propionatabbaus in *E. coli* ergeben sich aus der zu entwickelnden Anwendung. Im Laufe dieser Arbeit sollte nämlich auch ein mikrobieller Biosensor entwickelt werden, der in der Lage sein soll Propionat in unterschiedlichen Konzentrationen zu detektieren und mit Hilfe einer BES-basierten Technologie in ein proportionales Stromsignal zu transformieren. Erste Hinweise für eine Propionat-induzierbare Elektronenübertragung sollten zunächst mittels eines Eisenreduktionsassays gegeben werden.

Weiterhin sollte in Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT) in Jena ein Mikrofluidik-Chip entwickelt und optimiert werden, der als Alternative zu aufwendigen und komplizierten Labor-MFC-Aufbauten dienen sollte. Erste Charakterisierungen und Funktionstests sollten mit den bereits bekannten exoelektrogenen Organismen *S. oneidensis* MR-1 und dem Arabinose-induzierbaren *S. oneidensis* MtrFAB (Golitsch *et al.*, 2013) durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen und Materialien

2.1.1 Liste der verwendeten Mikroorganismen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2-1: aufgelistet.

Tabelle 2-1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> K12 (JG109)	Wildtyp Stamm	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> Δrnr (JG931)	$rnr::kanR$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
<i>E. coli</i> $\Delta rnr\Delta kanR$ (JG943)	$\Delta rnr, \Delta kanR$	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> $\Delta arcA$ (JG649)	$arcA::kanR$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
<i>E. coli</i> $\Delta arcA\Delta kanR$ (1020)	$\Delta arcA\Delta kanR$	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 α ZI (JG22)	<i>aci q</i> , PN25- <i>tetR</i> , SpR, <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$, Phi80 <i>lacZDM15</i>	(Lutz and Bujard, 1997)
<i>E. coli</i> Δrnr pMal_2pe (JG1003)	JG943 pMal_2pe	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> Δrnr pMal_ <i>rnr</i> (JG990)	JG943 pMal_ <i>rnr</i>	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> K12 pBAD_ <i>prpR_mCherry</i> (JG650)	JG109 pBAD_ <i>prpR_mCherry</i>	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> Δrnr pBAD_ <i>prpR_cymA_cctA</i> (JG149)	JG943 pBAD_ <i>prpR_cymA_cctA</i> , pEC86	Diese Arbeit
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 (JG7)	Wildtyp Stamm	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999)
<i>Shewanella oneidensis</i> MtrFAB (JG410)	$\Delta OMC, araC, P_{BAD} mtrFAB$	(Golitsch <i>et al.</i> , 2013)

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 Bakterienkultivierung und Stammkonservierung

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Kulturmedien und Puffer wurden autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Filtration mit Sterilfiltern ($\emptyset = 0,2 \mu\text{m}$) sterilisiert.

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde aerob in Flüssigkultur bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Dies erfolgte in LB-Medium (Sambrook et al., 1989) oder M4-Minimalmedium. Auf Agarplatten wurde *E. coli* in einem Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Bei Bedarf wurden in den LB-Agarplatten Antibiotika als Selektionsmarker in folgenden Konzentrationen verwendet: Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ oder Chloramphenicol 30 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung des LB-Mediums. Durch das Hinzufügen von 2 % Agar erhielt man LB-Agar.

Bestandteil	Einwaage pro Liter
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar-Agar	20 g

Für die anaerobe Kultivierung von *E. coli* wurden M4-Medium (Tabelle 2-3) verwendet. Als Kohlenstoffquelle dienten 50 mM Glycerin und/oder 10 mM Propionat. Für anaerobe Kultivierung wurde 50 mM Nitrat oder 50 mM DMSO als Elektronenakzeptoren verwendet. Der pH wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde ein Kulturvolumen von 50 ml verwendet.

Tabelle 2-3: Zusammensetzung des M4-Minimalmediums für die aerobe und anaerobe Kultivierung von *E. coli* unter definierten Bedingungen.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
K ₂ HPO ₄	0,22 g	1,27 mM
KH ₂ PO ₄	0,09 g	0,73 mM
HEPES	1,41 g	5 mM
NaHCO ₃	0,17 g	0,8 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,19 g	9 mM
NaCl	8,77 g	150 mM
Spurenelemente 100x	10 ml	Siehe Tabelle 2-4
MgSO ₄ (1M)	1 ml	1 mM
CaCl ₂ (0,1 M)	1 ml	1 mM
Caseinhydrolysat	0,1 g	0,01% (w/v)

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der 100x konzentrierten Spurenelementelösung.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
CoCl ₂	64,9 mg	5 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 mg	0,2 µM
Fe(II)Cl ₂ ·4H ₂ O	107,4 mg	5,4 µM
H ₃ BO ₃	350 mg	56,6 µM
MnSO ₄ ·H ₂ O	22 mg	1,3 µM
Na ₂ EDTA	2,5 g	67,2 µM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	94,4 mg	3,9 µM
Na ₂ SeO ₄ ·6H ₂ O	39,5 mg	1,5 µM
NaCl	58,4 mg	10 µM
NiCl ₂ ·6H ₂ O	118,9 mg	5 µM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	28,8 mg	1 µM

Zur Herstellung der anaeroben Bedingungen wurden Glasflaschen mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossen. Durch die abwechselnde Begasung mit Stickstoff und das Anlegen eines Vakuums für mindestens 20 Zyklen wurde schrittweise der Sauerstoff aus den Lösungen und Gasflaschen verdrängt. Anschließend wurden die Medien autoklaviert. Beim Beimpfen mit *E. coli* wurden die Medien mit 14,8 µM Thiamin Hydrochlorid und bei Bedarf mit Induktoren und Antibiotika komplementiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Das Wachstum

der Kultur wurde durch die Messung der Trübung verfolgt. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm.

2.2.2 Kultivierung von *S. oneidensis*

Für die aerobe Kultivierung wurde *S. oneidensis* in LB-Medium bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Für die anaerobe Kultivierung wurde M4-Minimalmedium (Tabelle 2-3) mit 50 mM Lactat als Elektronendonator und 100 mM Fumarat als Elektronenakzeptor verwendet. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Ebenso wie bei *E. coli* konnte die Anzucht von *S. oneidensis* auf LB-Agarplatten je nach Stamm und Plasmid unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bei 30°C erfolgen. Das Wachstum von Flüssigkulturen wurde durch die Messung der OD₆₀₀ verfolgt.

Für die anaerobe Anzucht für Brennstoffzellenexperimente wurden Phosphat gepufferte Medien (PBS) verwendet (Tabelle 2-5). Diese wurden ebenfalls wie in 2.2.1 beschrieben vor dem Autoklavieren anaerobisiert. Bevor die Zellen in ein Brennstoffzellenaufbau überführt werden konnten, wurden überschüssige Elektronendonoren und -akzeptoren durch Waschen mit einem PBS-Waschpuffer (Tabelle 2-6) entfernt. Beim letzten Waschschrift wurden die Zellen in ein entsprechendes Volumen PBS-MEC-Anodenmedium aufgenommen (Tabelle 2-7), um eine Zellsuspension mit definierter OD₆₀₀ zu erhalten.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung des PBS-Lactat-Fumarat-Mediums zur Anzucht von *S. oneidensis* für mikrobielle Brennstoffzellenversuche.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
CaCl ₂ -Lösung (0,1 M)	1 ml	0,1 mM
Caseinhydrolysat	1 g	0,1%
Fumarsäure	11,6 g	100 mM
KCl	0,2 g	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	1,76 mM
MgSO ₄ -Lösung (1M)	1 ml	1 mM
NaCl	8 g	137 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,78 g	10 mM

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,18 g	9 mM
Na-Lactat 50% (w/w)	11,2 g	50 mM
NaOH	8 g	200 mM
100 X Spurenelementelösung	10 ml	Siehe Tabelle 2-4

Tabelle 2-6: Zusammensetzung des PBS-Waschpuffers ohne Elektronendonator und -akzeptor.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
CaCl_2 -Lösung (0,1 M)	1 ml	0,1 mM
Caseinhydrolysat	1 g	0,1%
KCl	0,2 g	2,7 mM
KH_2PO_4	0,24 g	1,76 mM
MgSO_4 -Lösung (1M)	1 ml	1 mM
NaCl	8 g	137 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,78 g	10 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,18 g	9 mM
100 X Spurenelementelösung	10 ml	Siehe Tabelle 2-4

Tabelle 2-7: Zusammensetzung des PBS-MEC-Anodenmediums für die Anodenkammer ohne Elektronenakzeptor.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
CaCl_2 -Lösung (0,1 M)	1 ml	0,1 mM
Caseinhydrolysat	1 g	0,1%
KCl	0,2 g	2,7 mM
KH_2PO_4	0,24 g	1,76 mM
MgSO_4 -Lösung (1M)	1 ml	1 mM
NaCl	8 g	137 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,78 g	10 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,18 g	9 mM
Na-Lactat 50% (w/w)	11,2 g	50 mM
100 X Spurenelementelösung	10 ml	Siehe Tabelle 2-4

2.2.3 Stammkonservierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Stämme wurden als Gefrierkulturen in doppelter Ausführung konserviert. Hierfür wurde jeweils eine aerobe Übernachtskultur mit 10% (v/v) sterilem Glycerin bzw. 5% (v/v) sterilem DMSO versetzt und in ein Gefrier Röhrchen überführt. Dieses wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C eingelagert. Um Bakterien aus diesen Gefrierkulturen zu rekultivieren, wurden einige Zellen aus dem jeweiligen Röhrchen herausgekratzt und auf einer Agarplatte, gegebenenfalls mit Antibiotikum, ausgestrichen. Die Platten wurden dann bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 PCR (Polymerasenkettenreaktion)

Zur *in vitro* Amplifikation von doppelsträngiger genomischer oder plasmidärer DNA wurden Polymerasekettenreaktionen (PCR) verwendet. Zur präparativen Amplifizierung von Genen und DNA-Fragmenten, die in weiteren Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurde eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3'→5' Exonukleaseaktivität (iProof, Bio-Rad, München) verwendet. Durch diese „proof reading“-Aktivität erreicht diese Polymerase eine weitaus geringere Fehlerrate gegenüber der gewöhnlichen *Taq*-Polymerase. Die *Taq*-Polymerase wurde deshalb ausschließlich für analytische PCRs, zur Kontrolle von Klonen oder Fragmenten, eingesetzt (MangoMix, Bionline, Hess. Oldendorf). Die Kontrolle von Klonen mittels PCR, die sogenannte Kolonie-PCR, ist eine besonders praktische Methode, um mehrere Klone auf einmal zu untersuchen und zu katalogisieren (Güssow and Clackson, 1989). Hierbei wurden die Bakterienkolonien einzeln mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Die verbleibenden Zellen wurden anschließend direkt im PCR-Reaktionsansatz mit MangoMix, oder bei größeren Fragmenten (> 3,5 kb) mit dem Phusion Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) resuspendiert. Die Masterplatte wurde bei 30°C oder 37°C inkubiert und diente der Sicherung der getesteten Klone. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (C1000, S1000, MJMini, Bio-Rad, München) durchgeführt. Ein Standard-Reaktionsansatz für eine analytische PCR-Reaktion mit dem MangoMix fasste 15 µl und setzte sich wie in Tabelle 2-8 gezeigt zusammen. Ein typischer Reaktionsansatz für eine präparative

PCR-Reaktion mit der iProof-Polymerase hatte ein Volumen von 50 µl und wird ebenfalls in Tabelle 2-8 dargestellt. Die entsprechenden Thermocyclerprogramme sind Tabelle 2-9 zu entnehmen. Die Oligonukleotide, die dabei als Primer eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2-10 aufgelistet. Diese wurden jeweils auf eine Konzentration von 2 pmol/µl verdünnt. Als Template wurden dabei ganze Zellen oder DNA-Lösungen verwendet, die mittels der in Abschnitt aufgeführten Methoden aufgereinigt wurden.

Tabelle 2-8: Standardansätze für analytische und präparative PCR.

Analytische PCR	Präparative-PCR (iProof)
7,5 µl 2XMangoMix (inkl. Polymerase)	10 µl 5X iProof-Puffer
3,75 µl forward Primer (2 pmol/µl)	12,5 µl forward Primer (2 pmol/µl)
3,75 µl reverse Primer (2 pmol/µl)	12,5µl reverse Primer (2 pmol/µl)
1µl DNA-Lösung/Klon (Template)	1 µl iProof-Polymerase
15 µl Gesamtvolumen	1 µl dNTPs (10 mM)
	1,5 µl DMSO
	11,5 µl H ₂ O
	1µl DNA-Lösung /Klon (Template)
	50 µl Gesamtvolumen

Tabelle 2-9: PCR-Programme für analytische und präparative PCR.

		Kontroll-PCR (MangoMix)		Präparative-PCR (iProof)	
		<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Initiale Denaturierung		95°C	2:30 min	98°C	2:30 min
30x {	Denaturierung	95°C	0:30 min	98°C	0:10 min
	Annealing der Primer	55-60°C	0:30 min	55-60°C	0:30 min
	Elongation	72°C	1 min/kb	72°C	0:30 min/kb
finale Elongation		72°C	10:00 min	72°C	10:00 min
Kühlen		12°C	∞	12°C	∞

Tabelle 2-10: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Nr.	Name	Sequenz
1	pProp_mcherry_test	ATGGTTTCCAAAGGGGAAGAGG
2	prpR_prom_inv_rev	AGCCCATCCTTTGTTATCAAC
3	pBAD_Ncol_inv_for	<u>CCATGGTCTCCAGCTTG</u>
4	cymA_for long	TTGCTTTGTCTTTATCAACGCAAATAACAAGTTGATAACAAAGGATGGGCT ATGAACTGGCGTGCACTGTT
5	cctA_rev long	GTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGAC CATGGTTATTTTTTCAGAACAG
6	pBAD test for (neu)	GATTAGCGGATCCTACCTGAC
7	pBAD test rev (neu)	CTCTCATCCGCCAAAACAGC
8	rnr_test for	TTATTGCTGGTGGAGTGAC
9	rnr_test rev	GCCGTAATCATTTCGCTC
10	arcA_test_rev	TGCTTCAGGCAATGATACC
11	arcA_test_for	CACTGTCAACTTATTACGCG
12	prpR_RT_for	CAAGAACTGGCAAACGAAC
13	prpR_RT_rev	CGGGCATAACAGCAAAATAGT

14	prpB_RT_for	ATTGAAGATCAGGTTGGTGC
15	prpB_RT_rev	AATTCGTCGGTGGTAAACAG
16	prpC_RT_for	GGTATCACTACAGCCACAAC
17	prpC_RT_rev	GGGGAACATCTTTTTGCTCT
18	prpD_RT_for	TGTTCAAAATCTCCTTCCCG
19	prpD_RT_rev	CCACCACTTCTTCAAATCGT
20	prpE_RT_for	ACTTACTGGTCGCTGTTTTC
21	prpE_RT_rev	GGATCATCAATGGTCGTCAG
22	Neg3_RT_for	GGCACCTTTTTCTGCTACTT
23	Neg3_RT_rev	CCCACAAACAATACCGATGA
24	rpoA_for	CACCAAAGAAGGCGTTCAG
25	rpoA_rev	TCTCTTCTTCACTCAGGC
26	rnr_NdeI_for	CTTAGTAC <u>CATATG</u> TCACAAAGATCCTTTCCA
27	rnr_BamHI_rev	CGGCTAT <u>GGATCCT</u> CACTCTGCCACTTTTTTC

2.3.2 Klonierungstechniken

Restriktion von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (Frankfurt a. M.) mit den mitgelieferten und empfohlenen Puffern verwendet. Es wurden 30 µl Gesamtvolumen für einen Restriktionsansatz angesetzt. Bei einem Doppelverdau wurden bis zu 80 µl Gesamtvolumen angesetzt. Ein Kontrollverdau erfolgte in einem 10 µl Ansatz. Die Inkubationszeit des Restriktionsansatzes betrug in der Regel 30-60 min. Die Inaktivierung der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Hitzeinaktivierung nach Herstellerangaben, durch Umpuffern (Abschnitt 2.3.4) oder durch Auftragen auf ein Agarosegel (Abschnitt 2.3.3).

Fusion von DNA-Fragmenten mittels PCR

Das Zusammensetzen von zwei oder mehreren mittels PCR erzeugten und aufgereinigten DNA-Fragmenten erfolgte über weitere PCR-Reaktionen. Hierbei wurden jeweils zwei lineare PCR-Produkte, die 20-30 bp große homologe Region zum benachbarten Fragment besaßen, mit Hilfe von flankierenden Primern zu einem einzigen DNA-Fragment fusioniert. Die Zusammensetzung des dabei verwendeten präparativen PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2-11 dargestellt. Die Reaktion erfolgte nach dem in Tabelle 2-9 gezeigten Thermocycler-Standardprotokoll für präparative PCRs.

Tabelle 2-11: Standard-Reaktionsansatz für Fusions-PCR mit iProof.

Fusions-PCR (iProof)
10 µl 5X iProof-Puffer
12,5 µl forward Primer (2 pmol/µl)
12,5 µl reverse Primer (2 pmol/µl)
1 µl iProof-Polymerase
1 µl dNTPs (10 mM)
1,5 µl DMSO
7,5 µl H ₂ O
2,5 µl DNA-Fragment 1
2,5 µl DNA-Fragment 2
50 µl Gesamtvolumen

Klassische Ligation

Um ein linearisiertes DNA-Molekül zu zirkularisieren (Re-Ligation) oder mit einer anderen linearen DNA zu verbinden (Ligation) wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen. Für die Ligation von Vektor-DNA und Insert-DNA wurde ein molares Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gewählt. Der 20 µl Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 2 µl T4-DNA-Ligase Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase, doppelt destilliertem Wasser und dem entsprechenden Volumen an Vektor-DNA und Insert-DNA-Lösung. Die Gesamtmenge an eingesetzter DNA betrug maximal 100 ng. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Isothermale *in vitro* Ligation

Die isothermale *in vitro* Ligation nach Gibson (Gibson *et al.*, 2009) ermöglicht die Zusammensetzung mehrerer DNA-Fragmente mit einem zueinander überlappenden Bereich von 30-50 bp in einem einzigen Reaktionsansatz, beispielsweise zur Klonierung von Genen in einen Vektor. Die benötigten endständig homologen Bereiche zwischen Insert und Vektor, wurden durch Primer eingefügt. Im Reaktionspuffer befinden sich drei Enzyme: Eine 5'-3' Exonuklease generiert kurze einzelsträngige Enden der zu ligierenden DNA-Fragmente. Die komplementären Enden können sich aneinander lagern und Lücken werden von einer DNA-Polymerase aufgefüllt. Die DNA-Ligase schließt anschließend den Strangbruch. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich unabhängig von Restriktionsschnittstellen DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren. Der Reaktionspuffermastermix (Tabelle 2-13) 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 h bei 50°C inkubiert. Anschließend konnte der Ligationsansatz direkt zur Transformation in kompetente Zellen verwendet werden.

Tabelle 2-12: Zusammensetzung der 5x Stammlösung für die isothermale *in vitro* Ligation.

5x Stammlösung			
Bestandteil		Einwaage	Endkonzentration
Tris/HCl pH=7,5	(1M)	125 µl	100 mM
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	(1M)	12,5 µl	10 mM
dNTPs	(10 mM)	25 µl	200 µM
DTT	(1M)	12,5 µl	10 mM
NAD ⁺	(100mM)	12,5 µl	1 mM
Polyethylenglycol-8000 Da		62,5 mg	5 % (w/v)
ddH ₂ O		62,5 µl	-
		250 µl Gesamtvolumen	

Tabelle 2-13: Zusammensetzung des Reaktionspuffermastermixes für die isothermale *in vitro* Ligation.

<i>In vitro</i> Reaktionspuffer		
Bestandteil		Menge
5X-Stammlösung		80 µl
iProof-Polymerase	(2 U/µl)	5 µl
Taq DNA-Ligase	(40 U/µl)	40 µl
T5 Exonuclease	(0,1 U/µl)	16 µl
ddH ₂ O		239 µl
		380 µl Gesamtvolumen

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Molekülen unterschiedlicher Größe erfolgt mittels der Agarosegelelektrophorese. Diese Methode nutzt die negative Ladung der DNA-Moleküle, um diese durch ein Agarosegel im elektrischen Feld von der Anode zur positiv geladenen Kathode wandern zu lassen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle hängt sowohl von der Größe und Form des DNA-Moleküls ab, als auch von der Porengröße des Agarosegels. Die Konzentration der Agarose betrug 0,7% bzw. 1%. Für die Herstellung der Agarosegele wurden 420 mg bzw. 600 mg Agarose in 60 ml 1x TAE-Puffer (Tabelle 2-14) durch Aufkochen gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurde das noch flüssige Gel mit 1 µl/10 ml Midori Green (Biozym, hessisch Oldendorf) (1 zu 5 mit 1x TAE verdünnt) versetzt und in einen Gelschlitten mit eingesetztem Taschenkamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gesetzt und beladen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt. Bei jedem Lauf wurde ein Größenstandard mit aufgetragen. Die hier verwendeten DNA-Größenstandards waren GeneRuler 1kb DNA ladder und 50 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden visualisiert.

Tabelle 2-14: Zusammensetzung des 1x TEA-Puffers.

Bestandteil	Einwaage pro Liter
Tris	4,85 g
EDTA	0,37 g
auf pH 8 mit Acetat einstellen	

2.3.4 Reinigung und Isolierung von DNA

Isolierung von genomischer DNA

Die genomische DNA von *E. coli* K12 wurde mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert. Die Isolierung basiert auf den Schritten der Zellyse und RNA-Degradation, Protein-Fällung, gDNA-Fällung und Rehydrierung.

Isolierung und Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterienzellen

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim). Durch die alkalische Lyse wurden die Bakterienzellen einer 5 ml Übernackkultur zunächst aufgeschlossen und die DNA freigesetzt. Anschließend wurde die chromosomale DNA durch schnelle Neutralisierung des pH-Wertes gefällt und abzentrifugiert, während die Plasmid-DNA stabil im Überstand verblieb. Diese Plasmid-DNA konnte an die Säulenmatrix der Silicasäulchen binden, während Verunreinigungen durch Ethanol ausgewaschen wurden. Mit destilliertem Wasser konnte die Plasmid-DNA anschließend von der Säule eluiert werden. Die Plasmid Miniprep wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Plasmide bei -20 °C gelagert.

Isolierung und Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel oder PCR-Ansatz

DNA-Fragmente, die mittels PCR amplifiziert worden waren oder durch einen Restriktionsansatz entstanden sind, wurden zunächst auf ein Agarosegel geladen, um die Fragmentlänge der Amplifikate zu detektieren. Die DNA-Stränge wurden mit UV-Licht visualisiert und die Banden von Interesse mit einem Skalpell ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden anschließend mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega,

Mannheim) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Wie bei dem Miniprep-Kit (2.3.4) wurde auch hier die DNA an eine Silica-Säule gebunden und Verunreinigungen mit Ethanol ausgewaschen. Bei Bedarf eines Umpufferns für die Weiterverwendung konnten Restriktionsansätze sowie PCR-Ansätze direkt mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit aufgereinigt werden.

2.3.5 Reinigung und Isolierung von RNA

Isolierung von RNA

Die Isolierung der gesamten RNA aus *E. coli* erfolgte mit dem RNeasy Protect Bacteria Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland). Hierfür wurde *E. coli* aerob und anaerob in M4-Minimalmedium mit 50 mM Glycerin mit und ohne 50 mM Nitrat, sowie mit und ohne Induktion durch 10 mM Propionat kultiviert. Durch eine einheitliche Start-OD₆₀₀ von 0,05 konnte sichergestellt werden, dass sich die Kulturen innerhalb eines Hexaplikats und Wachstumsbedingung glichen. Sobald sich die Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurde durch das Vereinen von drei Kulturen Duplikate erstellt. Daraus wurde wiederum ein Kulturvolumen, das einer OD₆₀₀ von 1 entspricht, entnommen und mit dem doppeltem Volumen Bacteria-Protect Puffer versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die RNA zu stabilisieren. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 5000xg abzentrifugiert und das Zellpellet mit 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) und Lysozym (1 mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die RNA wurde weiter nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration und die Reinheit der Gesamt-RNA wurden mittels Nanodrop (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) verfolgt. Über das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280 nm bzw. 260/230 nm konnte die Reinheit der Probe bestimmt werden. Für reine RNA liegt der A260/A280 Quotient bei > 2,0, der Quotient A260/A230 ist ebenfalls >2,0 (vgl. 2.3.6). Anschließend wurde die gesamte RNA mit dem Ambion DNA-free Kit (lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland) behandelt, um eventuelle genomische DNA Rückstände, die zu falsch positiven Ergebnissen in den weiterführenden Experimenten führen könnten, zu entfernen. Der 50 µl Reaktionsansatz (Tabelle 2-15) wurde über Nacht (16-20 h) bei

37°C inkubiert. Am Nächsten Tag wurde die Reaktion nach Herstellerangaben mit 5 µl Inactivation Reagent versetzt und abgestoppt.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Verdau mit DNaseI.

DNaseI-Verdau:
40 µl RNA
5 µl 10X DNase-Puffer
2 µl DNaseI
3 µl Nuklease freies Wasser
50 µl Gesamtvolumen

Genomische DNA Kontamination wurde mittels PCR nachgewiesen. Dafür wurde 1 µl RNA-Lösung zu einem 15 µl MangoMix-Ansatz mit den Primern Neg3 RT for und Neg3 RT rev gegeben (Tabelle 2-10). Als weitere Kontrollen dienten 1 µl Nuklease freies Wasser und eine *E. coli* K12 Kolonie. In Tabelle 2-16 ist das PCR-Programm für die Kontaminationskontrolle dargestellt. Gegebenenfalls wurde der DNaseI-Verdau wiederholt, bis keine genomische DNA mehr in den RNA-Proben nachgewiesen werden konnte. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2-16: PCR-Programm für die DNA-Kontaminationskontrolle.

	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	2:30 min	
Denaturierung	95°C	0:30 min	} 28x
Annealing der Primer	58°C	0:30 min	
Elongation	72°C	0:30 min	
finale Elongation	72°C	10:00 min	
Kühlen	12°C	∞	

Anreicherung von mRNA

RNA-Proben, die für die Transkriptomanalyse verwendet wurden, wurden einer mRNA Anreicherung unterzogen. Da dabei mögliche Kationen in der Probenlösung störend wirken können, mussten die RNA-Proben nach dem DnaseI Verdau zunächst noch umgepuffert werden. Dies erfolgte mit dem Clean-Up Protokoll des Qiagen RNeasy Mini Kits. Die RNA-Lösung wurde dabei mit Nuklease freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit RLT-Puffer und 100% EtOH versetzt, um besser an die Silicasäulen binden zu können. Nach zwei Waschschrritten mit 500 µl RPE-Puffer wurde die RNA in 35 µl Nuklease freiem Wasser eluiert. Reinheit und Konzentration wurden wie in Abschnitt 0 überprüft. Die mRNA Anreicherung erfolgte dann mit dem MICROBExpress Kit von Ambion (lifetechnologies, Darmstadt, Germany) nach Herstellerangaben. Mit diesem Kit konnte rRNA aus der Gesamt-RNA mittels magnetischen Beads und daran gekoppelten Oligonukleotiden abgefangen werden, während die mRNA dadurch angereichert wurde. Die Konzentration und Reinheit der angereicherten mRNA wurde ebenfalls mittels Nanodrop bestimmt.

cDNA Synthese und RT-PCR (RT)

Unter Verwendung des SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) wurde die Gesamt-RNA mit einem vorgefertigten Mix an Random-Hexamer Primern und Oligo-dT Primern gemäß den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert (Tabelle 2-17 und Tabelle 2-18).

Tabelle 2-17: Zusammensetzung des cDNA Syntheseansatzes.

cDNA-Synthese
500 ng Gesamt-RNA
3 µl RT-Puffer
X µl Nuklease freies Wasser
1 µl Reverse Transkriptase
20 µl Gesamtvolumen

Tabelle 2-18: Thermocycler Programm für die cDNA-Synthese.

Thermocycler Programm
25°C für 10 min (Primer Anlagerung)
42°C für 15 min (Reverse Transkription)
85°C für 5 min (Inaktivierung)
4°C für ∞ (Kühlen)

Anschließend wurden mit der erhaltenen cDNA PCR mit spezifischen Primerpaaren für jedes Gen des *prp*-Operons, für das Referenzgen *rpoA* sowie ein Primerpaar für eine intergene Region als negativ Kontrolle, zwischen den Genen *pgaA* und *yedT*, durchgeführt (siehe RT Primer in der Tabelle 2-10). Für jedes Primerpaar wurde zusätzlich eine positive Primer Kontrolle mit isolierter gDNA aus *E. coli* K12 (Abschnitt 2.3.4) und eine negative Kontaminations-Kontrolle mit 1 µl Nuklease freiem Wasser als Template angesetzt. Als Template wurden jeweils 50 ng DNA bzw. cDNA eingesetzt und die Primerkonzentration auf 2 pmol/µl eingestellt. Für die PCR wurde das gleiche Protokoll wie in Tabelle 2-16 verwendet. Die Länge der Amplifikate betrug 335 bp bis 549 bp. Mit Hilfe der ImageLab Software (BioRad, München, Deutschland) wurde die Intensität der PCR-Banden auf dem Agarosegel quantifiziert und mit dem Signal des Referenzgens *rpoA* normiert. Mit diesem densitometrischen Verfahren konnte eine semiquantitative Aussage über die Expression bestimmter Gene getroffen werden.

2.3.6 DNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Nanodrop-Spektrometers bestimmt. Bei der Messung wurde jedes Mal zunächst 1 µl ddH₂O bzw. Elutionspuffer als Referenz gewählt, anschließend wurde je 1 µl Probe eingesetzt. Dabei wurde die Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. RNA, dsDNA oder ssDNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während Verunreinigungen, wie beispielsweise Phenol, bei 280 nm absorbieren. Andere Verunreinigungen wie EDTA absorbieren bei 230 nm am stärksten. Somit kann über das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280 nm bzw. 260/230 nm die Reinheit der Probe bestimmt werden. Für reine DNA liegt der A₂₆₀/A₂₈₀ Quotient bei ca. 1,8, der Quotient A₂₆₀/A₂₃₀ bei ca. 1,8-2,2.

2.3.7 Sequenzierung

Um die Korrektheit der Nukleotidsequenzen der erzeugten Plasmide und veränderten DNA-Abschnitte zu prüfen, wurden Plasmide oder aufgereinigte Amplifikate der DNA-Abschnitte mit den spezifischen Primern zur Firma GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der geneious Software (Biomatters Limited, Auckland, Neuseeland) mit der Originalsequenz verglichen.

2.3.8 Transformationstechniken

Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur des betreffenden Bakterienstamms über Nacht in salzarmen SOB-Medium angesetzt (Tabelle 2-19).

Tabelle 2-19: Zusammensetzung des SOB-Mediums.

Bestandteil	Einwaage pro Liter
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g

Am nächsten Tag wurden 50 ml SOB-Medium mit 1% der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 inkubiert. Danach wurde das Wachstum durch eine 15- bis 30-minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 6000x g und 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in sterilem, kaltem, doppeltdestilliertem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese Waschschrte wurden mehrmals wiederholt, um möglichst viele Salze des Mediums zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in ca. 1,5 ml sterilem Wasser aufgenommen und sofort zur

Transformation verwendet. Um kompetente Zellen dauerhaft lagern zu können, wurden die Zellen in 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation mittels 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 DNA aufgenommen werden kann. Bevor Ligationsansätze mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht werden können, müssen diese zunächst mind. 20 min über eine Membran dialysiert werden, um überschüssige Salze des Puffermilieus zu entfernen. Für die Elektrotransformation wurden dann $1\ \mu\text{l}$ gereinigte Plasmid-DNA oder $10\ \mu\text{l}$ dialysierter Ligationsansatz zusammen mit $100\ \mu\text{l}$ kompetenten Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (*E. coli*-Pulser, Bio-Rad, München) mit $1,8\ \text{kV}$ für $5\ \text{ms}$ gepulst. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 2-20) aufgenommen und für $1\ \text{h}$ bei 30°C oder 37°C inkubiert, um die Ausbildung eventueller Antibiotikaresistenzen zu gewährleisten. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle 2-20: Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Bestandteil	Menge pro 50 ml
SOB	47,2 ml (Tabelle 2-19)
MgCl_2 (1 M)	1 ml
Glucose (40%)	1,8 ml

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Glycerinbestimmung

Für die Bestimmung der Glycerinkonzentration in den Proben wurde das Free Glycerol Reagent Kit (Sigma Aldrich) verwendet. Die im Reagenz enthaltene Glycerin-Kinase phosphoryliert Glycerin unter ATP-Verbrauch zu Glycerin-1-Phosphat und ADP. Glycerin-1-Phosphat wird dann von der Glycerin-Phosphat-Oxidase zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert. Das entstehende H_2O_2 wird durch eine Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und Natrium-N-Ethyl-N-(3-Sulfopropyl)-m-Anisidin zu einem Quinonimin-Farbstoff gekoppelt, 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. Der Test erfolgte in einer Mikrotiterplatte. Dafür wurden 10 μl Probe mit 80 μl Reagenz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 540 nm mittels des Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich) gemessen. Mit Hilfe von Glycerin-Standards zwischen 0 und 2 mM wurde eine Kalibriergerade für die Ermittlung des Glyceringehalts erstellt. Gegebenenfalls wurden die Proben mit Wasser verdünnt. Die Proben und die Standards wurden im Triplikate gemessen.

2.4.2 Fluoreszenzmessungen

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit des $P_{prpBCDE}$ Promotors wurde dieser vor ein Reportergen kloniert. In dieser Arbeit diente das fluoreszierende Protein mCherry als Reporter, da es sich durch seine schnelle Maturationszeit (15 min) und seine Photostabilität auszeichnet (Shaner *et al.*, 2004). Dafür wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, bestehend aus dem pBAD Plasmid-Rückgrat, dem Regulatorgen *prpR* und dem nativen $P_{prpBCDE}$ Promoter. Der Fluoreszenzmarker mCherry wurde hinter dem Promoter kloniert. Das fertige Plasmid pBAD_*prpR*_mCherry wurde in den *E. coli* K12 Stamm transformiert. Die Zellen wurden in M4-Minimalmedium mit 50 mM Glycerin und 50 mM Nitrat, komplementiert mit 14,8 μM Thiamin und 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, angezogen. Nach ca. 20 h Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen geerntet und mit M4-Minimalmedium ohne Elektronenakzeptoren und –donoren (Tabelle 2-3)

gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in die anaerobe Kammer (Coy Lab Products, Michigan, USA) geschleust und in ein entsprechendes Volumen frisches M4-Minimalmedium mit 50 mM Glycerin und 50 mM Nitrat aufgenommen, so dass die Zellen eine OD_{600} von 0,1 erreichten. 180 μ l der Zellsuspension wurde in die Vertiefungen der 96-Well Mikrotiterplatte (μ Clear (flat-bottom, chimney-well, white), Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) vorgelegt. Im Triplikat wurden 20 μ l der entsprechenden Propionat-Stammlösung dazu gegeben, sodass die Endkonzentration in den Vertiefungen 0, 7,9, 25 und 50 mM betrug. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels des Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Infinite Pro M200, Tecan, Österreich) nach 0, 15, 30 und 45 min Inkubation. Mit einer Wellenlänge von $\lambda=580$ nm wurde der Fluorophor angeregt und die Emission bei $\lambda=610$ nm gemessen. Nach jeder Fluoreszenzmessung wurde auch die Absorption bei 600 nm gemessen, um wachstumsbedingte Unterschiede im Anschluss herausrechnen zu können.

2.4.3 Fe(III)-Reduktionsassay

Zellsuspensionsassay

Um das Reduktionsverhalten der Bakterien bei unterschiedlichen Induktionsstärken zu vergleichen wurde ein Fe(III)-Reduktionsassay mit Fe(III)-NTA durchgeführt. Der Bakterienstamm *E. coli* Δ *rnr* wurde zunächst mit den Plasmiden pBAD_*prpR_cymA_cctA* und pEC86 transformiert (0). Das Plasmid pEC86 trägt die Cytochrom-c-Maturationsgene *ccmABCDEFGH* aus *E. coli* und sorgt so über eine erhöhte Gendosis für eine verbesserte Produktion von c-Typ-Cytochromen (Arslan *et al.*, 1998). Die Cytochrome CymA und CctA aus *S. oneidensis* ermöglichen dem Bakterium den Transport von Elektronen aus der Substratoxidation über eine verlängerte Atmungskette ins Periplasma. Membrangängige Fe(III)-Komplexe, wie Fe(III)-NTA, können die äußere Zellmembran passieren und durch reduzierte periplasmatische Cytochrome wie CctA reduziert werden und anschließend die Zelle wieder verlassen. Die Expression dieser Cytochrome unterliegt dem induzierbaren Promotor $P_{prpBCDE}$, weswegen bei diesem Reduktionsassay unterschiedliche Propionatkonzentrationen für die Induktion verwendet wurden. Aerobe Vorkulturen in LB-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin und 30 μ g/ml Chloramphenicol wurden mit einem PBS-Waschpuffer (Tabelle 2-6) gewaschen, um die Zellen

von überschüssigen und undefinierten Kohlenstoffquellen sowie extrazellulären Redoxmediatoren zu befreien. Die anaerobe Vorkultur erfolgte in PBS-Medium mit 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor (Tabelle 2-22). Entsprechend wurden 50 µg/ml Kanamycin, 30 µg/ml Chloramphenicol und 14,8 µM Thiamin dem Medium zugegeben. Die Zellen wurden 6 h vor dem eigentlichen Zellsuspensionsassay mit 0 mM, 5 mM und 10 mM Propionat versetzt und jeweils die Expression der Maturationsgene auf dem Plasmid pEC86 mit 0,43 µM AHT induziert. Um fortan absolute anaerobe Bedingungen zu gewährleisten wurden die Zellen in einer anaeroben Kammer (Coy Lab Products, Michigan, USA) mit dem PBS-Waschpuffer (Tabelle 2-6) gewaschen, um vorhandene Elektronenakzeptoren zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in die entsprechenden 2-fach konzentrierten PBS-Medien (Tabelle 2-23) aufgenommen, sodass sich eine OD_{600} von 2 eingestellt hat. Mit demselben Volumen einer PBS-Lösung mit 2 mM Fe(III)-NTA wurden die Zellsuspensionen auf einer einheitlichen optischen Dichte von $OD_{600} = 1$ und der Endkonzentration von 1 mM Fe(III)-NTA verdünnt und mit 50 µg/ml Kanamycin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 14,8 µM Thiamin und 0,43 µM AHT versetzt. Je 200 µl dieser Zellsuspensionen wurden mit einer Multipipette auf eine sterile 96-well-Mikrotiterplatte (VWR, Darmstadt) pipettiert. Für jeden Messpunkt wurde ein Triplikat angesetzt und die Eisenreduktion nach 0, 30, 60, 120 und 180 min mit 100 µl 1 M HCl abgestoppt. Die Fe(II)-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels des Ferrozinassays. Die Herstellung der Fe(III)-NTA-Stammlösung (Tabelle 2-21) erfolgte durch die Einwaage von 16,4 g $NaHCO_3$ in 600 ml sterilem H_2O . Nach dem Lösen wurden 25,6 g Nitrilotrinatriummessigsäure (NTA) langsam darin gelöst, wobei darauf geachtet werden musste den pH bei ca. 7 zu halten, da sich NTA nur über einem pH von ca. 5 löst. Nach dem Auffüllen mit sterilem H_2O auf 1000 ml folgte die vorsichtige Zugabe von 27 g Fe(III)-Chlorid x 6 H_2O und die Einstellung des pH-Werts mit NaOH auf 7,4. Die Lösung wurde über einen Sterilfilter sterilisiert und danach steril anaerobisiert.

Tabelle 2-21: Zusammensetzung der 100 mM Fe(III)-NTA-Stammlösung.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
NaHCO ₃	16,4 g	200 mM
Nitrilotrinatriumessigsäure (NTA)	25,6 g	100 mM
Fe(III)-chlorid x 6 H ₂ O	27 g	100 mM

NaOH bis pH 7,4

Tabelle 2-22: Zusammensetzung des PBS-Medium für die anaerobe Kultivierung von *E. coli*.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
CaCl ₂ -Lösung (0,1 M)	1 ml	0,1 mM
Caseinhydrolysat	1 g	0,1%
KCl	0,2 g	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	1,76 mM
MgSO ₄ -Lösung (1M)	1 ml	1 mM
NaCl	8 g	137 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,78 g	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,18 g	9 mM
100 X Spurenelementelösung	10 ml	siehe Tabelle 2-4
Glycerin	4,6 g	50 mM
KNO ₃	5,05 g	50 mM

Tabelle 2-23: Zusammensetzung des 2xPBS-Medium zur Verdünnung mit 2mM Fe(III)-NTA-Lösung.

Bestandteil	Einwaage pro Liter	Endkonzentration
CaCl ₂ -Lösung (0,1 M)	1 ml	0,1 mM
Caseinhydrolysat	1 g	0,1%
KCl	0,2 g	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	1,76 mM
MgSO ₄ -Lösung (1M)	1 ml	1 mM
NaCl	8 g	137 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,78 g	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,18 g	9 mM

100 X Spurenelementelösung	10 ml	siehe Tabelle 2-4
Glycerin	9,6 g	100 mM
Propionat*	0,96 g	10 mM
	1,92 g	20 mM

*entweder 0 mM, 10 mM oder 20 mM Propionat

Ferrozinassay

Der Ferrozinassay (Stookey, 1970) ist ein Fe(III)-Reduktionsassay mit welchen sich die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) in anaeroben Kulturen nachvollziehen lässt. Dabei reagieren die gebildeten Fe(II)-Ionen mit je 3 Molekülen Ferrozin (3-(2-Pyridyl) 5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazin-5',5''-disulfonsäure) und bilden bei einem pH-Wert zwischen 4 und 9 einen violetten bis blauen, wasserlöslichen Komplex, der bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm photometrisch nachgewiesen werden kann. Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurden aus einer 1 mM Ammonium-Fe(II)-Sulfat-Stammlösung Standards zwischen 0 und 1 mM erstellt, mit deren Hilfe die in den Proben enthaltene Menge an Fe(II)-Konzentration ermittelt werden konnte.

Für die Bestimmung der Fe(II)-Konzentration aus dem Suspensionsassay wurde mit der Multipipette je 20 μ l Probe in eine 96-well NUNC-Mikrotiterplatte Typ F (Apogent) gegeben in der bereits 180 μ l Ferrozin-Reaktionslösung (1 mg/ml Ferrozin in 50% [w/v] Ammoniumacetat) vorgelegt wurden. Das in der Lösung enthaltene Ammoniumacetat diente der Erhöhung des pH-Wertes in einen Bereich, in dem sich der Ferrozin-Komplex ausbilden kann und somit detektierbar ist. Für die Kalibrierkurve wurden ebenfalls 20 μ l je Konzentration im Triplikat mit 180 μ l Ferrozin-Reaktionslösung versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm mit dem Plattenlesegerät iMark (Bio-Rad, München) gemessen. Für die Auswertung musste die Verdünnung durch das Abstoppen mit 1 M HCl berücksichtigt werden.

2.4.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Konzentration der organischen Säuren wurde mittels HPLC bestimmt. Bei dieser analytischen Methode liegt ein chromatographisches Trennverfahren zu Grunde. Zu untersuchende Substanzen werden zusammen mit einem Laufmittel durch eine Säule gepumpt, welche eine selektive stationäre Phase enthält. Mit dieser stationären Phase interagieren verschiedene Moleküle unterschiedlich stark und werden anhand ionischer und polarer Wechselwirkungen sowie durch ihre Größe unterschiedlich lange in der Trennsäule zurückgehalten. Die Zeit nach der ein bestimmtes Molekül die Trennsäule verlässt und detektiert werden kann, bezeichnet man als Retentionszeit. In dieser Arbeit wurde ein DAD (Diode-Array-Detector) verwendet, der die Detektion organischer Säuren erlaubt. Als Säule diente eine Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, München), welche mit der Hitachi LaCrom Elite HPLC Anlage betrieben wurde. Die Trennung erfolgte isokratisch mit 5 mM H₂SO₄ als Laufmittel bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und 60°C. Die Probenvorbereitung erfolgte über eine Filtrierung mit Membranfiltern ($\varnothing=0,2 \mu\text{m}$), wovon anschließend 100 μl Probe mit 10 μl 0,5 M H₂SO₄ angesäuert wurden. Auf die Säule wurden 50 μl als Probenvolumen 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 von Pyruvat, Succinat, Acetat und Propionat verwendet.

2.5 Mikrobielle-Elektrochemische-Zellen (MEC)

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche MEC-Aufbauten verwendet. Zum einem ein Dreikammeraufbau, bei dem die Referenz-, Arbeits- und Gegenelektrode durch semipermeable Membranen voneinander getrennt sind. Zum anderen ein Einkammeraufbau auf einen Mikrofluidik-Chip, worin die Elektroden als dünne Metallschichten auf eine Glasfläche aufgebracht sind.

2.5.1 Dreikammer-MEC

Die Dreikammeraufbauten bestehen aus einer Anodenkammer, einer Kathodenkammer und einem Referenzelektrodenkompartiment nach Kloke *et al.* (2010). Das Reaktionsvolumen der Anoden- und Kathodenkammer beträgt jeweils 25 ml, die zur Verfügung stehende Elektrodenfläche beträgt jeweils 2,25 cm². Nach dem Zusammenbau und der Separation der einzelnen Kompartimente durch eine semipermeablen Fumion F950 Membran (Quintech, Göppingen) wurden zum Benetzen der Membran 5 ml dH₂O vor dem Autoklavieren zugegeben. Parallel wurden die Elektroden gesondert behandelt. Als Kathode diente ein 1 mm dicker Graphit-Weichfilz (SIGRATHERM, SGLGroup, Wiesbaden), der zunächst mit Isopropanol benetzt und anschließend gründlich mit dH₂O gespült und autoklaviert wurde (siehe Abbildung 8). Als Anode wurde ein Trägerglas, das mit Platin bzw. Gold beschichtet wurde und auf 1,5 cm x 4-5 cm zugeschnitten wurde, verwendet. Für die Anoden wurde zusätzlich die Silikondichtungen entsprechend ausgespart und angepasst, sodass ein Ende des beschichteten Trägerglases ebenfalls mit den Klemmen des Potentiostaten angeschlossen werden konnten. Diese wurde ebenfalls getrennt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Aufbauten auf Dichtigkeit geprüft und unter sterilen Bedingungen das Wasser mittels einer Spritze entfernt. Das Kathodenmaterial wurde mit einem leitfähigen Streckmetallgitter aus platinierter Titan zwischen zwei Silikondichtungen am Boden des Aufbaus so fixiert, dass die Kabel des Potentiostaten an den herausstehenden Enden der Gitter befestigt werden konnten. Ebenfalls wurden unter sterilen Bedingungen die Anoden angebracht. Anschließend wurde die Anodenkammer mit 22,5 ml PBS-MEC-Anodenmedium (Tabelle 2-7), die Kathodenkammer mit 25 ml PBS-Waschpuffer und das Referenzelektrodenkompartiment mit ca. 4 ml PBS-Waschpuffer befüllt (Tabelle 2-6). Eine Kalomel-Standard-Elektrode (Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) diente als Referenzelektrode. Alle Elektroden wurden mit einem Potentiostaten (WaveNow Portable USB Potentiostat, Pine Research Instrumentation, USA) verbunden, der ein konstantes Potential vorgeben und den geflossenen Strom messen kann. Zur Erzeugung der anaeroben Bedingungen in der Anodenkammer wurde diese konstant mit Stickstoff steril begast. Die Kathodenkammer wurde in gleicher Weise mit Druckluft begast. Während der Anaerobisierung wurden *S. oneidensis* Zellen, die über Nacht in PBS-Lactat-Fumarat-Medium (Tabelle 2-5) angezogen wurden, zweimal mit PBS-Waschpuffer (6000xg für

5 min bei 4°C) gewaschen, um überschüssige Elektronendonoren und -akzeptoren zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in PBS-MEC-Anodenmedium (Tabelle 2-7) resuspendiert und die OD₆₀₀ auf 4 eingestellt. Davon dienten 2,5 ml als Inokulum für die Anodenkammer. Erst nach der Beimpfung wurde der Potentiostat mit dem zuvor programmierten Protokoll gestartet. In der dazugehörigen Software Aftermath (Pine Instrument Company, USA) wurde das Protokoll erstellt, indem ein konstantes Potential von -44 mV gegen die Standard-Kalomel-Elektrode (SCE) eingestellt wurde. Dies entspricht einem konstanten Potential von +200 mV gegen eine Standard-Wasserstoff-Elektrode (SHE).

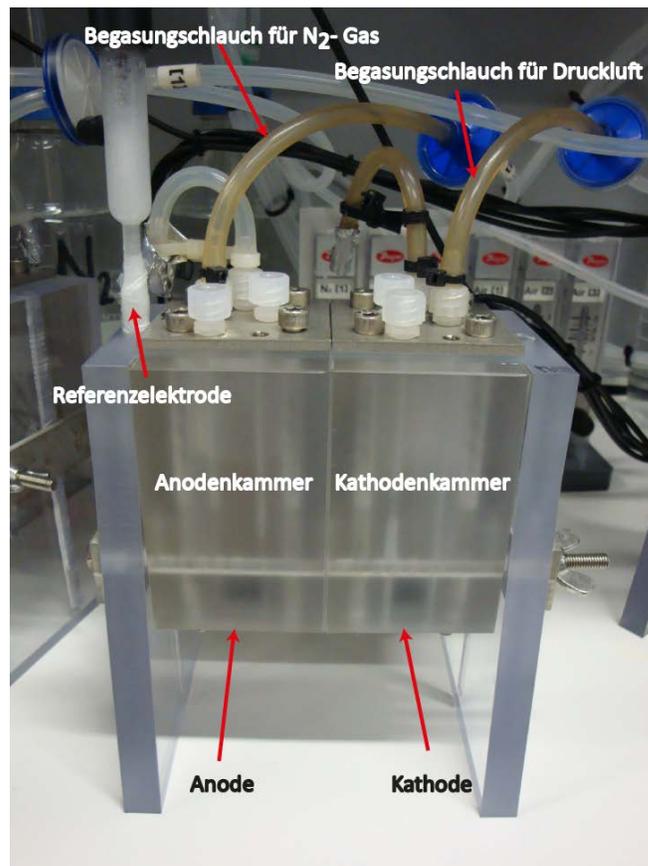


Abbildung 8 Aufbau einer Dreikammer-MEC. Die Anoden- und Kathodenkammer fassen jeweils 25 ml und ermöglichen einen Ladungsaustausch mittels einer protonenpermeablen Membran. Die Referenzelektrode befindet sich ebenfalls in einem Kompartiment, das mit dem PBS-Waschpuffer gefüllt und durch eine protonenpermeable Membran vom Anodenkompartiment getrennt ist.

2.5.2 Mikrofluidik-Chip

Die Einkammer-MEC wurde in Kooperation mit dem IPHT in Jena auf einem Mikrofluidik-Chip realisiert. Die Mikrofluidik-Plattform besteht aus zwei voneinander entkoppelten Platinschichten, die als Elektrodenflächen fungieren und über externe Kontaktflächen mittels einer Kontaktleiste mit einem Potentiostaten verbunden werden können. Die hexagonale Reaktionskammer umfasst ein Volumen von ca. 150 μl , inklusive der Zu- und Abflussmikrokanäle. Im Rahmen dieser Arbeit standen zwei Chip-Designs mit unterschiedlichen Elektrodenflächen zur Verfügung (Abbildung 9). Die erste Chip-Generation besteht aus zwei gleichgroßen Platinschichten mit je 36 mm^2 Fläche. In der zweiten Generation wurde die Gesamtfläche, die als Elektrodenfläche zur Verfügung stand, vergrößert, indem die Anodenfläche auf 105,75 mm^2 vergrößert wurde und die Kathodenfläche geringfügig auf 20,45 mm^2 verringert wurde. Die Abmessungen der Chips sind dabei gleichgeblieben.

Das Beladen der Chips erfolgte mittels einer Spritze, die mit einer Kapillare und einem Silikondichtungsschlauch an die Kapillaren des Fluidikanschlussblocks angeschlossen wurde. Zunächst wurden die Chips mit einer 70%igen Ethanol-Lösung gespült, um eventuelle Kontaminationen zu entfernen. Durch die Oberflächenspannung der Ethanol-Lösung wurde auch eine gleichmäßige Benetzung des Mikrofluidik-Chips erreicht und alle Luftblasen aus dem Mikrokanalsystem wurden entfernt. Um das Ethanol wieder zu entfernen wurden die Chips vorsichtig mit einigen Millilitern PBS-Waschpuffer (Tabelle 2-6) durchgespült, wobei darauf geachtet werden musste, dass beim Befüllen keine weiteren Luftblasen entstehen oder eingetragen werden. Ebenso wurde beim Befüllen mit PBS-MEC-Anodenmedium (Tabelle 2-7) vorgegangen. *S. oneidensis* MR-1 und *S. oneidensis* MtrFAB Kulturen wurden in anaeroben PBS-Lactat-Fumarat-Medium (Tabelle 2-5) für 20 h bei 30°C inkubiert. *S. oneidensis* MtrFAB wurde bei Bedarf 4 h vor der Zellernte mit 1 mM Arabinose induziert. Danach wurden die Zellen wie bereits in Kapitel 2.5.1 beschrieben geerntet, gewaschen und abschließend in PBS-MEC-Anodenmedium aufgenommen. Eine OD_{600} von 1 wurde eingestellt. Mit Hilfe einer sterilen Spritze wurden die die Mikrofluidik-Chips mit den Zellen beimpft. Aufgrund einer fehlenden Referenzelektrodenanschlussmöglichkeit wurden chronopotentiometrische Messungen in einem 2-Elektroden-Messaufbau durchgeführt. An den Potentiostaten (WaveNow Portable USB

Potentiostat, Pine Research Instrumentation, USA) wurde eine Platinfläche als Arbeitselektrode, in diesen Fall als Anode, angeschlossen, die zweite Platinfläche wurde als Referenzelektrode und Kathode kurzgeschlossen. Über die Software Aftermath (Pine Instrument Company, USA) wurde das Messprotokoll erstellt, bei dem ein kleiner konstanter Strom von 50 nA gewählt und die sich einstellende Potentialdifferenz des gepufferten Mediums für eine vorgegebene Zeit gemessen wurde.

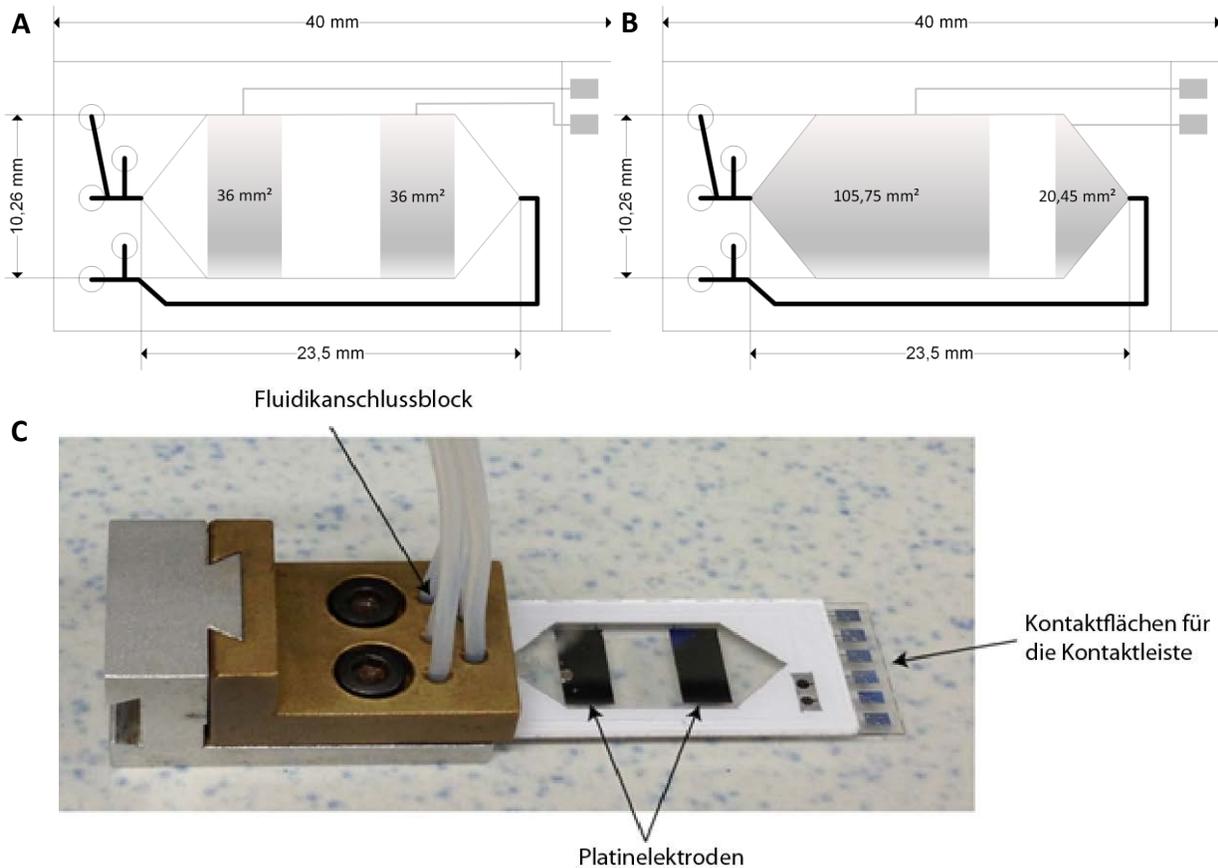


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Mikrofluidik-Chips der A) ersten und B) zweiten Generation mit den entsprechenden Abmessungen und Elektrodenflächen. C) Mikrofluidik-Chip angeschlossen am Fluidikanschlussblock für das Befüllen der Reaktionskammer mittels Kapillaren.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit werden in 2 Teile aufgeteilt. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Untersuchung des Propionat Abbauwegs in *E. coli* K12 unter anaeroben Bedingungen. Der zweite Teil befasst sich mit der Entwicklung eines Bioanoden-basierten Mikrofluidik-Chips, für die schnelle, kostengünstige und einfachere Messung eines zur Analytenkonzentration, nämlich Propionatkonzentration, proportionalen Stromes.

3.1 Untersuchungen zum *prp*-Operon aus *E. coli* K12

3.1.1 Anaerober Propionatabbau durch *E. coli* K12

Der oxidative Abbau von Propionat in *E. coli* K12 erfolgt über den 2-Methylcitrat-Zyklus, dessen Enzyme durch die Gene des *prp*-Operons codiert werden (siehe Abbildung 7). Für die genauere Untersuchung der Aktivität und Regulierung dieses Operons wurden zunächst Wachstumskurven aufgenommen. Es wurde das Wachstum in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat als einziger Kohlenstoff- und Elektronenquelle und unterschiedlichen Elektronenakzeptoren verfolgt. Sauerstoff diente als Elektronenakzeptor für die aeroben Wachstumsbedingungen, während 50 mM Nitrat und 50 mM DMSO jeweils die anaeroben Bedingungen definierten. Der Stamm *E. coli* K12 wurde wie in 2.2.1 beschrieben vorkultiviert und mit M4-Waschpuffer gewaschen. Die Wachstumskurven wurden mit einer einheitlichen OD_{600} von 0,05 gestartet und der Verlauf durch regelmäßige Probennahme verfolgt. Die Propionatkonzentration wurde mittels HPLC (siehe 2.4.4) ermittelt. Die resultierenden Kurven sind Abbildung 10 zu entnehmen. Unter aeroben Bedingungen erreichte der Stamm innerhalb von 80 h eine OD_{600} von 0,53. Hingegen konnte unter anaeroben Bedingungen sowohl mit 50 mM Nitrat als auch mit 50 mM DMSO kein Wachstum beobachtet werden. Dies schlägt sich auch auf den Propionatverbrauch nieder. Unter aeroben Bedingungen wurde das gesamte

Propionat aufgebraucht, während unter anaeroben Bedingungen die Propionatkonzentration unverändert blieb.

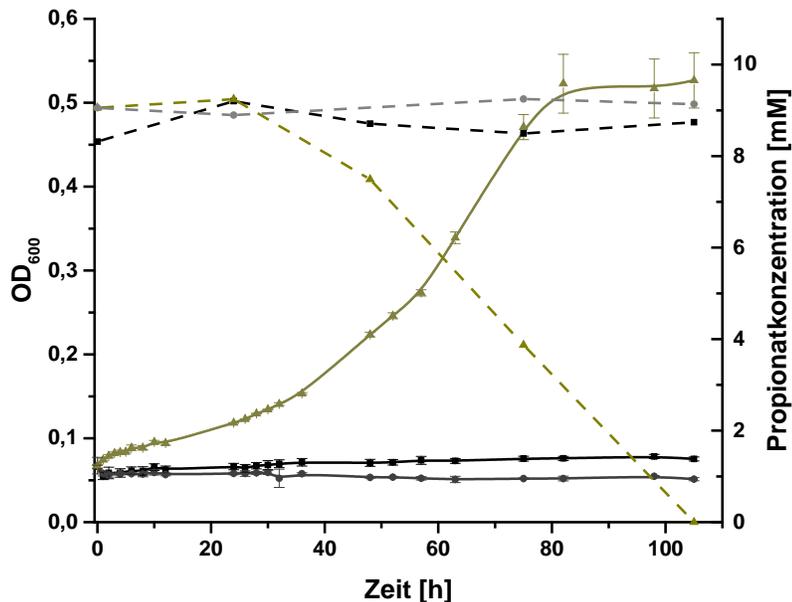


Abbildung 10 Wachstumskurven von *E. coli* K12 in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat als einziger Kohlenstoffquelle und mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren. Für aerobe Bedingungen wurde Luftsauerstoff (grüne Dreiecke) verwendet. Alternative Elektronenakzeptoren waren 50 mM Nitrat (schwarze Quadrate) oder 50 mM DMSO (graue Kreise). Die gestrichelten Linien geben die entsprechenden Propionatkonzentrationen im Medium wieder.

Aufbauend auf den ersten Ergebnissen wurde dem Medium ein Co-Substrat in Form von 50 mM Glycerin hinzugefügt. Dadurch sollte die Bereitstellung von Oxalacetat, welches im Citrat-Zyklus gebildet wird und im zweiten Schritt des Propionatabbauweges mit Propionyl-CoA zusammen zu 2-Methylcitrat weiter umgewandelt wird, gewährleistet werden. Das Wachstum und die Propionatabnahme des Wachstumsexperiments mit 10 mM Propionat, 50 mM Nitrat und 50 mM Glycerin, sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Zellen erreichten hierbei eine OD_{600} von 0,21 innerhalb von 28 h. Allerdings ist dieses Wachstum nur auf den Verbrauch von Glycerin zurück zu führen, denn die Propionatkonzentration im Medium änderte sich bis 50 h nach Wachstumsbeginn nicht signifikant. Die Unfähigkeit von *E. coli* K12 Propionat unter anoxischen Bedingungen abzubauen zu können wies auf den möglichen Einfluss einer globaler Transkriptionsregulation hin, wie sie von vielen Operons des Kohlenstoff-Metabolismus,

insbesondere des Citrat-Zyklus durch das Zweikomponenten-System ArcAB, bekannt ist. Einen weiteren Hinweis für diese Regulierung liefern Gerasimova *et al.* (2003), die bioinformatisch eine ArcA Bindestelle in der Promotorregion des *prp*-Operons ermittelt haben. Daher wurde das *arcA*-Gen deletiert, um einen möglichen Effekt auf das Wachstum mit Propionat nachzuweisen. (Förster and Gescher, 2014). Die Wachstumskurve des *E. coli* $\Delta arcA$ Stammes und der Propionatverbrauch in einem Medium mit 10 mM Propionat und 50 mM Nitrat sind in Abbildung 12 dargestellt. Trotz der Deletion erreichte die Mutante nur eine Verdopplung innerhalb von 60 h. Die Propionatkonzentration im Medium änderte sich ebenfalls nur unwesentlich.

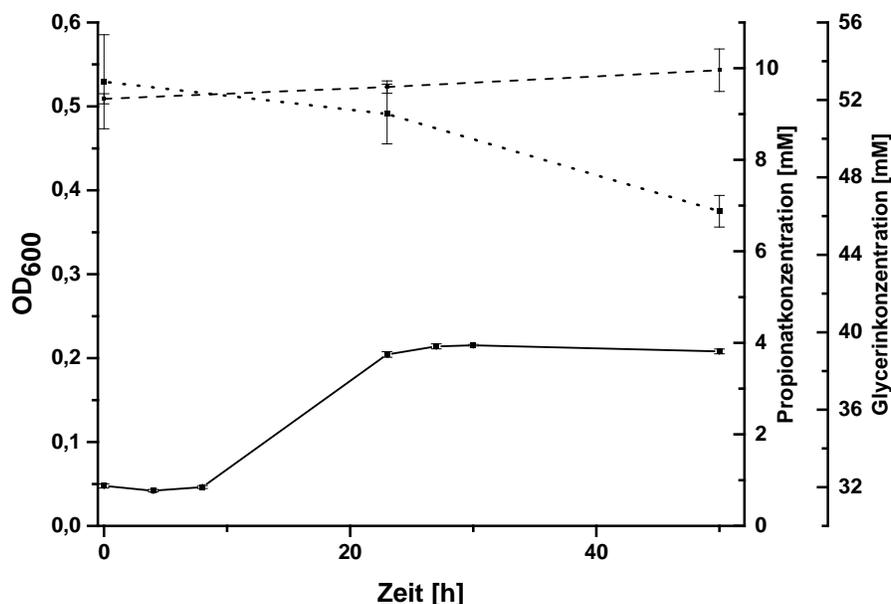


Abbildung 11 Wachstumskurven von *E. coli* K12 in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat und 50 mM Glycerol als Co-Substrat. 50 mM Nitrat dienen als Elektronenakzeptor. Die gestrichelte Linie entspricht der Propionatkonzentration im Medium. Die gepunktete Linie bezieht sich auf die zweite Sekundärachse und gibt die Glycerinkonzentration wieder.

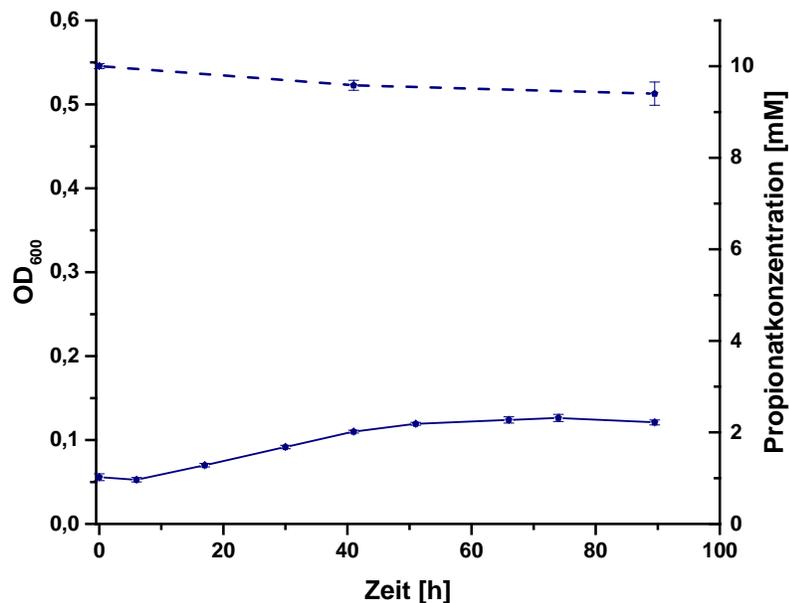


Abbildung 12 Wachstumskurve von *E. coli* $\Delta arcA$ in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat als Kohlenstoffquelle und 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. Die gestrichelte Linie gibt die Propionatkonzentration im Medium wieder.

3.1.2 Expressionsanalysen des *prp*-Operons in *E. coli* K12

Da die Wachstumstests mit *E. coli* K12 und *E. coli* K12 $\Delta arcA$ unter anaeroben Bedingungen kaum Wachstum und Propionatverbrauch zeigten und somit keine Funktionalität nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression der *prp*-Gene genauer untersucht.

3.1.2.1 RT-PCR Versuche

Die Expressionsanalyse des *prp*-Operons erfolgte zunächst mittels RT-PCR (siehe Abschnitt 2.3.5). Hierzu wurden *E. coli* K12 Zellen im Triplikate mit 50 mM Glycerin, 10 mM Propionat anaerob mit 50 mM Nitrat und aerob kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase wurden die Triplikate zusammengeführt und die Gesamt-RNA wie in 2.3.5 beschrieben isoliert. Die bakterielle Gesamt-RNA wurde anschließend mit dem SensiFAST cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.3.5) und die Transkription der *prp*-Gene und des Referenzgens über PCR analysiert. Dafür wurden für jedes Gen des *prp*-Operons sowie dem Referenzgen *rpoA* und einem intergenen DNA-Bereich spezifische Primerpaare designed, die 335 bp bis 549 bp große Bereiche amplifizierten (Primer 12 bis 25 Tabelle 2-10). Als Positiv-Kontrolle dienten Primer, die

innerhalb des Referenzgens *rpoA* binden und durch dessen konstitutive Expression ein stetes PCR-Signal liefern (Jafri *et al.*, 1995). Eine Kontamination durch genomische DNA (gDNA) konnte durch die Negativ-Kontrolle ausgeschlossen werden, da diese Primer (Neg3, Primer 22 und 23) an einen nicht transkribierten Bereich der DNA binden und somit mit RNA als Template kein PCR-Signal erzeugen. Zusätzliche Kontrollen auf Verunreinigungen der eingesetzten Chemikalien oder Primer erfolgte indem Wasser ohne Template eingesetzt wurde, während hingegen die PCR-Effizienz mit gDNA als Template getestet wurde. Die resultierenden PCR-Banden im Agarosegel sind in Abbildung 13 A dargestellt. Die einzelnen Intensitäten der PCR-Banden wurden zusätzlich densitometrisch mittels der Image Lab Software (Bio-Rad, München) ausgewertet. Alle Werte beziehen sich relativ zur Positivkontrolle der cDNA, dem Referenzgen *rpoA* (Abbildung 13 B). Diese Methode ist zwar nicht quantitativ zuverlässig, dennoch zeigt sie potenzielle Unterschiede in der Transkription bei unterschiedlichen Bedingungen auf. Es ist eindeutig erkennbar, dass die Gene im Operon nicht gleichmäßig exprimiert werden. Obwohl das Regulatorgen *prpR* kaum erkennbar ist, bilden die Amplifikate von *prpB*, *prpC* und *prpD* unter aeroben Bedingungen gut sichtbare Banden. Die Bande des *prpE* Gens ergab ein vergleichsweise schwaches Signal, welches dennoch oberhalb der Negative Kontrolle war. Unter anaeroben Bedingung ergaben nur *prpB* und *prpC* ein starkes Signal, während *prpD* viel schwächer exprimiert war und *prpR* und *prpE* kaum detektiert werden konnten. Daher ergibt sich für die Expression unter anaeroben Bedingungen ein stufenähnliches Expressionsprofil innerhalb des *prpBCDE* Genclusters. Dieses Expressionsprofil war ein erster Hinweis dafür, dass unter anoxischen Bedingungen eine zusätzliche Regulation außerhalb der Promotorregion existieren könnte.

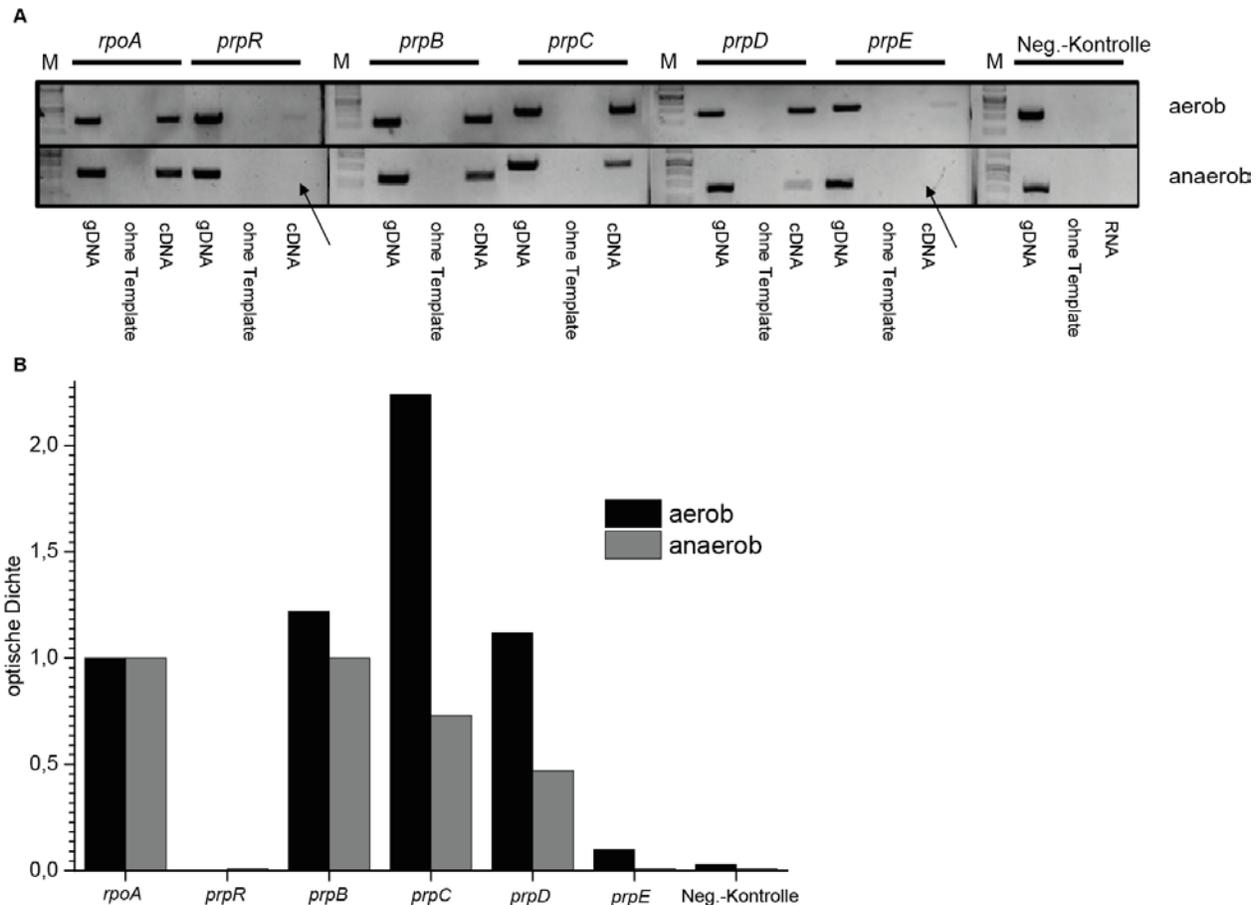


Abbildung 13 A) PCR-Reaktionen mit den spezifischen Primepaaren für die Gene *prpR*, *prpB*, *prpC*, *prpD*, *prpE* und *rpoA* und einen intergenen Bereich (Neg.-Kontrolle). Als Template wurde jeweils gDNA, Wasser und cDNA verwendet (bzw. isolierte RNA für die Neg.-Kontrolle). Das *rpoA* Gen diente dabei als Referenzgen für die cDNA-Quantifizierung. *E. coli* K12 wurde aerob mit 50 mM Glycerin und 10 mM Propionat in M4-Minimalmedium und anaerob mit zusätzlich 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor kultiviert. Nach der RNA-Isolierung folgte die RT-PCR. **B)** Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten der unterschiedlich transkribierten *prp*-Gene im Vergleich zum Referenzgen *rpoA* unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

3.1.2.2 Transkriptomanalyse

Um einen tieferen Einblick in die Transkriptionsregulation des *prp*-Operons im Zusammenhang mit einer globaleren Regulation zu erhalten, wurde eine Transkriptomanalyse mit *E. coli* K12 durchgeführt. Die Zellen wurden dafür unter vier Bedingungen kultiviert. Die aeroben Kulturen in M4-Minimalmedium mit 50 mM Glycerin mit und ohne Induktion des *prp*-Operons durch 10 mM Propionat dienten als Referenz. Für die anaeroben Kulturen wurde

jeweils noch 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor dazugegeben. Je Wachstumsbedingung wurden zwei Triplikate angesetzt die nach Erreichen der exponentiellen Phase jeweils zusammengeführt und geerntet wurden. Die RNA-Isolierung und mRNA-Anreicherung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben. Die erhaltenen mRNA-Duplikate wurden zur Sequenzierung an die Next Generation Sequencing (NGS) Core Facility (Institut für Toxikologie und Genetik (KIT)) übersendet. Dort wurden die Proben mit einem HiSeq1500 sequenziert. Die Rohdatenauswertung erfolgte in Kooperation mit Andreas Dötsch vom Institut für funktionelle Grenzflächen (KIT). Dabei wurden jeweils die mit Propionat induzierten Proben mit den nicht induzierten Proben und die anaeroben mit den aeroben Proben verglichen. Die daraus resultierenden Werte sind \log_2 -fold changes, die die differenzielle Expression eines Gens unter der Testbedingung gegenüber der Referenzbedingung wiedergeben. Auf Grund der zweierlogarithmischen Umwandlung ist eine leichte Diskriminierung zwischen Hochregulierung (+) und Runterregulierung (-) durch das Vorzeichen möglich. Werte, mit einer Änderung höher als +1 oder kleiner als -1 bei gleichzeitigem *padj* (P-value adjusted) von kleiner gleich 0,05 wurden als signifikant erachtet. Der *padj*-Wert bezeichnet die angepasste Varianz der Transkripte. Im Anhang sind die Änderungen und *padj*-Werte aller regulierten Gene aufgeführt.

Die Werte für die differenzielle Expression der *prp*-Gene und der Gene des Citrat-Zyklus unter anaeroben Bedingungen mit Propionat im Vergleich zu den entsprechenden aeroben Proben sind in Abbildung 14 A dargestellt. Wie erwartet, sind unter diesen Bedingungen die Gene des Citrat-Zyklus weitgehend runterreguliert. Die *prp*-Gene zeigen ebenfalls eine verminderte Expression, die im Fall von *prpE* sogar um das fast 40-fache herunterreguliert ist. Auffällig ist hier wieder, dass von *prpB* über *prpC* und *prpD* zu *prpE* die Expression kontinuierlich abnimmt. Dies wird in Abbildung 14 B noch eindeutiger, in der die normalisierten Expressionen (normalisierte Reads pro Kilobasenpaar, nRPK) der einzelnen Gene zweierlogarithmisch aufgetragen sind. Die aeroben Proben zeigen eine relativ gleichmäßige Expression des *prpBCDE*-Genclusters, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Propionat (GO und GPO). Durch die Induktion wurde die Expression um Faktor 1,8 bis 3,0 erhöht. Unter anaeroben Bedingungen zeigt die Induktion durch Propionat nur einen geringen Effekt (GN und GPN). Vielmehr ist ein Anaerobizitätseffekt erkennbar, der durch die drastische stufenweise Abnahme

der Expression entlang des *prpBCDE*-Genclusters definiert wird und unabhängig von der Propionatinduktion ist. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Expressionsergebnis aus dem RT-PCR Versuch in Abbildung 13 B überein und deutet auf eine posttranskriptionelle Regulierung des *prp*-Operons unter anaeroben Bedingungen durch eine 3'-5' Exoribonuklease hin.

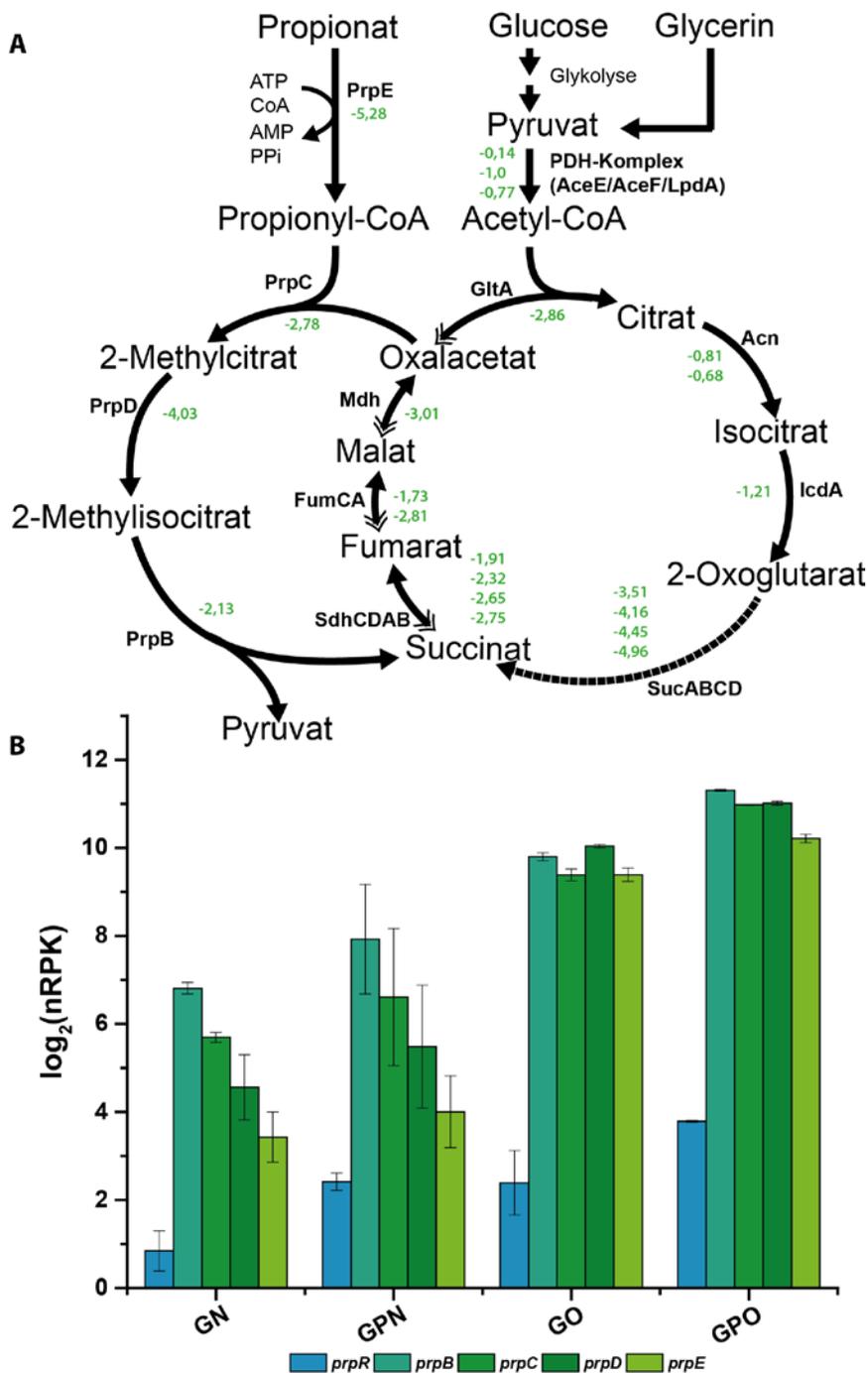


Abbildung 14 A) 2-Methylcitrat-Zyklus und Citrat-Zyklus von *E. coli* K12. Die Expressionswerte sind \log_2 -fold changes von *E. coli* K12 unter anaeroben Bedingungen mit 50 mM Glycerin, 10 mM Propionate und 50 mM Nitrat im Vergleich zum aeroben Referenztranskriptom. Die Doppelpfeile im Citrat-Zyklus symbolisieren den reduktiven anaeroben Citrat-Zyklus. **B) Normalisierte Genexpression (Reads pro Kilobasenpaar, nRPK) der einzelnen Gene des *prp*-Operons des *E. coli* K12 Stammes unter vier verschiedenen Wachstumsbedingungen im M4-Minimalmedium.** GN = 50 mM Glycerin und 50 mM Nitrat; GPN = 50 mM Glycerin, 10 mM Propionat und 50 mM Nitrat; GO = 50 mM Glycerin und Sauerstoff (O₂); GPO = 50 mM Glycerin, 10 mM Propionat und Sauerstoff (O₂).

3.1.3 Exoribonuklease RNase R

Das Transkriptom wurde nach Ribonukleasen mit bekannter 3'-5' Exoribonuklease-Aktivität durchsucht (Zuo and Deutscher, 2001). Von den acht Enzymen zeigten nur drei eine signifikante geänderte Expression unter anaeroben Bedingungen (siehe Tabelle 3-1). Die höchste Änderung wurde bei der Exoribonuklease R (RNase R) gefunden, die unter anaeroben Bedingungen fast viermal stärker exprimiert wurde als unter aeroben Bedingungen.

Tabelle 3-1 Auflistung der Nukleasen mit bekannter 3'-5'-Exoribonuklease Aktivität mit den entsprechenden *log₂-fold changes* unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen. Die Nukleasen sind nach der Signifikanz (*p*adj) sortiert.

Lokus ID	Gen	Annotierung	GPO_GPN <i>log₂fc</i>	<i>p</i> adj
b4179	<i>rnr</i>	Exoribonuklease R; RNase R	1,97	5,47*10 ⁻¹⁴
b1804	<i>rnd</i>	Ribonuklease D	1,13	1,99*10 ⁻³
b1286	<i>rnb</i>	Ribonuklease II; RNase II	0,97	1,11*10 ⁻²
b3164	<i>prp</i>	Polynukleotidphosphorylase/Polyadenylase	0,43	1,30*10 ⁻¹
b1652	<i>rnt</i>	Ribonuklease T; RNase T	0,79	1,37*10 ⁻¹
b4162	<i>orn</i>	Oligoribonuklease	-0,60	4,01*10 ⁻¹
b3643	<i>rph</i>	RNase PH	0,26	7,48*10 ⁻¹
b2268	<i>rbn</i>	RNase BN	-0,15	8,71*10 ⁻¹

RNase R ist eine Mg²⁺-abhängige 3'-5'-Exoribonuklease, die hauptsächlich lineare RNA verdaut. Durch ihre zusätzliche Helicase-Aktivität ist das Enzym in der Lage auch Sekundärstrukturen mit einem polyadenylierten Ende zu erkennen und von da an zu degradieren (Andrade *et al.*, 2009; Awano *et al.*, 2010). Solche Sekundärstrukturen können unter anderem durch *Rho*-unabhängige Terminatorsequenzen oder repetitive extragene Palindromsequenzen, sogenannte REP-Regionen, gebildet werden. Daraus resultierende Sekundärstrukturen werden allgemein als stabilisierend erachtet, da sie die mRNA vor dem hydrolytischen Abbau durch RNasen wie RNase II und PNPase schützen, während sie für die RNase R als Substrat dienen können. Die genomische Struktur des *prp*-Operons in *E. coli* K12 weist sogar zwei solcher REP-Regionen auf. Zum einen die annotierte REP25-Region zwischen *prpB* und *prpC*, die 365 Basenpaare umfasst (bp 349605 bis bp 349969), zum anderen REP26, die

8 Nukleotide vom 3'-Ende des *prpE* Gens nachgeschaltet startet und 171 Basenpaare umfasst (bp 354599 bis 354769) (Blattner *et al.*, 1997). Insbesondere die endständige REP26-Region hinter *prpE* könnte durch die Sekundärstrukturausbildung ein Erkennungsmerkmal für den enzymatischen Abbau durch RNase R darstellen. Die 3'-5'-Exoribonukleasaktivität führt nämlich zu einer verminderten Transkriptrate zum 3'-Ende der mRNA, die, zusammen mit der erhöhten Expression der RNase R unter anaeroben Bedingungen, eine Beteiligung an der posttranskriptionellen Regulation des *prp*-Operons suggeriert. Durch diesen Eingriff würde die Expression des ersten Enzyms des Propionatabbauweges, nämlich PrpE, verringert werden und somit die Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA und der weitere Abbau beeinträchtigt werden.

3.1.4 Wachstumsversuche mit *E. coli* Δrnr

Um die Hypothese der Beteiligung von RNase R an der anaeroben posttranskriptionellen Regulation des *prp*-Operons zu verfolgen, wurde ein *E. coli* Stamm herangezogen, dessen *rnr* Gen, welches für die RNase R codiert, genomisch deletiert wurde (Baba *et al.*, 2006). Dieser Stamm ist in Tabelle 2-1 beschrieben und wird fortan als *E. coli* Δrnr bezeichnet.

E. coli Δrnr wurde wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben vorkultiviert und das Wachstum in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat als Kohlenstoff- und Elektronenquelle und mit Sauerstoff bzw. 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor verfolgt. Zum Vergleich wurden in Abbildung 15 die Wachstums- und Propionatverbrauchskurven des Wildtyp *E. coli* K12 unter denselben Bedingungen mit aufgetragen. Die Mutante *E. coli* Δrnr zeigt unter aeroben Bedingungen ein leicht schnelleres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und verbraucht innerhalb von 70 h 7 mM Propionat, während der Wildtyp Stamm in derselben Zeit 5 mM Propionat verbraucht (Abbildung 15 A). Noch deutlicher unterscheiden sich die beiden Stämme unter anaeroben Bedingungen. Die Mutante erreichte hierbei eine OD_{600} von 0,21 und verbrauchte dabei ca. 4 mM Propionat. Wenn allerdings 50 mM DMSO als alternativer Elektronenakzeptor verwendet wurden, zeigte *E. coli* Δrnr , ähnlich zum Wildtyp Stamm bei der Nitratatmung, weder Wachstum noch Propionatverbrauch (Abbildung 15 B). Dies ist wahrscheinlich durch das im Vergleich zu Nitrat niedrigere Redoxpotential von DMSO zu erklären. Interessanterweise wurde durch *E. coli*

Δrnr nicht das gesamte zur Verfügung stehende Propionat verwendet. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf eine weitere Limitierung, eventuell durch den unter anaeroben Bedingungen herunterregulierten Citrat-Zyklus, sein. Weiterhin wurde die Propionatabnahme unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von 50 mM Glycerin getestet. Auch hier wurde der Propionatverbrauch durch die *rnr*-Mutation signifikant gesteigert (Abbildung 15 C). Ebenso stieg der Glycerinverbrauch an.

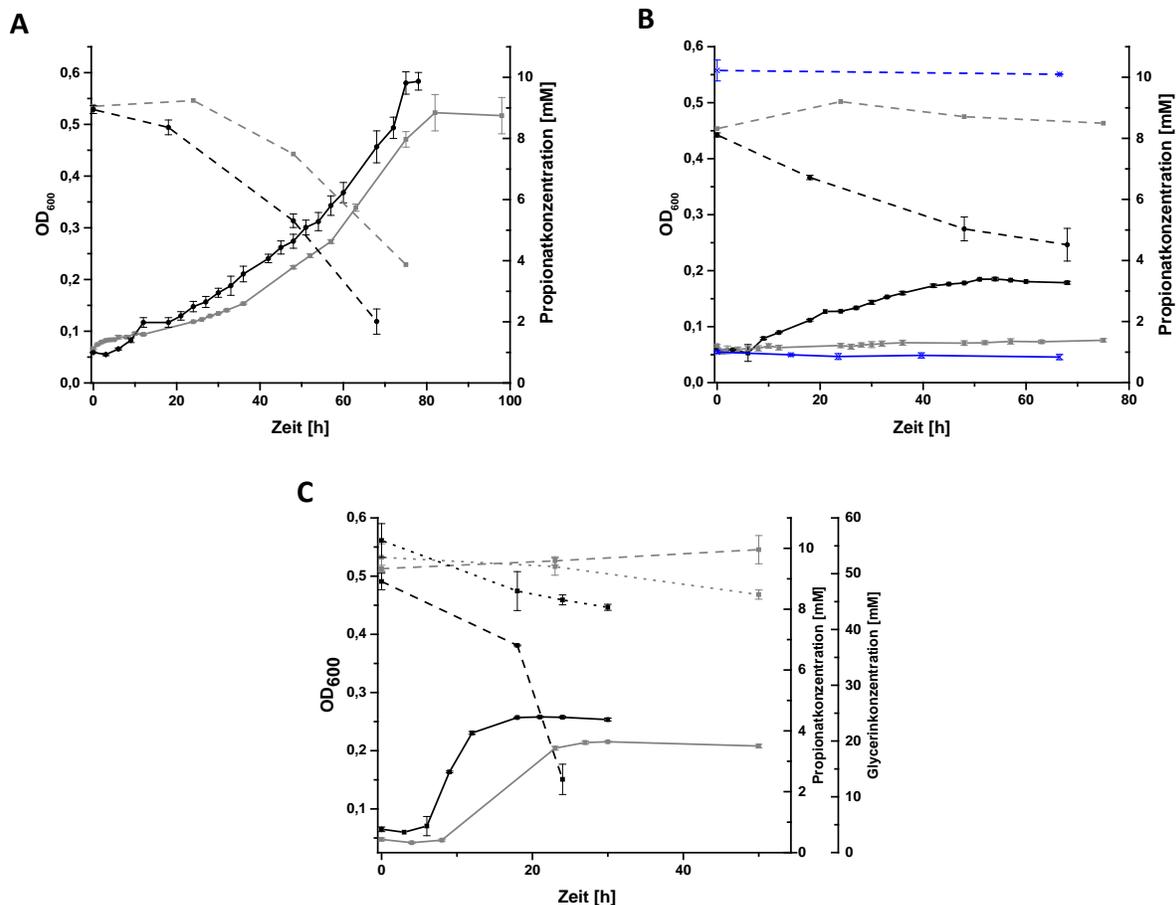


Abbildung 15 Wachstum von *E. coli* K12 und *E. coli* Δrnr in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat als Kohlenstoffquelle unter aeroben und anaeroben Bedingungen. A) Aerobes Wachstum von *E. coli* K12 (grau) und *E. coli* Δrnr (schwarz) mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor. B) Anaerobes Wachstum von *E. coli* K12 (grau) und *E. coli* Δrnr (schwarz) mit 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor und *E. coli* Δrnr mit 50 mM DMSO (blau). C) Anaerobes Wachstum von *E. coli* K12 (grau) und *E. coli* Δrnr (schwarz) mit zusätzlich 50 mM Glycerin als Co-Substrat. Die Propionatkonzentration im Medium wird durch die entsprechende gestrichelte Linie wiedergegeben. Die gepunkteten Linien geben die Glycerinkonzentration an.

Um sicher zu stellen, dass das verbesserte Wachstum mit Propionat aus der Deletion des Gens *rnr* im Genom von *E. coli* Δrnr hervorgeht, wurde zunächst das Plasmid pMal_*rnr* konstruiert. Mit diesem Konstrukt ist es möglich die Expression von RNase R durch Zugabe von 50 μ M IPTG im RNase R defizienten Stamm zu induzieren, folglich die Abwesenheit zu komplementieren. Das Gen *rnr* wurde mit Hilfe der Primer 26 und 27 (Tabelle 2-10), die die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme NdeI und BamHI tragen, aus dem Genom von *E. coli* K12 amplifiziert und nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel (2.3.4) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (2.3.2). Zeitgleich wurde der leere Vektor pMal_p2E mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert. Es folgte eine klassische Ligation der beiden Fragmente mit der T4-DNA-Ligase und die Transformation in den Stamm *E. coli* Δrnr . Der Stamm *E. coli* Δrnr wurde ebenfalls mit dem unveränderten Plasmid pMal_p2E transformiert und diente hierbei als Kontrolle für phänotypische Veränderungen, die durch das Plasmid oder der Ampicillinresistenz hervorgerufen werden. Für den Komplementationsversuch wurden die beiden transformierten Stämmen in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat sowohl aerob als auch anaerob mit 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor angezogen. Erneut wurde das Wachstum und die Propionatabnahme im Medium verfolgt. Der Stamm *E. coli* Δrnr mit pMal_*rnr* zeigt dabei unter beiden Wachstumsbedingungen ein deutlich vermindertes Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm *E. coli* Δrnr mit pMal_p2E (Abbildung 16). Unter aeroben Bedingungen scheint die Fähigkeit zum Wachstum mit Propionat als einzige Kohlenstoffquelle durch die induzierte Expression von RNase R unterdrückt zu werden (Abbildung 16A). Ebenso verhält es sich unter anaeroben Bedingungen, wo der Stamm *E. coli* Δrnr mit pMal_*rnr* sich phänotypisch wie der Wildtypstamm *E. coli* K12 verhielt (Abbildung 16 B).

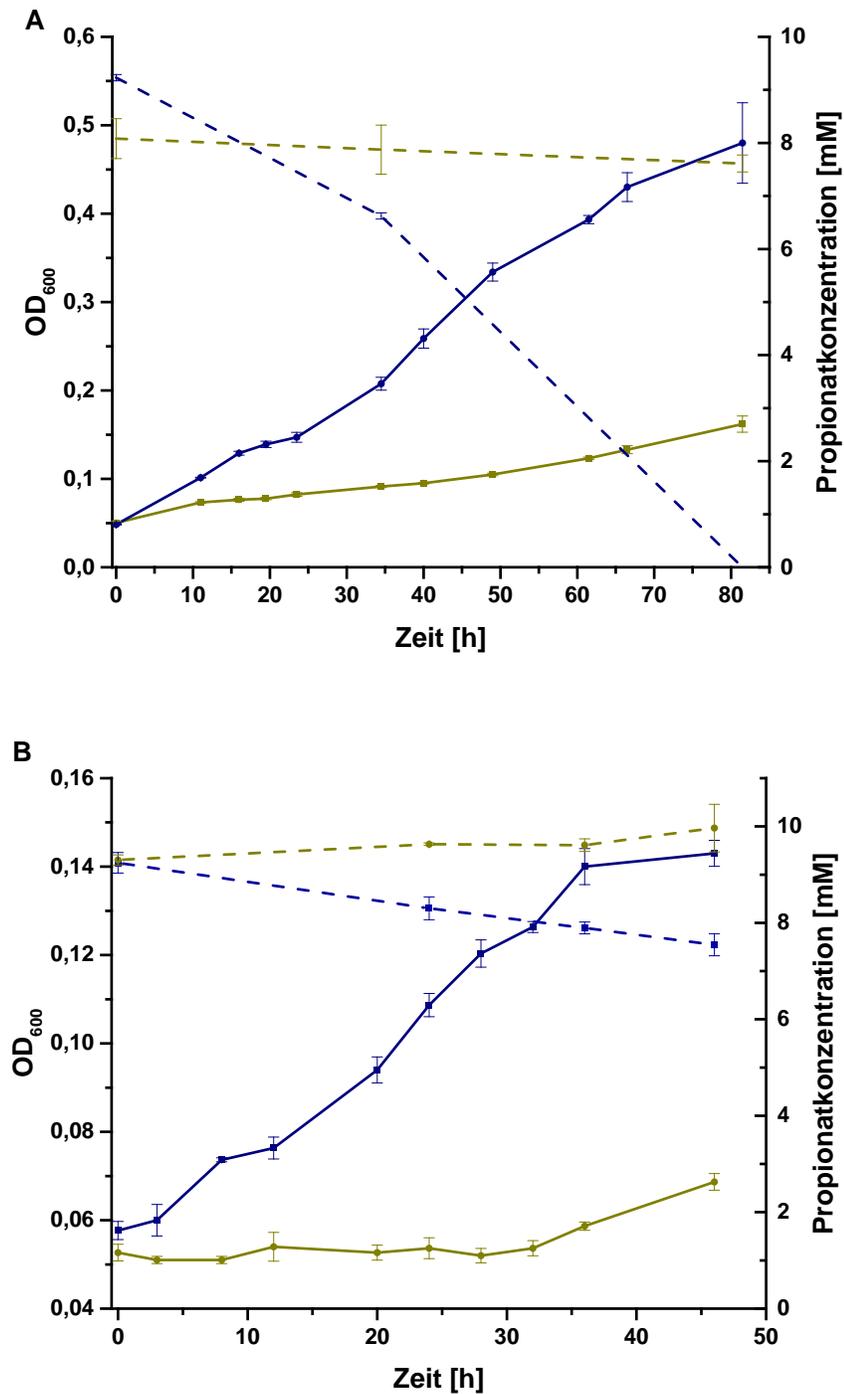


Abbildung 16 Komplementationsversuch von *E. coli* Δrnr mit pMal_rnr (gelb) und pMal (blau) als Kontrolle in M4-Minimalmedium mit 10 mM Propionat als Kohlenstoffquelle mit A) Sauerstoff und mit B) 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. Die gestrichelten Linien geben die entsprechende Propionatkonzentration im Medium an.

3.1.5 Transkriptomanalyse von *E. coli* Δ *rrn*

Der Stamm *E. coli* Δ *rrn* wurde zusätzlich auf Transkriptionsebene untersucht. Um den phänotypischen Effekt dieser Mutante ebenfalls in den Expressionsprofilen wiederzufinden, wurde der Stamm unter den gleichen vier Wachstumsbedingungen wie in Abschnitt 3.1.2.2 kultiviert und die RNA nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase isoliert. Die Probenvorbereitung, Sequenzierung und Auswertung erfolgten zu Vergleichszwecken nach den gleichen Protokollen der Transkriptomanalyse des Wildtypstammes.

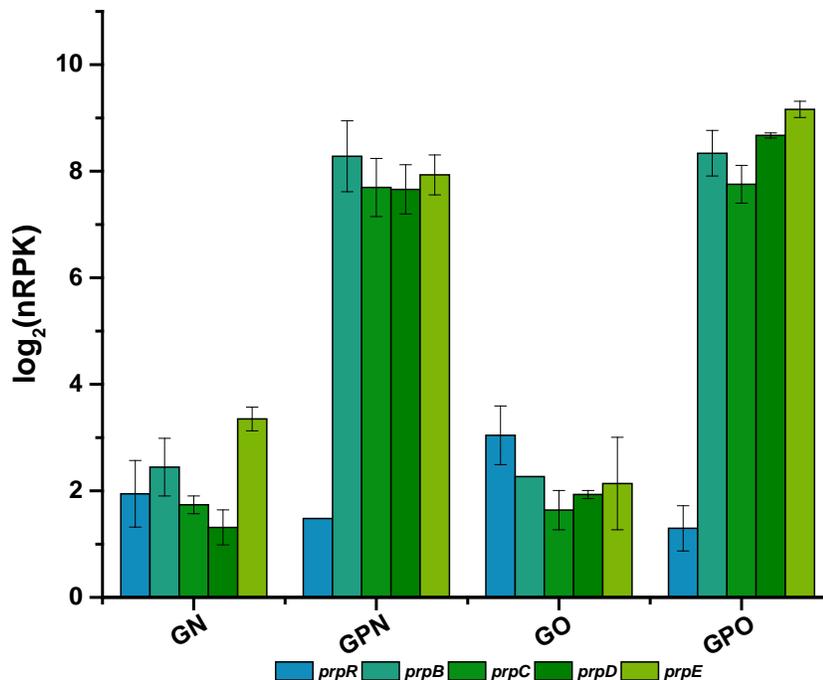


Abbildung 17 Normalisierte Genexpression (Reads pro Kilobasenpaar, nRPK) der einzelnen Gene des *prp*-Operons des *E. coli* Δ *rrn* Stammes unter vier verschiedenen Wachstumsbedingungen im M4-Minimalmedium. GN = 50 mM Glycerin und 50 mM Nitrat; GPN = 50 mM Glycerin, 10 mM Propionat und 50 mM Nitrat; GO = 50 mM Glycerin und Sauerstoff (O₂); GPO = 50 mM Glycerin, 10 mM Propionat und Sauerstoff (O₂).

Die normalisierte Genexpression des *prp*-Genclusters der Mutante ist in Abbildung 17 dargestellt. Die aeroben Proben GO und GPO zeigen eine gleichmäßige Genexpression innerhalb des *prp*-Genclusters. Allerdings ist hier im Vergleich zum Wildtyp der Effekt der Induktion durch

Propionat im Medium deutlicher erkennbar. Die Gene *prpBCDE* sind im Durchschnitt durch die Anwesenheit von Propionat um Faktor 89,7 ($\pm 1,3$) hochreguliert im Vergleich zu den uninduzierten Proben. Ein ähnliches Expressionsprofil zeigt sich bei den anaeroben Proben GN und GPN. Die Deletion des *rnr* Gens führt auf Transkriptionsebene dazu, dass die Gene innerhalb des Genclusters auch unter anaeroben Bedingungen eine gleichmäßige Expression aufzeigen. Dieser Effekt wird von einem zusätzlichen deutlichen Induktionseffekt begleitet. Die Expression der *prpBCDE* Gene unter anaeroben Bedingungen mit Propionat liegt um Faktor 51,3 ($\pm 1,6$) höher als die Expression der nicht induzierten anaeroben Proben GN. Diese Transkriptomergebnisse bestätigen die bisher auf experimenteller Ebene erreichten Ergebnisse und beweisen somit den Einfluss der RNase R auf die Stabilität der *prp*-mRNA unter anaeroben Bedingungen.

3.1.6 Wirkung von RNase R auf weitere Gene und Gencluster

Die Transkriptomdaten wurden nach weiteren Genen und Operons untersucht, die eventuell einer direkten oder indirekten Regulierung durch RNase R unterliegen. Bei dieser Untersuchung wurde hauptsächlich auf Änderungen zwischen der Mutante und dem Wildtyp im anaeroben Stoffwechsel eingegangen. Wie schon aus der Literatur für den aeroben Stoffwechsel bekannt, wurde bei den Genen und Genclustern der Zellmotilität eine verminderte Expression auch unter anaeroben Bedingungen gefunden (Pobre and Arraiano, 2015). Weitere unterschiedlich exprimierte Gene und Gencluster sind in Abbildung 18 mit den entsprechenden *log₂-fold changes* dargestellt. Besonders auffällig war die Herunterregulation sämtlicher Gene des Sulfonatstoffwechsels durch die Abwesenheit von RNase R. Fast alle Gene des Methionin- und Cystein-Biosyntheseweges, kodiert durch die *met* und *cys* Gene, sowie des Taurin-Abbauweges (*tau* Gene) sind signifikant herabreguliert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 18 A). Da CysB, der positive Regulator dieser Gencluster, ebenfalls vermindert transkribiert wird, reguliert RNase R die Expression der *met*, *cys* und *tau* Gene eher indirekt, vermutlich über CysB. Bei dieser Untersuchung wurden auch einige Gene und Gencluster gefunden, die in *E. coli* Δrnr unter anaeroben Bedingungen eine vermehrte Transkription im Vergleich zum Wildtyp-Stamm haben. Darunter fallen die *glc* Gene des Glycolat- und Glyoxylat-Abbauweges, die *gat* Gene des

Galactitol-Stoffwechsels und die *hde* und *yhiD* Gene der Säuren-Stress-Antwort (Abbildung 18B). Eine vollständige Tabelle mit den \log_2 -fold changes und *padj*-Werten befindet sich im Anhang.

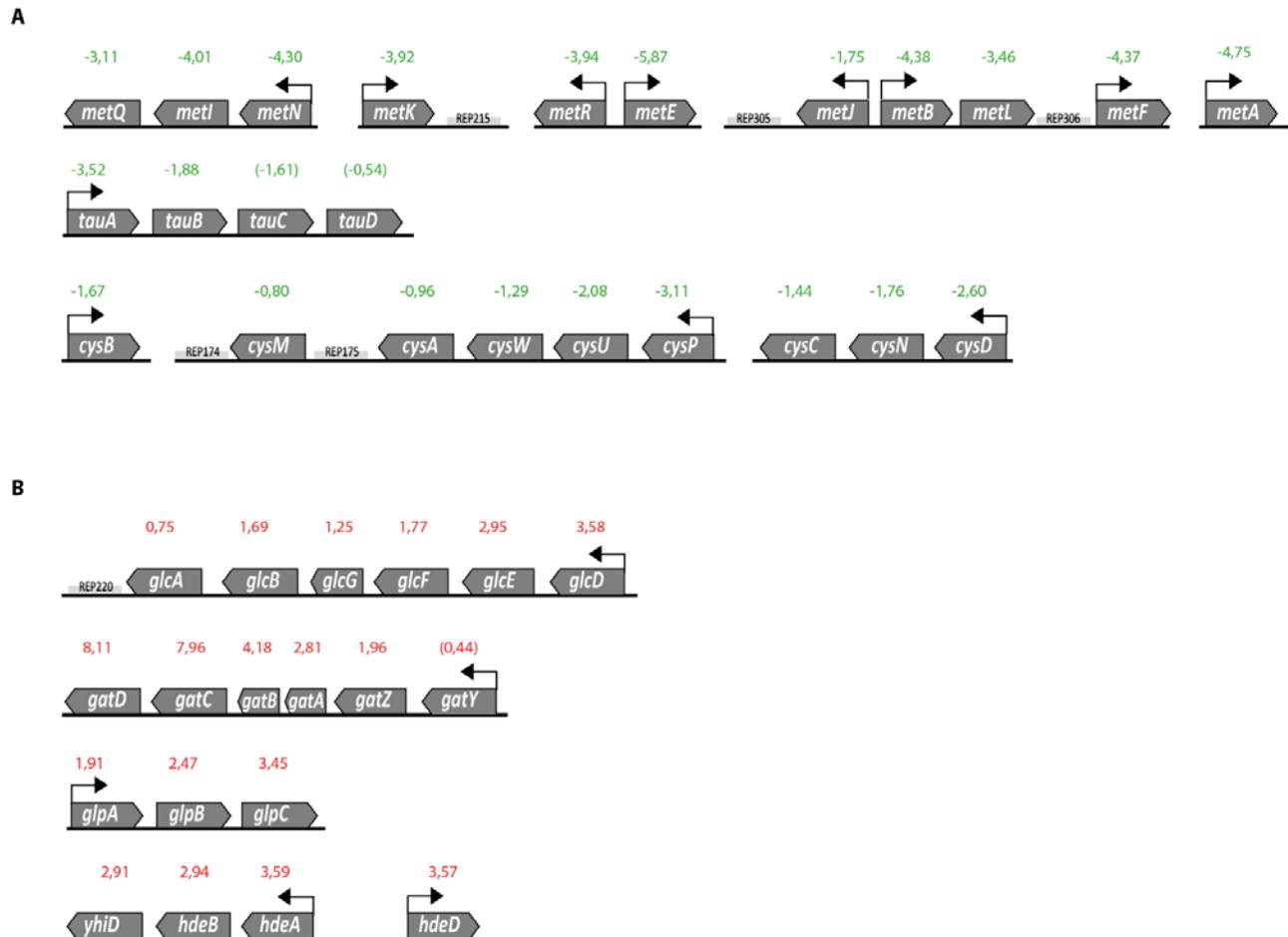


Abbildung 18 Grafische Darstellung der A) herunter- und B) hochregulierten Gene und Gencluster in der Mutante *E. coli* Δ *rrn* unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu *E. coli* K12. Die \log_2 -fold changes der Genexpression sind oberhalb des entsprechenden Gens notiert. Geklammerte Werte besitzen einen nicht signifikanten *padj*.

3.1.7 Suche nach Organismen mit homologen *prp*-Genclustern

Wie beschrieben scheint eine posttranskriptionelle Regulation über eine RNA-Hydrolyse vom 3'-Ende her besonders dann sinnvoll zu sein, wenn das erste Protein des Stoffwechselwegs durch das letzte Gen in 3'-Richtung im Stoffwechsel codiert wird. Um festzustellen, ob andere propionatabbauende Organismen potentiell eine ähnliche posttranskriptionelle Regulation des *prp*-Operons besitzen, wurde in einer Genomdatenbank nach Organismen mit einem ähnlichen

Genclusteraufbau gesucht. Dabei wurde die DNA-Sequenz der genomischen Region um das *prp*-Gencluster von Base 347.406 bis 354.316 des *E. coli* K12 Stamms im FASTA-Format verwendet und mit dem Genom von 1551 individuellen Bakterienstämmen verglichen. Das Alignment mittels tblastn Version 2.2.25+ (Camacho *et al.*, 2009) gegen die Genometa Datenbank (Genometa dataset v2 “one genome per species”; <http://genomics1.mh-hannover.de/genometa/>; (Davenport *et al.*, 2012)) erfolgte durch Andreas Dötsch. Von den 1551 Genomen zeigten 44 Organismen Übereinstimmungen mit allen vier Genen *prpB*, *prpC*, *prpD* und *prpE*. Für die weitere Untersuchung der Anordnung der *prp* Gene wurden die Genome dieser Organismen nochmals einzeln mit der Nukleotid-Datenbank auf der NCBI-Seite analysiert. Daraus resultierten insgesamt 16 Organismen mit einem zu *E. coli* K12 homologen Aufbau des *prp*-Operons inklusive *E. coli* K12 (siehe Abbildung 7 und Tabelle 3-2). Die meisten Vertreter gehören zur Familie der Enterobacteriaceae, darunter einige *Citrobacter*, *Salmonella*, *Photorhabdus* und *Xenorhabdus* Spezies. Aus der Familie der Gallinellaceae, Oxalobacteraceae und Cytophagaceae wurde jeweils ein Vertreter gefunden. Auffällig ist, dass nur *E. coli* spezifisch annotierte REP Regionen innerhalb und am Ende des *prp*-Operons besitzt. *Photorhabdus luminescens* und *Xenorhabdus bovienii* weisen zwar jeweils eine Wiederholungssequenz downstream des *prpE* auf, diese liegen allerdings 631 bzw. 427 Nukleotide davon entfernt.

Tabelle 3-2 Auflistung der Organismen mit einem zu *E. coli* K12 homologen *prp*-Operon

Organismus	Familie	Wiederholungssequenz/ Charakteristik
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	Enterobacteriaceae	REP25, REP26
<i>Shigella</i> sp. D9	Enterobacteriaceae	-
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	Enterobacteriaceae	-
<i>Adhaeribacter aquaticus</i> MBRG1.5, DSM 16391	Cytophagaceae	-
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220	Enterobacteriaceae	-
<i>Citrobacter</i> sp. 30_2	Enterobacteriaceae	-
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	Enterobacteriaceae	-

<i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419	Enterobacteriaceae	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	Enterobacteriaceae	-
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	Enterobacteriaceae	-
<i>Photorhabdus asymbiotica</i> subsp. <i>asymbiotica</i> ATCC 43949	Enterobacteriaceae	-
<i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	Enterobacteriaceae	-
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1	Enterobacteriaceae	631 nt downstream von <i>prpE</i>
<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004	Enterobacteriaceae	427 nt downstream von <i>prpE</i>
<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	Oxalobacteraceae	hypothetisches Protein zwischen <i>prpC</i> und <i>prpD</i>
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1	Gallionellaceae	<i>prpR</i> in derselben Orientierung wie <i>prpBCDE</i>

3.2 Entwicklung eines Biosensors für die Detektion von Propionat

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung eines Biosensorstammes angestrebt, welcher die Quantifizierung von Propionat im Medium ermöglichen sollte. Dabei sollte die Propionatkonzentration an die Übertragung von respiratorischen Elektronen auf unlösliche Eisen(III)-Verbindungen im Medium oder auf eine Anode, folglich an eine Stromproduktion, gekoppelt werden. Zeitgleich wurde in Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT) in Jena ein Mikrofluidik-Chip entwickelt, der eine Interaktion zwischen exoelektrogenen Organismen und der Elektrode sicherstellen und somit die quantitative Messung des Stromes ermöglichen sollte. Für diesen Teil der Arbeit konnten bisher nur erste vorläufige Experimente durchgeführt werden.

3.2.1 Untersuchung der Promotorstärke mittels pBAD_{prpR}mCherry

Die Quantifizierung eines Analyten, in diesem Fall Propionat, ist nur möglich, wenn das sensorische Modul eines Biosensorstamms durch unterschiedliche Konzentrationen des Analyten entsprechend unterschiedlich stark antwortet. Lee und Keasling (2005) zeigten bereits anhand von Fluoreszenzmessungen eines hinter dem Promotor P_{prpBCDE} geschalteten GFP Reportergens, dass der Promotor durch unterschiedliche Konzentrationen, zwischen 0 und 50 mM Propionat, proportional induzierbar ist. Die Versuche wurden allerdings unter aeroben Bedingungen und mit LB als eher undefiniertem Medium durchgeführt. Für den Einsatz des sensorischen Moduls in einem bioelektrochemischen Zell-Aufbau werden allerdings anoxische Bedingungen vorausgesetzt, da so eine effizientere Übertragung der respiratorischen Elektronen auf die Anode möglich ist. Die Übertragung würde in Anwesenheit von Sauerstoff aufgrund des hohen Redoxpotentials zu stark vermindert. Aus diesem Grund wurden Induktionsversuche unter anaeroben Bedingungen und im definierten Medium durchgeführt. Im Gegensatz zu Lee und Keasling wurde das fluoreszierende Protein mCherry als Reporter verwendet, da die Maturation des kleinen Proteins schneller und hypoxieunempfindlicher ist (Carroll *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2001; Shaner *et al.*, 2004). Der *E. coli* K12 Stamm wurde mit dem Plasmid pBAD_{prpR}mCherry transformiert und wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben anaerob kultiviert. Im Triplikat wurde die Kultur mit 0, 7,9, 25 und 50 mM Propionat induziert. Die Fluoreszenz wurde nach 0, 15, 30 und 45 min bei $\lambda=610$ nm gemessen und ist in Abbildung 19 dargestellt. Mit steigender Propionatkonzentration stieg auch das Fluoreszenzsignal. Zwischen 15 und 30 min Inkubation wurde das mCherry abhängig zur Induktionskonzentration exprimiert und zeigt dabei ein hohes proportionales Signal. Nach 30 min scheint das mCherry immer mehr auszubleichen bzw. abgebaut zu werden. Dies könnte durch die mehrmaligen Exzitations- und Emissionszyklen begünstigt worden sein.

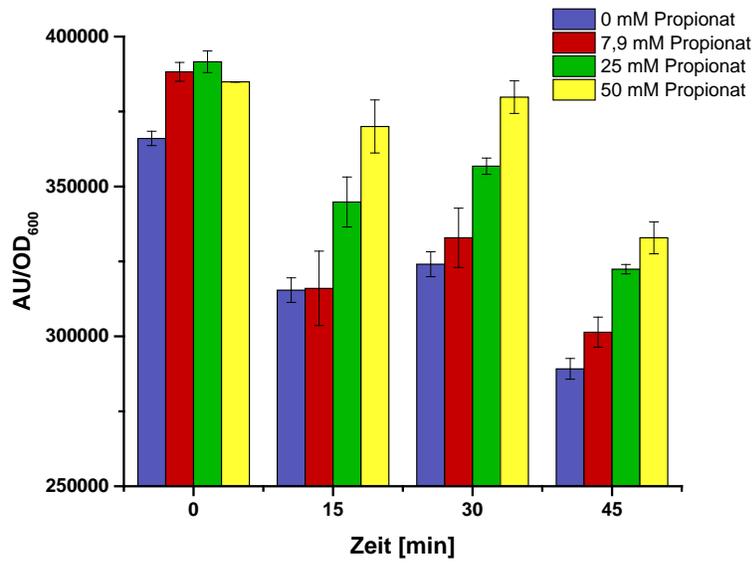


Abbildung 19 Fluoreszenzmessung von *E. coli* K12 mit pBAD_prpR_mCherry unter anaeroben Bedingungen nach Induktion mit unterschiedlichen Propionatkonzentrationen. Die Fluoreszenzeinheit wurde durch die jeweilige OD₆₀₀ geteilt.

3.2.2 Integration der respiratorischen Elektronentransportkette aus *S. oneidensis* in *E. coli* Δnr

Die vorangehenden Experimente zeigten eine Induzierbarkeit des P_{prpBCDE} Promotors auch unter anaeroben Bedingungen. Die Fluoreszenz verhielt sich zudem proportional zu der eingesetzten Propionatkonzentration. Diese Eigenschaft des Promotors stellt eine gute Voraussetzung für die Weiterentwicklung zum bioelektrochemischen Sensor dar. Analog zum Reporter gen *mCherry*, wurden nun die Gene *cymA* und *cctA* hinter dem P_{prpBCDE} kloniert. Diese Gene aus *S. oneidensis* kodieren für die bei der Eisenreduktion essentiellen Enzyme CymA (Cytoplasmamembran gebundenes Tetrahäm-Cytochrom c) und CctA (periplasmatisches kleines Tetrahäm-Cytochrom, *small tetraheme cytochrome* = STC). Mit Hilfe der bioinformatischen Online-Tools GCUA (graphical codon usage analyser) und JCat (Java Codon adaptation tool) wurde die DNA-Sequenz an die für *E. coli* spezifische Codon Usage angepasst und die Synthese des DNA-Strings beauftragt.

Die Eisenreduktionsversuche wurden wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben im Mikrolitermaßstab durchgeführt. Die Eisenreduktion der getesteten Stämme und Bedingungen

wurde mit dem Ferrozine-Assay bestimmt und ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Negativ-Kontrolle stellt der *E. coli* K12 Wildtyp dar, der ohne verlängerte Elektronentransportkette kaum Fe(III) zu Fe(II) reduziert hat. Im Vergleich dazu zeigten die Kulturen von *E. coli* Δnrn , die die verlängerte Elektronentransportkette auf dem Plasmid pBAD_ *prpR_cymA_cctA* trugen, eine insgesamt höhere Fe(II)-Konzentration. Die Zugabe von 5 mM Propionat zur Induktion der Expression von *cymA* und *cctA* zeigte keinen signifikanten Unterschied zum uninduzierten Stamm. Hingegen konnten die Zellen, die mit 10 mM Propionat induziert wurden, innerhalb der gemessenen 3 h fast 500 μM Fe(III) reduzieren.

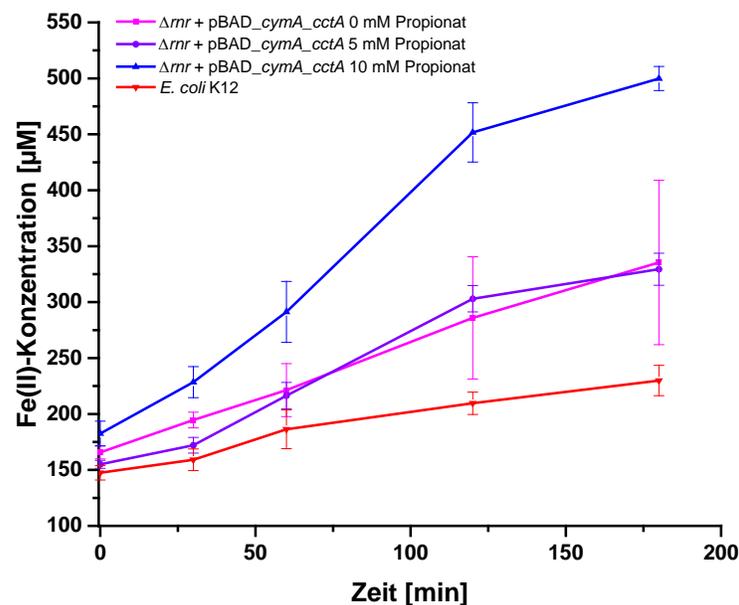


Abbildung 20 Eisenreduktionsverhalten von *E. coli* Δnrn mit pBAD_ *cymA_cctA* bei Induktion mit 0, 5 und 10 mM Propionat. Als Kontrolle wurde der Wildtyp *E. coli* K12 mitgeführt.

3.2.3 Entwicklung eines bioelektrochemischen Mikrofluidik-Chips

In Kooperation mit dem IPHT Jena wurde eine Mikrofluidik-Plattform entwickelt, die eine Interaktion zwischen exoelektrogenen Organismen und Elektrodenflächen mit einem kleinen Arbeitsvolumen im Mikroliterbereich (150 μl) ermöglicht. Zur Entwicklung zählte das Screening nach biokompatiblen, inerten und elektrisch leitfähigen Materialien. Weiterhin wurde ein

sinnvolles Elektrodensetup gewählt, das die Strommessung in einem Einkammer-System ohne physikalische Limitierung erlaubt. Zuletzt wurde mit dem exoelektrogenen Modellorganismus *S. oneidensis* MR1 und einem mit Arabinose induzierbaren Biosensorstamm *S. oneidensis* MtrFAB ein vorläufiger Versuchsaufbau- und Messprotokoll entwickelt, um deren Funktionalität zu testen.

3.2.3.1 Material Screening

Als Material für die Elektrodenflächen wurden mehrere Metalle und Metallverbindungen zur Verfügung gestellt, die als dünner Film, mit Schichtdicken zwischen 80 und 300 nm, auf eine Glasoberfläche mit Hilfe von physikalischer Gasphasenabscheidung aufgebracht wurden (Sputtern). Unter den zur Verfügung gestellten Materialien befanden sich Chrom, Titan, Aluminium, Silizium, Gold, Silber, Platin, Nickel und Nickelchrom-Legierungen. Die beiden Metalle Gold- und Platin haben sich auf Grund ihrer chemischen Stabilität und der bekannten und beschriebenen Biokompatibilität als potentielle Elektrodenmaterialien erwiesen (Qian *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010) und wurden auf ihre Aktivität in einem Dreikammer-MFC-Aufbau getestet (siehe Abschnitt 2.5.1). Bei einem konstant eingestellten Potential von +200 mV gegen SHE wurde der durch *S. oneidensis* erzeugte Strom sowohl an der Platinelektrode als auch an der Goldelektrode verfolgt (Abbildung 21).

Die Goldelektrode zeigte im Duplikat keinen messbaren Strom. Hingegen begünstigte die Platinelektrode die Elektronenübertragung von *S. oneidensis*. Nachdem die Referenzelektrode nach anfänglichem starkem Rauschen ausgetauscht werden musste, konnte eine Stromdichte von maximal $2,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ über einen Zeitraum von 3 Tage gemessen werden.

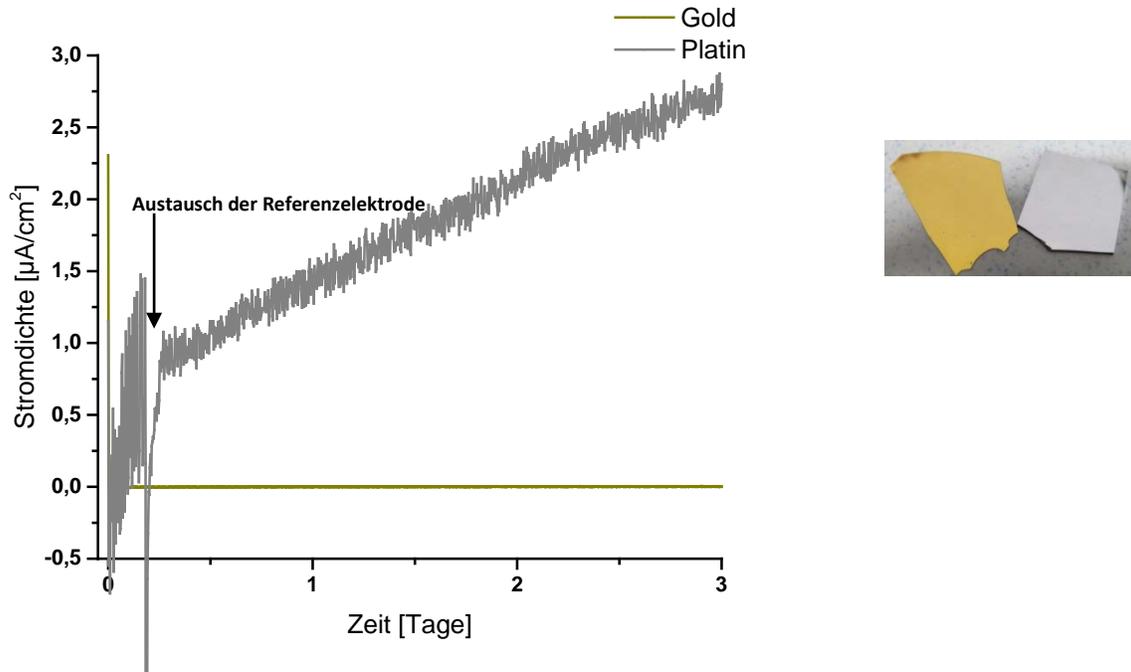


Abbildung 21 Stromkurven der Brennstoffzellenversuche mit *S. oneidensis* mit Gold oder Platin als Anodenmaterial. Es wurde ein konstantes Potential von +200 mV gegen SHE eingestellt. Der Strom wurde auf die Anodenfläche ($1,8 \text{ cm}^2$) normalisiert.

In einem zweiten Ansatz sollte die Wirkung des Mediators Anthraquinon-2,6-Disulfonat (AQDS) getestet werden, um die Übertragungsrate der Elektronen auf die Platinschicht zu erhöhen. Tatsächlich konnte die Zugabe von 200 nM AQDS die Stromproduktion steigern (Abbildung 22). Unmittelbar nach der Zugabe zeigte die Stromkurve einen Sprung von $1,9 \mu\text{A}$ auf $39 \mu\text{A}$. Nach 4 Tagen stabilisierte sich der Stromfluss auf ca. $10 \mu\text{A}$. Auf Grund dieser Ergebnisse soll Platin als bevorzugtes Elektrodenmaterial für die Entwicklung eines Mikrofluidik-Chips verwendet werden.

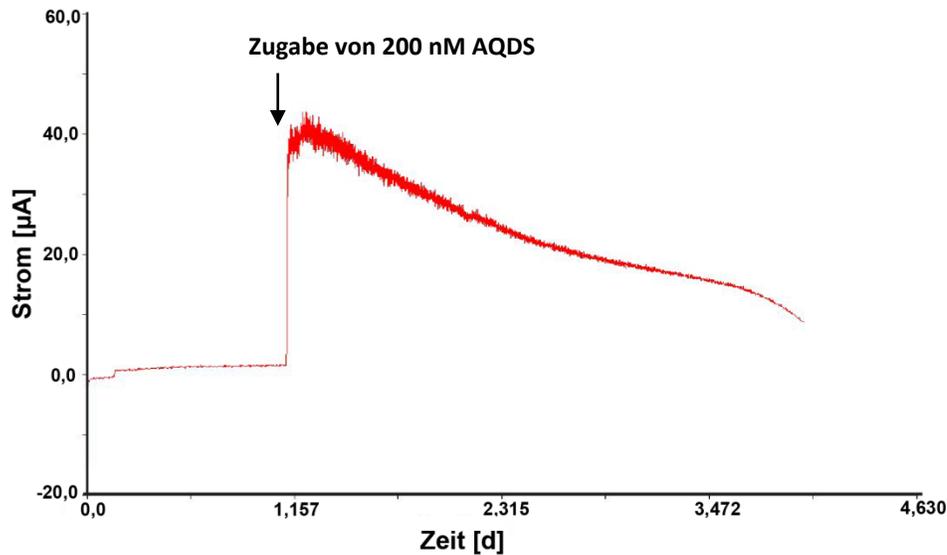


Abbildung 22 Stromkurve des Brennstoffzellenversuchs mit *S. oneidensis* und der Platinanode. Nach ca. 24 h wurden 200 nM AQDS dazugegeben.

3.2.3.2 Erste Versuche mit den Mikrofluidik-Chips mit *S. oneidensis*

Das IPHT entwickelte aufbauend auf den vorangehenden Ergebnissen eine Mikrofluidik-Plattform mit zwei voneinander entkoppelten Platinschichten als Elektrodenflächen, die über externe Kontaktflächen mittels einer Kontaktleiste mit einem Potentiostaten verbunden werden können. Die hexagonale Reaktionskammer umfasst ein Volumen von ca. 150 µl, inklusive der Zu- und Abflussmikrokanäle (Abbildung 9). Aufgrund einer fehlenden Referenzelektrodenanschlussmöglichkeit wurden zunächst Potentialdifferenzmessungen in einem 2-Elektroden-Messaufbau durchgeführt. Eine Platinfläche wurde als Arbeitselektrode, in diesen Fall als Anode angeschlossen. Die zweite Platinfläche wurde als Referenzelektrode und Kathode kurzgeschlossen. Mittels einer Kontaktleiste wurden die Elektroden an den Potentiostaten angeschlossen.

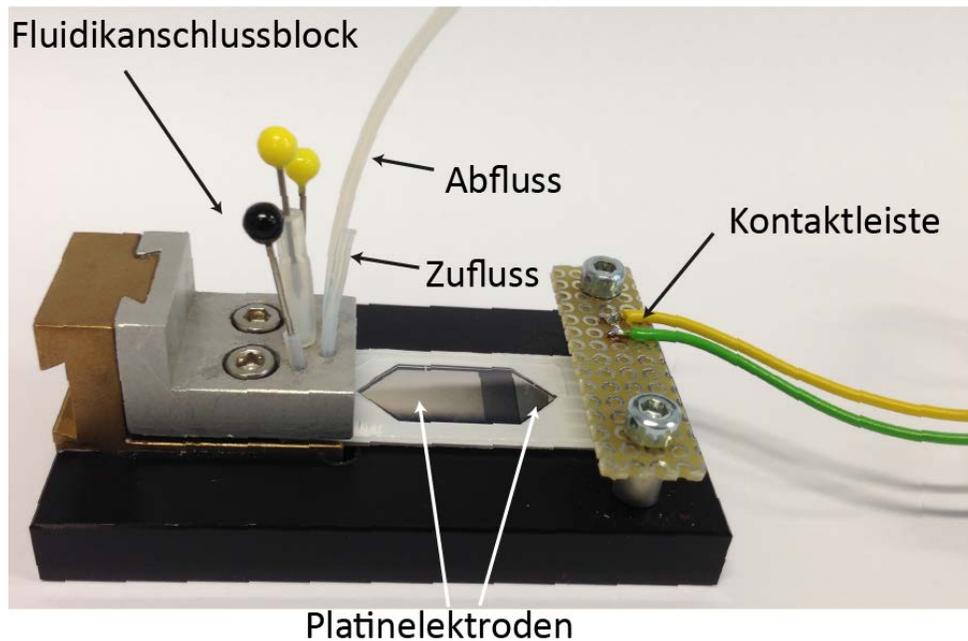


Abbildung 23 Mikrofluidik-Chip in der Halterung des Fluidikanschlußblocks. Die Elektrodenflächen sind voneinander entkoppelt. Durch einen dünnen Platinstreifen sind die Kontaktflächen, die durch eine Kontaktleiste mit dem Potentiostaten elektrisch kontaktiert werden können, mit den Elektrodenflächen verbunden.

Zum Beladen des Mikrofluidik-Chips wurde zunächst der PBS-Waschpuffer mit einer Spritze aufgezogen. Es wurde dabei darauf geachtet möglichst keine Luftblasen aufzuziehen bzw. in der Spritze zurückzulassen. Über eine Luer-Lock-Adapter angehängte HPLC-Kapillare und einem Silikondichtungsschlauch wurde die Spritze mit den HPLC-Kapillaren des Fluidikanschlußblocks verbunden. Vorsichtig wurde die gepufferte Lösung in den Mikrofluidik-Chip gedrückt bis die Reaktionskammer und alle Mikrokanäle mit der Lösung gefüllt waren. Durch Abdichten der Abflusskapillare mit einer Stecknadel wurde ein Flüssigkeitsrückfluss durch den Druckverlust verhindert. Über die Software Aftermath wurde das Messprotokoll erstellt, bei dem ein kleiner konstanter Strom von 50 nA gewählt und die sich einstellende Potentialdifferenz des gepufferten Mediums gemessen wurde. Anschließend wurde in gleicher Weise die Zellsuspension von *S. oneidensis* im PBS-MEC-Anodenmedium mit einer OD_{600} von 0,2 in den Mikrofluidik-Chip eingeführt und dasselbe Protokoll für 120 min angewandt. In Abbildung 24 sind die Potentialdifferenzen des PBS-Waschpuffers und von *S. oneidensis* in PBS-MEC-

Anodenmedium (Tabelle 2-7) bei 50 nA dargestellt. Die Testmessung mit *S. oneidensis* im PBS-MFC-Anodenmedium zeigt zunächst einen Potentialanstieg bis 150 mV. Nach ca. 20 min beginnt das Potential langsam aber stetig zu sinken. Nach bereits 80 min wird ein negatives Potential erreicht, das sich bis zum Schluss der Messung bei ca. -60 mV einpendelt. Das abnehmende Potential ergibt sich vermutlich daraus, dass die exoelektrogenen Organismen, nach einer Anpassungsphase oder nach dem Verbrauch von eventuellen Rückständen an alternativen Elektronenakzeptoren, ihre Elektronen an die Anode abgeben und somit die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden herabgesetzt wird. Die Kontrollmessung mit dem PBS-Waschpuffer wurde nur solange verfolgt bis das Potential eine konstante Steigung hatte. Daher wurde die Messung nach bereits 25 min beendet.

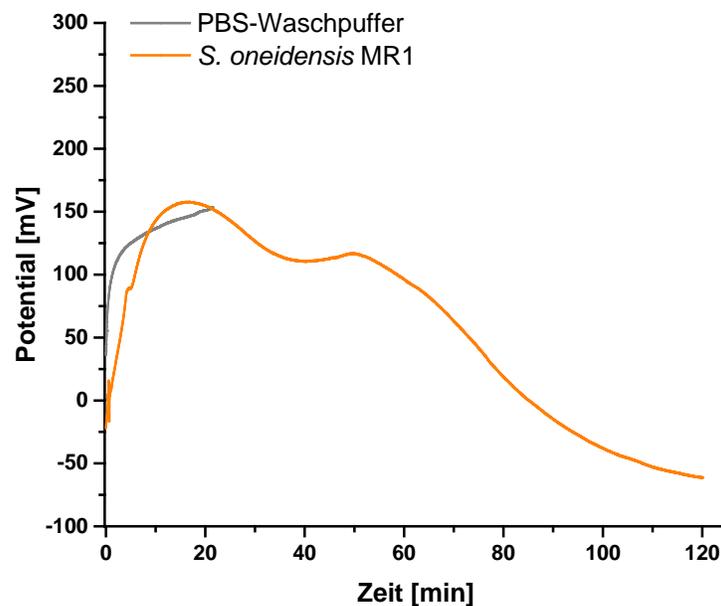


Abbildung 24 Galvanostatische Messung des PBS-Waschpuffers und von *S. oneidensis* bei 50 nA in den Mikrofluidik-Chips der ersten Generation im 2-Elektroden-Messaufbau.

Um die Elektronenflussrate im Vergleich zum ersten Mikrofluidik-Chip zu verbessern wurde eine zweite Generation des Mikrofluidik-Chips entwickelt. Dieser stellte nun eine größere Anodenfläche zur Verfügung. Hierbei betrug die Anodenfläche $105,75 \text{ mm}^2$, die Kathodenfläche wurde auf $20,45 \text{ mm}^2$ reduziert (Abbildung 9 B).

Für die Versuche mit dem neuen Chip-Design wurde ein neues Protokoll entwickelt, mit dem man unterschiedliche *S. oneidensis* Stämme und deren Induktionsstatus miteinander vergleichen kann. Die verwendeten Stämme für diese Versuchsreihe waren *S. oneidensis* MR-1 und *S. oneidensis* MtrFAB. Letzterer wurde entweder nicht induziert oder 4 h vor der Ernte mit 1 mM Arabinose induziert.

Wie auch für die erste Chip-Generation wurde hier ebenfalls ein 2-Elektroden-Messaufbau verwendet und ein konstanter Strom von 50 nA eingestellt. Der Chip wurde zunächst mit dem PBS-MEC-Anodenmedium konditioniert, das heißt, das Potential des Mediums wurde solange verfolgt bis der Drift des Potentials sich stabilisiert hatte, folglich linear war. Nach ca. 90 min wurden die Zellen, die zuvor 20 h in PBS-Fumarat-Lactat anaerob vorgezogen wurden, geerntet, gewaschen und anschließend ebenfalls in PBS-MEC-Anodenmedium aufgenommen wurden, mit einer $OD_{600} = 1$ dazugegeben. In Abbildung 25 A sind beispielhaft zwei Messkurven des PBS-MEC-Anodenmediums und die Zugabe von *S. oneidensis* MR-1 dargestellt. Hier ist innerhalb der ersten 90 min zunächst nur das Potential des Mediums zu sehen. Dabei stellte sich erst ab 40 min Laufzeit ein konstanter Drift des gemessenen Potentials ein. Die Zugabe der Zellen ist an dem Potentialabfall im Kurvenverlauf erkennbar. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde für die konstante Verschiebung im Bereich der Messzeit von 40 bis 75 min eine lineare Anpassung vorgenommen. Der so berechnete Drift wurde dann von den Messwerten der jeweiligen Kurve subtrahiert. Der Fit ohne Änderung der Bedingungen ist auch für die Messdauer ab 75 min bis zur Zugabe der Zellen sehr gut, daher kann von einer konstanten Steigung ausgegangen werden. Die resultierenden korrigierten Kurven sind in Abbildung 25 B dargestellt.

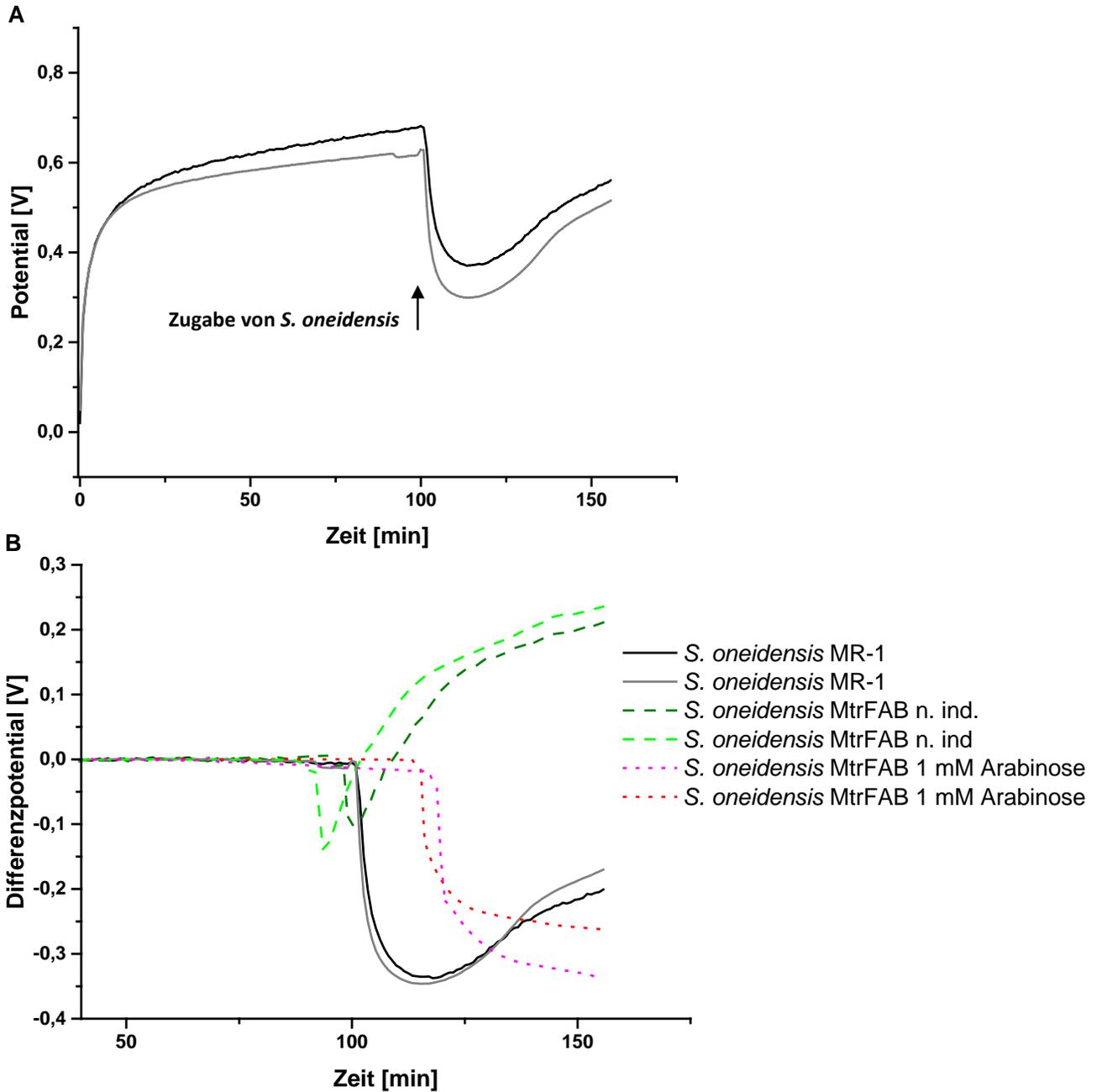


Abbildung 25 A) Galvanostatische Messung bei 50 nA mit den Mikrofluidik-Chips der zweiten Generation im 2-Elektroden-Messaufbau mit *S. oneidensis* MR-1. B) Korrigierte Messkurven mit der Zugabe von *S. oneidensis* MR-1 und *S. oneidensis* MtrFAB, mit und ohne Induktion durch Arabinose, im Duplikat.

Durch die Zugabe von *S. oneidensis* MR-1 Zellen in den Mikrofluidik-Chip, nach ca. 90 min Konditionierung des Mediums, sank das Potential schlagartig um ca. 350 mV nach unten, um sich langsam wieder auf ein mittleres höheres Potential einzustellen. Auch die *S. oneidensis* MtrFAB Zellen, die im Voraus mit 1 mM Arabinose induziert wurden, lösten bei der Zugabe in die Mikrofluidik-Chips eine ähnliche Verschiebung zu einem niedrigeren Potential aus, wie der *S. oneidensis* Wildtyp. Die Zugabe des uninduzierten *S. oneidensis* MtrFAB Stammes hingegen zeigte nur einen kurzen negativen Ausschlag von ca. 120 mV. Innerhalb von 10 min überstieg die Kurve ihr Ausgangspotential, um sich auf einem höheren Potentialniveau zu stabilisieren. Diesen Zellen fehlt, ohne die Induktion mit Arabinose, die Fähigkeit zum extrazellulären Elektronentransfer. Damit verringert ihre Anwesenheit wahrscheinlich die Leitfähigkeit des Mediums, wodurch sich die geänderte Steigung und das sich einstellende höhere Potentialniveau erklären lassen.

Diese Versuche zeigen, dass die Mikrofluidik-Chips sich prinzipiell für die Potentialmessung bei geringen Strömen, wie 50 nA, und den eingesetzten Lösungen eignen könnten. Ebenso konnte mit diesem Aufbau und Messprotokoll zwischen aktiven exoelektrogenen Zellen und unterschiedlichem Induktionsstatus des Arabinosesensorstamm unterschieden werden.

4 Diskussion

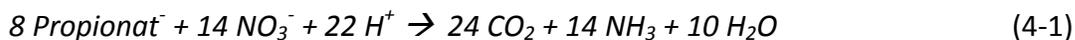
Heutzutage leben wir Menschen in einer Energie-Konsumgesellschaft, die immer mehr Energie benötigt. Um weiterhin in einem solchen Standard leben zu können, bedarf es aber einer stetig wachsenden Forschung und Entwicklung im Bereich der erneuerbaren Energien. Photovoltaik, Windenergie und Biomasse bilden dabei die Pfeiler dieser neuen Technologien und liefern heutzutage insgesamt bis zu 30% des Gesamtstromes in Deutschland (Agentur für Erneuerbare Energien e. V.). Da Wind- und Sonnenenergie allerdings witterungs- und rhythmusabhängige Technologien sind, gewinnt die Energie aus Biomasse auf Grund ihrer kontinuierlichen Betriebsart immer mehr an Bedeutung. Die Biogasproduktion beispielsweise ist ein solcher Prozess, der sich den anaeroben Abbau von anfallenden Forst-, Landwirtschafts- oder Kommunalabfällen zu Nutze macht. Diese bereits sehr lange bekannte Technologie ist jedoch auch anfällig für Störungen, denn der Prozess basiert auf einem ausgewogenem Zusammenwirken unterschiedlicher Mikroorganismengruppen. Aus den Störungen resultiert eine Ansammlung von kurzkettigen Fettsäuren, wie Acetat, Butyrat und Propionat, die zum Umkippen des Fermenters führen können. Um dies zu verhindern und rechtzeitig eingreifen zu können hat sich vor allem die Überwachung des sich schnell ansammelnden Propionats als guter Indikator für Prozessstörungen erwiesen. Der Grund für die schnelle Ansammlung des Propionats unter anaeroben Bedingungen liegt zunächst in der ungünstigen Thermodynamik des fermentativen Propionatabbaus (siehe Gleichung 1-4 und 1-5). Am Modellorganismus *E. coli* K12, dessen natürliches Umfeld ebenfalls hohe Propionatkonzentrationen aufweist, wurde daher im ersten Teil dieser Arbeit der anaerobe Propionatabbauweg über den 2-Methylcitrat-Zyklus genauer erforscht und mögliche Limitierungen sowie bisher unbekannte Regulationsmechanismen am entsprechenden *prp*-Operon untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Bioanoden-basierter Mikrofluidik-Chip in Kooperation mit dem IPHT Jena entwickelt, der mit Hilfe der exoelektrogenen Organismen *S. oneidensis* MR-1 und dem Biosensorstamm *S. oneidensis* MtrFAB (Golitsch *et al.*, 2013) charakterisiert und für die Anwendung optimiert wurde.

4.1 Anaerober Propionatabbau in *E. coli* K12

Propionat ist ein häufig vorkommendes End- oder Nebenprodukt von fermentierenden Mikroorganismen. Dennoch ist der anaerobe Propionatmetabolismus noch nicht sehr genau erforscht. Denn obwohl viele Organismen Propionat verstoffwechseln können, geschieht das in syntrophen Konsortien oder nur unter oxidischen Wachstumsbedingungen. In dieser Arbeit konnte letzteres auch für *E. coli* K12 gezeigt werden. Die Verwendung von Propionat als einzige Kohlenstoff- und Elektronenquelle in einem definierten Minimalmedium führte nur mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu einem Wachstum. Die Zugabe eines alternativen Elektronenakzeptors in Form von 50 mM Nitrat oder 50 mM DMSO führte selbst nach 105 h zu keinem signifikanten Anstieg der Biomassekonzentration (siehe Abbildung 10). Entsprechend veränderte sich auch die Propionatkonzentration im Medium kaum, während die aeroben Kulturen in der beobachteten Zeit das gesamte zur Verfügung stehende Propionat aufgebraucht hatten. Ein möglicher Grund dieser Unfähigkeit ist, dass der 2-Methylcitrat-Zyklus an drei Reaktionsschritten mit dem Citrat-Zyklus verknüpft ist (siehe Abbildung 7), nämlich bei der oxidativen Regeneration des Succinats zu Oxalacetat. Den kritischen Schritt stellt dabei die Oxidation von Succinat zu Fumarat dar, da die Succinatdehydrogenase von *E. coli* Ubichinon abhängig ist. Die Übertragung der Elektronen aus der Succinatoxidation ($E_0' = +33$ mV) erfolgt mittels der Succinatdehydrogenase, die in diesem Fall auch gleichzeitig eine Ubichinonoxidoreduktase ist, auf Ubichinon, welches ein Standardredoxpotential von $E_0' = +113$ mV besitzt (Schirawski and Uden, 1998; Thauer *et al.*, 1977). Diese Ubichinonabhängigkeit hat eine Limitierung der nutzbaren anaeroben Elektronenakzeptoren zur Folge, da viele dieser alternativen Akzeptoren wie TMAO ($E_0' = +130$ mV), Fumarat ($E_0' = +33$ mV) oder DMSO ($E_0' = +160$ mV) ein viel zu niedriges Redoxpotential besitzen, um

Elektronen vom Ubichinonpool beziehen zu können (Brondijk *et al.*, 2002;Styrvold and Strom, 1984;Thauer *et al.*, 1977;Wood, 1981). Für die Reduktion dieser anaeroben Elektronenakzeptoren stellt die Zelle unter sauerstofflimitierenden Wachstumsbedingungen auf ein anderes Chinon mit einem elektronegativeren Redoxpotential um, nämlich Menachinon, welches ein Standardredoxpotential von $E_0' = -74$ mV besitzt (Thauer *et al.*, 1977). Dieses niedrige Redoxpotential reicht aber nicht aus für die Succinatoxidation mittels der *E. coli* eigenen Succinatdehydrogenase. Einige Gram-positive Bakterien, wie *Bacillus subtilis*, sind allerdings in der Lage Succinat zu Fumarat mit Hilfe von Menachinon als Elektronenakzeptor zu oxidieren. Diese besitzen eine membranständige Succinat/Menachinonoxidoreduktase, welche den reversen Elektronentransport (RET) über die Cytoplasmamembran katalysiert und mit Hilfe des Protonengradienten die endergone Reduktion des Menachinons durch Succinat ermöglicht (Schirawski and Uden, 1998). Dennoch sollte Nitrat ($E_0' = +433$ mV) als Elektronenakzeptor auf Grund seines Redoxpotentials ausreichen, um die Succinatoxidation in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen zu katalysieren und folglich den Citrat-Zyklus zu schließen. Eine Propionatoxidation gekoppelt an eine Nitratreduktion ergibt nämlich eine thermodynamisch günstige Reaktion mit einem $\Delta G^{\circ} = -835,5$ kJ/mol. Dieser Wert errechnet sich aus der folgenden Redoxgleichung mit den dazugehörigen Redoxpotentialen aus Thauer *et al.* (1977):



Erst vor einigen Jahren wurden sogar Anreicherungskulturen von Anammox Bakterien beschrieben, die Propionat mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu CO_2 oxidierten. Die Anreicherung erfolgte dabei sogar erst durch die Zugabe der Kohlenstoffquelle. Dennoch ist bei diesen Anammox Bakterien der Propionatabbauweg noch unbekannt, da die Isolierung und Charakterisierung einer Reinkultur bisher nicht möglich war (Güven *et al.*, 2005;Kartal *et al.*, 2007)

Um bei *E. coli* K12 zu gewährleisten, dass genügend Oxalacetat im Citrat-Zyklus bereitgestellt wurde, welches im zweiten Schritt des Propionatabbauweges mit Propionyl-CoA zu 2-Methylcitrat reagiert, wurde in einem weiteren anaeroben Versuchsansatz dem Minimalmedium mit 10 mM Propionat und 50 mM Nitrat zusätzlich 50 mM Glycerin zugefügt

(siehe Abbildung 11). Hierbei zeigte *E. coli* K12 ein geringes Wachstum von OD₆₀₀ von 0,05 auf ca. 0,21 innerhalb von 28 h. Dieses Wachstum war allerdings nur auf den anaeroben Verbrauch von Glycerin zurückzuführen. Die Propionatkonzentration im Medium blieb selbst nach 50 h unverändert. Dieses Ergebnis erlaubt zwar die Aussage, dass der Citrat-Zyklus mit Glycerin und Nitrat als Elektronenakzeptor durchaus durchlaufen wird, aber die Kopplung mit den 2-Methylcitrat-Zyklus noch nicht erfolgt ist (Toya *et al.*, 2012). Dieser scheint einer weiteren möglicherweise globalen Regulation zu unterliegen. Eine mögliche Transkriptionsregulation könnte durch das Zweikomponentensystem ArcAB erfolgen, wie sie auch von vielen Operons des Kohlenstoff-Metabolismus, insbesondere des Citrat-Zyklus, bekannt ist (Alexeeva *et al.*, 2003; Förster and Gescher, 2014; Lynch and Lin, 1996; S. J. Park *et al.*, 1994; Soon Jung Park *et al.*, 1997, 1995). Hierfür könnte die bioinformatische Evidenz für eine ArcA-Bindestelle in der Promotorregion des *prp*-Operons ein erster Hinweis dafür sein (Gerasimova *et al.*, 2003). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein anaerober Wachstumsversuch mit einem *E. coli* K12 Δ *arcA* Stamm durchgeführt (Baba *et al.*, 2006; Förster and Gescher, 2014). Die Abwesenheit des Regulatorgens *arcA* hatte nur eine Verdopplung der optischen Dichte innerhalb von 60 h zur Folge. Die Propionatkonzentration änderte sich allerdings auch nur unwesentlich (siehe Abbildung 12). Wahrscheinlich ist dieser Effekt nicht allein auf die Interaktion des ArcA mit den *prp*-Genen limitiert, sondern die Funktion als globaler Regulator für die Gene und Operons des Citrat-Zyklus (*gltA*, *icdA*, *sdhCDAB*, *sucABCD*, *mdh*, und *lpdA*) spielte hierbei ebenso eine große Rolle (Chao *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Lynch and Lin, 1996; Soon Jung Park *et al.*, 1997; Shen and Gunsalus, 1997). Die bisherigen Ergebnisse mit dem unveränderten Laborstamm *E. coli* K12 suggerieren dennoch, dass das *prp*-Operon nicht nur auf Transkriptionsebene durch Regulatoren wie IHF, PrpR, CRP oder ArcA reguliert wird, sondern dass möglicherweise auch auf posttranskriptioneller Ebene eine Regulation denkbar wäre, was durch die folgenden Experimente unterstützt wird.

4.2 Transkriptomanalysen des *prp*-Operon in *E. coli* K12

Die Wachstumsversuche des *E. coli* K12 Stamms unter anaeroben Bedingungen mit Propionat als alleiniger Kohlenstoff- und Elektronenquelle zeigten keine Funktionalität des *prp*-

Operons unter diesen Bedingungen, woraufhin die Expression bzw. die Transkription der einzelnen Gene unter aeroben und anaeroben Bedingungen genauer untersucht wurde. Als erster Anhaltspunkt diente die Expressionsanalyse mittels RT-PCR (siehe Abbildung 12). Insgesamt zeigen beide Transkriptionsprofile einen Transkriptionsabfall zum Operonende hin. Dieser Effekt lässt sich im Allgemeinen dadurch erklären, dass Gene, die weiter vom Promotor entfernt liegen auch geringere Transkriptionsraten aufweisen. Somit trägt die Anordnung der Gene innerhalb eines Operons ebenfalls zur Transkriptionsregulation bei (Hiroe *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2011).

Nach densitometrischer Auswertung der Bandenintensität der einzelnen Gene des *prp*-Operons relativ zum Referenzgen *rpoA* konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass sich das Transkriptionsprofil unter anaeroben Bedingungen dennoch signifikant vom aeroben Transkriptionsprofil unterscheidet. Vor allem im Hinblick auf das letzte Gen im *prp*-Operon, nämlich *prpE*. Während unter aeroben Bedingungen für *prpE* zwar auch nur ein schwaches Signal sichtbar war, lag das Signal für *prpE* unter anaeroben Bedingungen unterhalb des Signals der Negativkontrolle. Zusätzlich war *prpD* unter anaeroben Bedingungen viel schwächer ausgeprägt. Dieses stufenähnliche anaerobe Transkriptionsprofil innerhalb des *prp*-Genclusters diente als erster Hinweis für eine mögliche zusätzliche Promotorunabhängige Regulation unter diesen Bedingungen.

Dies konnte mit Hilfe einer vollständigen Transkriptomanalyse genauer untersucht und bestätigt werden. In Abbildung 14 sind die Werte der differentiellen Expression der *prp*-Gene und der Gene des Citrat-Zyklus unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Propionat, Glycerin und Nitrat im Vergleich zu den aeroben Wachstumsbedingungen dargestellt. Erwarteter Weise zeigen die Gene des Citrat-Zyklus eine weitgehende Herunterregulierung. Dies ist wahrscheinlich auf den inhibierenden Einfluss des Transkriptionsregulators ArcA unter anaeroben Bedingungen zurückzuführen (Förster and Gescher, 2014; Perrenoud and Sauer, 2005). Am eindrucksvollsten zeigt sich jedoch die Herunterregulierung der *prpBCDE* Gene. Wie bereits in den RT-PCR Experimenten ersichtlich, zeigt auch die Transkriptomanalyse eine auffällige kontinuierliche Herunterregulierung innerhalb des Genclusters von *prpB* über *prpC* und *prpD* bis hin zu *prpE* unter anaeroben Bedingungen. Im Fall von *prpE* beträgt die Differenz

sogar eine fast 40-fache Herunterregulierung. Die zweierlogarithmische Auftragung der normalisierten Expressionen (nRPK) der einzelnen Gene unter den verschiedenen Versuchsbedingungen verdeutlicht nochmal das unterschiedliche Expressionsprofil zwischen den aeroben und anaeroben Proben (Abbildung 14 B). Die aeroben Proben weisen eine relativ einheitliche Expression der *prpBCDE* Gene auf und reagieren auf die Induktion mit Propionat mit einer Expressionserhöhung von Faktor 1,8 bis 3. Bei den anaeroben Proben hingegen ist nur ein eindeutiger Anaerobizitätseffekt erkennbar, der unabhängig von der Anwesenheit des Propionats zu sein scheint. Dieser Effekt äußert sich durch die drastische stufenweise Abnahme der Expression entlang des *prpBCDE*-Genclusters. Ein mögliche Erklärung für diese von 5' nach 3' abnehmende Expression könnte in einer posttranskriptionellen Modifikation der polycistronischen mRNA liegen. Diese könnte durch die Mitwirkung einer Ribonuklease erfolgen, die die mRNA von 3' nach 5' hydrolysieren kann, eine sogenannte 3'-5' Exoribonuklease. Tatsächlich ergab die Untersuchung der Transkriptomdaten unter aeroben und anaeroben Bedingungen auch ein unterschiedliches Transkriptionsprofil bezüglich dieser Ribonukleasen.

4.2.1 3'-5' Exoribonukleasen in *E. coli*

In *E. coli* wurden bisher acht 3'-5' Exoribonukleasen beschrieben, die zur gesamten Exoribonukleaseaktivität in der Zelle beitragen. Diese sind die Polynucleotide Phosphorylase (PNPase), RNase II, RNase D, RNase BN, RNase T, RNase PH, RNase R und die Oligoribonuklease, die wiederum in vier der sechs Superfamilien eingeteilt werden können (Zuo and Deutscher, 2001). Von den acht bekannten 3'-5' Exoribonukleasen zeigten allerdings nur drei eine signifikante geänderte Expression unter anaeroben induzierten Bedingungen im Vergleich zu den entsprechenden aeroben Proben (siehe Tabelle 3-1). Die Exoribonukleasen, deren geänderte Expression ein *p*_{adj}-Wert kleiner als 0,05 besitzen sind RNase II, RNase D und RNase R mit Faktor 4 als höchste Expressionsänderung.

RNase D zeigt unter den betrachteten Bedingungen eine um Faktor 2,2 erhöhte Expression im Vergleich zu den aeroben Wachstumsbedingungen. Diese Exoribonuklease gehört zusammen mit RNase T und der Oligoribonuklease zur Superfamilie der DEDD-Exoribonukleasen, deren

Name sich von den konservierten vier Aminosäureresten in der katalytischen Region dieser Enzyme ableitet (Cudny *et al.*, 1981;Zuo and Deutscher, 2001). Dieses Enzym benötigt zweiwertige Kationen für die hydrolytische Aktivität und ist in der Zelle für die Maturation und den Abbau von tRNA, 5S rRNA und weiteren kurzen stabilen RNAs zuständig (Z. Li *et al.*, 1998;Zuo *et al.*, 2005). Aus der gegebenen Funktion lässt sich somit die Beteiligung der RNase D auf den hydrolytischen Abbau der polycistronischen *prp*-mRNA ausschließen. Die erhöhte Expression des Gens *rnd* lässt sich eher auf Stressbedingungen, durch Kohlenstofflimitierung oder Wachstum mit Minimalmedium zurückführen (Deutscher and Li, 2000).

Interessanter und wahrscheinlicher sind die Enzyme RNase II und RNase R, die beide zur Superfamilie der RNase II-ähnlichen Enzyme gehören. Diese Enzyme zeigen die höchste hydrolytische Aktivität in Anwesenheit eines einwertigen Kations oder Mg^{2+} , wobei ein 5'-Nukleosidmonophosphat abgespalten wird. Die Mitglieder dieser Familie sind weit verbreitet unter den Eubakterien und Eukaryoten, wurden aber interessanterweise, mit Ausnahme des *Halobacterium NRC-1*, kaum in Archaeen entdeckt. RNase II ist prinzipiell sequenzunabhängig und hydrolysiert einzelsträngige RNA, bevorzugt mit einem Poly(A)-Ende. Sobald sich aber das Enzym einer durch Sekundärstrukturen bedingten Doppelstrangregion nähert, blockiert das Enzym bereits sechs bis neun Nukleotide im Voraus und dissoziiert von der RNA (Arraiano *et al.*, 2010;Cannistraro and Kennell, 1999;Spickler and Mackie, 2000). Die Bevorzugung der polyadenylierten Sequenzbereiche erteilt dem Enzym die Funktion als Schutzenzym für spezifische polyadenylierte mRNA, inklusiver aller ribosomaler Proteingene. Durch Entfernung der Erkennungsequenzen verhindert es den Abbau durch andere RNasen (Mohanty and Kushner, 2003). Die Mitwirkung dieser RNase an dem hydrolytischen Abbau der mRNA des *prp*-Operon ist auf Grund der Anwesenheit einer terminalen repetitiven extragenen Palindromsequenz, sogenannte REP-Region, 8 Nukleotide hinter dem Gen *prpE* eher unwahrscheinlich. Diese REP-Regionen fördern nämlich die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die die Aktivität von RNase II blockieren (Gilson *et al.*, 1987;Higgins *et al.*, 1988).

Anders als RNase II, ist RNase R in der Lage auch strukturierte oder gar doppelsträngige RNA Bereiche zu prozessieren (Cheng and Deutscher, 2005). Solche Sekundärstrukturen können

unter anderem durch *Rho*-unabhängige Terminatorsequenzen oder repetitive extragenetische Palindromsequenzen, sogenannte REP-Regionen, gebildet werden (Gilson *et al.*, 1987; Higgins *et al.*, 1988). Voraussetzung für den Verdau solcher doppelsträngiger RNA ist die Anwesenheit eines kurzen einzelsträngigen 3'-Überhangs, an das die RNase R binden kann. Die Prozessierung erfolgt dann auch ohne die Hilfe einer zusätzlichen Helicase, da RNase R sowohl eine RNase als auch eine Helicase Aktivität besitzt (Awano *et al.*, 2010; Cheng and Deutscher, 2005). Auch hier spielt die Polyadenylierung des 3'-Endes eine wichtige Rolle, da es ein bevorzugtes Erkennungssubstrat für das Enzym darstellt (Jose M Andrade *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2009). Das 92 kDa große Protein wird durch das *rnr* Gen kodiert, welches auch unter den Namen *vacB* benannt ist und in anderen Mikroorganismen sogar für deren Pathogenität mitverantwortlich zu sein scheint (Erova *et al.*, 2008; Tobe *et al.*, 1992). In den hier durchgeführten Experimenten zeigte das *rnr* Gen eine um Faktor 4 höhere Expression im Vergleich zu den aeroben Kontrollbedingungen und ist zudem die am höchsten regulierte Exoribonuklease in der Transkriptomanalyse. In der Literatur wurde bereits eine erhöhte Expression unter Stressbedingungen, wie dem Wachstum mit Minimalmedium, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatlimitierungen, Kälteschock oder auch dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase, beschrieben (J M Andrade *et al.*, 2006; Chen and Deutscher, 2005, 2010). Eine Erhöhung der *rnr*-Expression auf Grund anaerober Wachstumsbedingungen wurde bisher noch nicht beschrieben. In diesem Fall könnte aber die Nitratatmung in Kombination mit dem Minimalmedium ebenfalls als Stressfaktor für die erhöhte Expression fungieren. Die eindeutige Hochregulierung unter anaeroben Bedingungen und die Fähigkeit RNA mit Sekundärstrukturen abzubauen zu können führten dazu, RNase R als involvierte RNase im Abbau der mRNA des *prp*-Operons zu identifizieren. Durch die Organisation des *prp*-Operons mit der endständigen REP26-Region, hinter dem letzten Gen *prpE*, die nach Berechnungen mit dem RNAFold Plugin (Vienna Package (Lorenz *et al.*, 2011)) innerhalb der Geneious Software mit hoher Wahrscheinlichkeit sehr starke Sekundärstrukturen ausbildet (Abbildung 26) könnte sich ein möglicher Regulationsmechanismus ableiten.

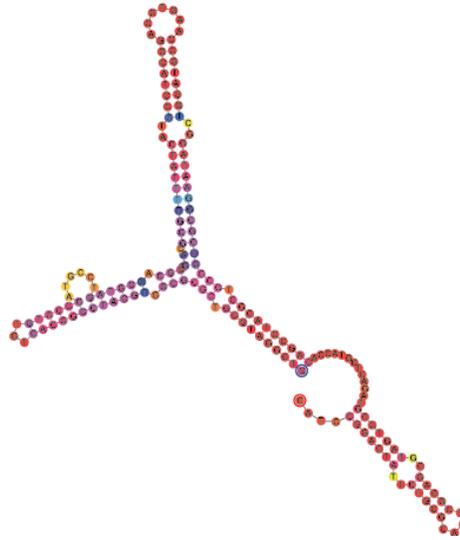


Abbildung 26 Vorhersage der Sekundärstrukturbildung der REP26-Region. Die Faltungswahrscheinlichkeit ist farbkodiert, wobei rot für eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit steht.

Das letzte Gen des Operons, *prpE*, kodiert nämlich für das Enzym Propionyl-CoA-Ligase, welches die Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA katalysiert und somit auch die erste Reaktion im 2-Methylcitrat-Zyklus darstellt. Eine stringenter Kontrolle des Propionatabbaus unter anaeroben Bedingungen scheint demnach einen Selektionsvorteil zu bringen. Zum einen ist die Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA mit dem Verbrauch eines Moleküls ATP pro Propionatmolekül verbunden. Ein rechtzeitiges Eingreifen in den Stoffwechselweg an dieser Stelle könnte den unnötigen Verbrauch der Stoffwechselenergie verhindern. Zum anderen würde dadurch eine Ansammlung von CoA-Ester, hier Propionyl-CoA, verhindert werden, welche eine toxische Wirkung auf die Zelle hat (Matsuishi and Stumpf, 1991; Parke and Ornston, 2004). Denn unter anaeroben Bedingungen ist die Bereitstellung von Oxalacetat, welches für den zweiten Schritt des 2-Methylcitrat-Zyklus benötigt wird, auch nicht gewährleistet. Nicht zuletzt wäre eine Anhäufung von 2-Methylcitrat ebenfalls toxisch für die Zelle, da dieses Molekül die Gluconeogenese durch Inhibition des Enzyms Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) hemmt (Horswill *et al.*, 2001; Rocco and Escalante-Semerena, 2010).

4.3 Versuche mit *E. coli* Δrnr

Um die Beeinflussung des anaeroben Propionatstoffwechsels und der posttranskriptionellen Regulation durch RNase R zu verfolgen, wurden mit dem Stamm *E. coli* Δrnr analoge Versuche zu *E. coli* K12 durchgeführt. Das Gen *rnr* wurde in diesem Stamm durch die Insertion einer Kanamycinresistenzkassette, mit flankierenden FRT-Sequenzen, zwischen dem zweiten und den siebtletzten Codon des Gens, deletiert (*in-frame deletion*). Dadurch wurde sichergestellt, dass das Operon trotz der Deletion noch funktionsfähig blieb (Baba *et al.*, 2006). Die Mutante zeigt allgemein ein besseres Wachstum im Minimalmedium mit Propionat als einziger Kohlenstoffquelle, was sich auch in dessen Verbrauch niederschlägt. Dies ist sowohl für die aerobe als auch die anaerobe Kultivierung der Fall. Der Unterschied zwischen dem Wildtyp *E. coli* und der Mutante unter aeroben Wachstumsbedingungen beläuft sich am Ende der Wachstumsversuche bei 2 mM Propionat (Abbildung 15A). Noch deutlicher unterscheiden sich die beiden Stämme jedoch unter anaeroben Bedingungen. Hier erreichte die Mutante eine OD₆₀₀ von 0,21 innerhalb von 70 h mit einem Verbrauch von 4 mM Propionat. Der Wildtypstamm zeigte hierbei weder Wachstum noch Propionatverbrauch (Abbildung 15B). Wurde allerdings DMSO, anstatt Nitrat, als alternativer Elektronenakzeptor eingesetzt, zeigte selbst die Mutante kein Wachstum. Dies ist wahrscheinlich auf die Limitierung durch die Citrat-Zyklus Intermediate zurückzuführen, da dieser in Abwesenheit von Sauerstoff oder Nitrat in *E. coli* herunterreguliert ist. Ferner wurde die Propionatabnahme unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von 50 mM Glycerin getestet. Durch die *rnr*-Mutation wurde der Propionatverbrauch signifikant gesteigert (Abbildung 15C). Ebenso stieg der Glycerinverbrauch an. Dabei wurde zwar nicht die gesamten zur Verfügung gestellten 50 mM Glycerin verbraucht doch die Mutante verbrauchte innerhalb von 24 h ca. 12 mM Glycerin, während der Wildtyp nur die Hälfte in der doppelten Zeit verstoffwechselte. Die Abwesenheit der RNase R scheint ebenfalls einen positiven Effekt auf den Glycerinverbrauch zu haben. Was im Umkehrschluss bedeutet, dass RNase R unter anaeroben Bedingungen auch Einfluss auf den Glycerinstoffwechsel hat.

Eine weiterer Nachweis für die Beteiligung der RNase R an der posttranskriptionellen Regulation des *prp*-Operons wurde mittels Komplementationsversuchen demonstriert. Hierbei

wurde der Stamm *E. coli* Δrnr mit einem Plasmid transformiert, welches das *rnr* Gen aus *E. coli* K12 hinter einem IPTG induzierbaren Promotor trägt (pMal_*rnr*). Um Plasmid bedingte Wachstumsbeeinträchtigungen auszuschließen wurde zur Kontrolle *E. coli* Δrnr auch mit einem leeren Plasmid pMal_2pE transformiert und gleichermaßen induziert. Die Versuche wurden in Minimalmedium und 10 mM Propionat als einziger Kohlenstoffquelle sowohl aerob als auch mit Nitrat als Elektronenakzeptor durchgeführt. Die Stämme die das komplementäre, überexprimierte *rnr* Gen trugen, zeigten unter beiden Bedingungen ein gehemmtes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollstämmen (siehe Abbildung 16). Die Unfähigkeit des Wachstums mit Propionat spiegelte sich ebenfalls im Propionatverbrauch wieder. Vor allem in Bezug auf das aerobe Wachstum war dieser Versuch ein wichtiger Beweis für die aktive Beteiligung von RNase R, denn der aerobe Propionatmetabolismus unterliegt keiner weiteren Limitierung, wie beispielsweise der anaerobe Herunterregulierung des Citrat-Zyklus durch ArcA.

Alle auf physiologischer Ebene beschriebenen Unterschiede, konnten nach einer Transkriptomanalyse des Stammes *E. coli* Δrnr ebenfalls auf Transkriptomebene bestätigt werden (siehe Abbildung 17). Die normalisierte Genexpression des *prp*-Genclusters der aeroben Proben GO und GPO war erwartungsgemäß gleichmäßig. Allerdings war hier im Vergleich zum Wildtyp ein deutlicher Induktionseffekt durch die Anwesenheit von Propionat erkennbar, der sich durch Hochregulierung der Gene *prpBCDE* um Faktor 89,7 ($\pm 1,3$) bemerkbar macht. Ein ähnliches gleichmäßiges und durch die Induktion hochreguliertes Expressionsprofil zeigten die anaeroben Proben GN und GPN. Hier führte also die Deletion des *rnr* Gens dazu, dass die Gene innerhalb des Genclusters auch unter anaeroben Bedingungen eine gleichmäßige Expression aufzeigen und zusätzlich einem Induktionseffekt unterliegen. Diese Transkriptomergebnisse bestätigen die bisher auf experimenteller Ebene erzielten Ergebnisse und beweisen somit den Einfluss der RNase R auf die Stabilität der *prp*-mRNA unter anaeroben Bedingungen.

4.3.1 Einfluss von RNase R auf weitere Gencluster unter anaeroben Bedingungen

RNase R ist ein Schlüsselenzym in der RNA-Qualitätskontrolle sowie im Abbau polyadenylierter RNA. In einer sehr aktuellen Studie von Pobre und Arraiano (Pobre and Arraiano, 2015) wurde der Effekt der *rnr*-Deletion in *E. coli* unter aeroben Bedingungen untersucht. Dabei beschreiben die Autoren, dass durch die Abwesenheit der RNase R bis zu 202 Gene signifikant beeinflusst wurden. Überraschenderweise, zeigten mehr als 50% dieser Gene eine Herunterregulierung, was daraufhin deutet, dass die RNase R Aktivität nicht gleichbedeutend mit einer Gesamtdestabilisierung der RNA ist. In dieser Arbeit wurde auch auf die Auswirkungen der *rnr*-Deletion auf weitere Operons und Gene neben dem *prp*-Operon unter anaeroben Bedingungen eingegangen. Wie bereits für aerobe Bedingungen beschrieben, ist unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen die Zellmotilität stark unterdrückt (Pobre and Arraiano, 2015). Weiterhin ist auch der Sulfat-, Galctitol- und Glyoxylatstoffwechsel sowie die Expression der Gene der Säuren-Stress-Antwort betroffen. Die Gene des Methionin- und Cystein-Biosynthesewegs sind in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant herunterreguliert (Abbildung 18A). Die Regulation durch RNase R könnte hierbei indirekt über den positiven Regulator CysB erfolgen (van der Ploeg *et al.*, 2001). Das Gen *cysB* ist nämlich in der Deletionsmutante ebenfalls vermindert exprimiert. Bei der Untersuchung des Transkriptoms wurden aber auch einige Gene und Gencluster gefunden, die eine erhöhte Transkription im Vergleich zum Wildtyp-Stamm aufweisen. Dazu zählen die Gene des Stoffwechsels weiterer Kohlenstoffquellen wie Galactitol und Glyoxylat. Nicht zuletzt ist der experimentell bestimmte verbesserte Glycerinverbrauch des *E. coli* Δrnr Stammes im Vergleich zum Wildtyp zu erwähnen. Hierbei zeigten einzelne Gene des Glycerinabbauweges, die nicht in einem Cluster organisiert sind, eine erhöhte Expression. Ein direkter oder indirekter Regulationsmechanismus über Transkriptionsfaktoren kann aus diesen Ergebnissen allerdings nicht eindeutig gefolgert werden. Dennoch deutet diese differenzielle Expression der Gene daraufhin, dass RNase R eine wichtige Rolle in der Regulation des Kohlenstoffverbrauchs unter anaeroben Bedingungen spielt.

4.3.2 Möglicher Einfluss von RNase R auf den Propionatstoffwechsel anderer Bakterien

Wie *E. coli* und *Salmonella sp.* sind auch viele andere Bakterien Propionat in ihrer Umwelt ausgesetzt. Der Abbauweg über den 2-Methylcitrat-Zyklus ist dabei weit verbreitet unter den Bakterien (Grimek and Escalante-Semerena, 2004). Dafür sind mindestens fünf unterschiedliche Strukturelle Varianten des *prp*-Genclusters bekannt. Allerdings sind nur zwei Varianten davon mit einem terminalen *prpE* (Grimek and Escalante-Semerena, 2004). Wie bereits beschrieben wäre die posttranskriptionelle Regulation über eine RNA-Hydrolyse vom 3'-Ende her besonders dann sinnvoll, wenn das erste Protein des Stoffwechselwegs durch das letzte Gen im Gencluster codiert wird. Um herauszufinden, ob dieser beschriebene Regulationsmechanismus ebenfalls in weiteren Propionat verwertenden Mikroorganismen potentiell stattfinden kann, wurde eine blast Suche mit dem *E. coli prp*-Gencluster gegen eine Datenbank mit 1551 individuellen Bakteriengenomen durchgeführt (Davenport *et al.*, 2012). Es wurden insgesamt 44 Mikroorganismen gefunden, die Übereinstimmungen mit allen vier Genen *prpB*, *prpC*, *prpD* und *prpE* zeigten. Doch nur 16 davon besaßen ein zu *E. coli* K12 homologes *prp*-Gencluster (siehe Tabelle xx). Nicht überraschend zählen zu den Kandidaten, inklusive *E. coli* K12, 13 Vertreter zur Familie der Enterobacteriaceae. Darunter finden sich einige *Salmonella*, *Citrobacter*, *Photorhabdus* und *Xenorhabdus* Spezies. Aus der Familie der Gallionellaceae, Oxalobacteraceae und Cytophagaceae wurde jeweils ein Vertreter gefunden. *Adhaeribacter aquaticus*, Vertreter der Cytophagaceae, ist ein erst 2005 entdecktes Gram-negatives Bakterium in Frisch- und Trinkwasser, welches als obligat aerob und Biofilm bildend beschrieben wird (Rickard *et al.*, 2005). *Collimonas fungivorans* ist ein strikt aerobes, Gram-negatives Bodenbakterium, dessen Fähigkeit zum Propionatabbau bereits beschrieben ist (de Boer *et al.*, 2004). Interessant für die Anwendung könnte *Sideroxydans lithotrophicus*, aus der Familie der Gallionellaceae, sein. Dieses Gram-negative Bakterium ist in der Lage extrazelluläres Fe(II) zu oxidieren und somit auch Elektronen von einer Kathode zu beziehen (J. Liu *et al.*, 2012). Bei der genaueren Betrachtung des *prp*-Operons fällt dennoch auf, dass nur *E. coli* K12 spezifisch annotierte REP-Regionen innerhalb und am Ende des Genclusters besitzt. Lediglich *Photorhabdus luminescens* und *Xenorhabdus bovienii* weisen jeweils eine Wiederholungssequenz downstream des *prpE* auf, diese liegen allerdings 631 bzw. 427 Nukleotide davon entfernt. Ob bei diesen Organismen

ebenfalls eine posttranskriptionelle Regulation des *prp*-Operons stattfindet, kann nur vermutet werden.

4.4 Erste Versuche zum Propionatbiosensor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Entwicklung eines Biosensorstammes angestrebt, welcher die Quantifizierung von Propionat im Medium durch die Kopplung an ein elektrisches Signal ermöglichen sollte.

4.4.1 Untersuchung der Promotorstärke unter anaeroben Bedingungen

Zunächst wurde die Promotorstärke des $P_{prpBCDE}$ Promotors unter anaeroben Bedingungen getestet. Lee und Keasling konnten bereits für aerobe Bedingungen in LB-Medium zeigen, dass der Promotor proportional mit Propionat zwischen 0 und 50 mM induzierbar ist (S. K. Lee and Keasling, 2005). In dieser Arbeit wurde das schnell maturierende und hypoxieunempfindliche Fluoreszenzprotein mCherry als Reporter verwendet (Carroll *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2001; Shaner *et al.*, 2004). Der Vektor mit dem *prpR*-Gen, dem Promotor $P_{prpBCDE}$ und dem *mCherry*-Gen wurde in einem *E. coli* K12 Stamm in Minimalmedium mit variierenden Propionatkonzentrationen getestet. Das endogene *prp*-Operon stellte dabei die für die Herstellung von 2-Methylcitrat nötigen Gene bereit. Mit steigender Propionatkonzentration konnte auch unter anaeroben Bedingungen ein steigendes Fluoreszenzsignal gemessen werden. Allerdings zeigten bereits die nicht induzierten Proben ein relativ hohes Fluoreszenzsignal. Dies könnte auf eine „Undichtigkeit“ des Promotors zurückzuführen sein. Diese Basalexpression wurde auch durch Lee und Keasling beobachtet und war abhängig von der zusätzlichen Kohlenstoffquelle im Medium (S. K. Lee and Keasling, 2005). Durch andere unspezifische Stoffwechselwege, wie beispielsweise die Umwandlung von Succinat zu Propionat durch die Enzyme des Operons *sbm-ygfDGH*, könnten Propionat oder Propionyl-CoA in der Zelle entstehen, die zur einer schwachen Expression der Gene führen (Haller *et al.*, 2000). Dennoch ist die Basalexpression auch ein wichtiger Bestandteil der Regulation des *prp*-Operons, da die Expression der Gene *prpBCDE* unter anderem erst eine Aktivierung durch das Zwischenprodukt

2-Methylcitrat benötigt, welches die beiden Enzyme PrpC und PrpE voraussetzt (Sergio Palacios and Escalante-Semerena, 2004).

4.4.2 Eisenreduktionsversuche

Da mit den Fluoreszenzversuchen eine anaerobe Induzierbarkeit des Promotors $P_{prpBCDE}$ gezeigt werden konnte, wurden analog zu *mCherry* die Codon adaptierten Gene *cymA* und *cctA* (*stc*) hinter den Promotor eingefügt. Hiermit sollte im Hinblick auf die Konstruktion eines bioelektrochemischen Sensors die Propionatinduktion mit der Fe(III)-Reduktion gekoppelt werden. Der hierfür verwendete Stamm war *E. coli* Δrnr . Durch die Verlängerung der Elektronentransportkette in Form von CymA und STC waren die mit dem Plasmid pBAD_*prpR_cymA_cctA* transformierten Zellen in der Lage mehr Fe(III) zu reduzieren, als der unmodifizierte Kontrollstamm *E. coli* K12. Dieses erste Ergebnis beweist zunächst die funktionelle Expression von CymA und STC in *E. coli*, auch wenn bereits die rekombinante Expression von CymA allein für die Reduktion des membrangängigen Fe(III)-NTA ausreicht (Gescher *et al.*, 2008). Eine Induktion mit Propionat zeigte nur bei 10 mM eine signifikant verbesserte Eisenreduktion im Vergleich zu den uninduzierten Proben, während die Zellen mit 5 mM Propionat und 0 mM sich kaum unterschieden. Auch hier muss von einer Basalexpression ausgegangen werden, die erst durch höhere Induktorkonzentrationen aktiviert wird. Allgemein kann eine quantitative Aussage bei diesen Plasmid basierten Assays nur schwer getroffen werden, da Plasmide innerhalb der Zelle in zu hohen Kopienzahlen vorliegen könnten. Für zukünftige Arbeiten und quantitativen Aussagen bedarf es der Integration der Transkriptionseinheit *prpR_cymA_cctA* in das Genom von *E. coli* Δrnr .

4.5 Entwicklung eines bioelektrochemischen Mikrofluidik-Chips

Mit Hilfe eines mit dem IPHT Jena entwickelten Mikrofluidik-Chips, sollte die Interaktion zwischen exoelektrogenen Organismen und den Elektrodenflächen in einem kleinen Arbeitsvolumen von 150 μ l ermöglicht werden. Zunächst wurde nach einem biokompatiblen, inerten und elektrisch leitfähigen Material gescreent, welches als Elektrodenfläche verwendet werden sollte. Den Anforderungen der Biokompatibilität und der chemischen Stabilität wurden

dabei vor allem die Gold- und Platinbeschichtungen gerecht (Qian *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010). Bei den Versuchen mit den beiden Materialschichten in einer Dreikammer-MEC stellte sich die Platinbeschichtung als geeigneteres Material heraus, da hier eine Stromdichte von $2,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht wurde, während mit der Goldelektrode kein Strom gemessen wurde. Obwohl Gold als Elektrodenmaterial bereits Verwendung findet, konnte in dieser Arbeit keine Interaktion zwischen *S. oneidensis* und der Oberfläche festgestellt werden. Eine mögliche Ursache könnte die glatte Oberfläche des Materials darstellen, die eine Anhaftung oder Biofilmbildung der Bakterien erschwert (Crittenden *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010). Eine Steigerung der Stromdichte um Faktor 8 konnte bei der Platinschicht durch die Zugabe eines exogenen Redox-Shuttles, AQDS, erreicht werden. Auch hier könnte die glatte Oberfläche eine Limitierung in der Anodeninteraktion darstellen, die durch Redox-Shuttles gut überwunden werden kann. Ein Vergleich der mit der Platinelektrode erzielten Stromdichte mit der Literatur ist hierbei schwierig, da die Protokolle der elektrochemischen Experimente, sowie die Elektrodenmaterialien, elektrochemischen Aufbauten, Medien und Substrate variieren.

Aufbauend auf den Ergebnissen des Materialscreenings wurde eine Mikrofluidik-Plattform mit zwei voneinander entkoppelten Platinschichten als Elektrodenflächen, die über externe Kontaktflächen mittels einer Kontaktleiste mit einem Potentiostaten verbunden werden können, entwickelt. Mit diesen Mikrofluidik-Chips wurde ein vorläufiges Protokoll entwickelt, das eine schnelle Antwort auf eine Änderung der Zusammensetzung des Elektrolyten, also durch die Zugabe von Zellen, lieferte. Für eine Chronopotentiometrie bei einem konstanten angelegten Strom von 50 nA bot sich ein 2-Elektroden-Messaufbau an. Mit diesem Messprotokoll konnte gezeigt werden, dass Zellen, die in der Lage sind Elektronen auf eine Anode zu übertragen, einen Potentialsprung auf ein niedrigeres Potential auslösen. Der Potentialsprung erfolgte sowohl bei *S. oneidensis* MR-1 als auch beim induzierten *S. oneidensis* MtrFAB Stamm. Diese exoelektrogenen Zellen senken wahrscheinlich die gemessene Zellspannung, indem sie aktiv Elektronen auf die Anode übertragen. Zellen, wie uninduzierte *S. oneidensis* MtrFAB, besitzen keine äußeren Membrancytochrome mehr, sodass eine Übertragung der respiratorischen Elektronen auf die Zelloberfläche entfällt. Diese Zellen geben

keine Elektronen an die Anode ab und führen bei der Zugabe in den Mikrofluidik-Chip nur zu einem kleinen negativen Ausschlag, der sich nach kurzer Zeit auf ein viel höheres Potential einstellt. Hierbei scheinen die Zellen die Leitfähigkeit des Mediums zu senken und somit ein höheres Potential zu erzeugen. Diese Versuche mit dem gegebenen Protokoll und Messaufbau liefern erste vielversprechende Ergebnisse, die eine differenzielle messbare Interaktion von eoxelektrogenen Mikroorganismen mit den Mikrofluidik-Chips zeigen. Eine erste wichtige Unterscheidung zwischen induzierten und nicht induzierten *S. oneidensis* MtrFAB konnte hier gezeigt werden. Eine weitere wichtige Voraussetzung für einen guten Biosensor ist zudem auch eine kurze Messzeit (H. Lee *et al.*, 2015; Webster *et al.*, 2014). Diese betrug bei diesem Messprotokoll 3 h, die aber vor allem im Bereich der Konditionierung des Mediums problemlos verkürzt werden kann. Zudem sollten weitere Induktionsstufen des *S. oneidensis* MtrFAB getestet werden, um eine mögliche Proportionalität in den Potentialsprüngen nachweisen zu können. Für eine Anwendung als MEC-basierter Biosensor sind dennoch weitere Anpassungen und Experimente nötig. Zum einen sollte die Reproduzierbarkeit der Messung verbessert werden, was mit einem höheren angelegten konstanten Strom erreicht werden könnte. Eine elektrochemische Charakterisierung mittels beispielsweise Impedanzspektroskopie könnte weitere Aufschlüsse über Limitierungen des Setups wiedergeben.

5 Ausblick

Das reichliche Vorkommen von Propionat in der Natur macht es zu einer attraktiven und sehr günstigen Kohlenstoffquelle für biotechnologische Anwendungen. Leider ist die Verwertung von Propionat mit einer aeroben Lebensweise verbunden oder verlangt unter anoxischen Bedingungen eine syntrophe Lebensgemeinschaft mit anderen Mikroorganismen. Auch die Nutzung eines anaeroben Elektronenakzeptors scheint nicht unbedingt dazu zu führen, dass Propionat anaerob verstoffwechselt werden könnte. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über eine zusätzliche posttranskriptionelle Regulation des *prp*-Genclusters im Modellorganismus *E. coli* K12 könnten auch auf weitere Organismen mit ähnlichen Genclustern, die beispielsweise über exoelektrogene Fähigkeiten verfügen, übertragen werden. Biotechnologische Anwendungen, wie die Abwasserreinigung mittels MEC-Technologien, könnten von der anaeroben Degradation von Propionat aus dem Wasser profitieren.

Durch die Deletion des *rnr*-Gens in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das Propionat auch unter anaeroben Bedingungen verwertet wurde und somit der 2-Methylcitrat-Zyklus auch unter diesen Bedingungen funktionsfähig ist. Dies erlaubt zum einen die Nutzung von Propionat als günstige Kohlenstoffquelle für die Erzeugung von Biomasse, sowie für die Herstellung von höherwertigen Basischemikalien. Zum anderen könnte der hier verwendete *E. coli* Δrnr Stamm nun ebenfalls für die Entwicklung eines elektrochemischen Biosensors eingesetzt werden. Durch die genomische Integration der Transkriptionseinheit *prpR_cymA_cctA* in das Genom, sollte der *E. coli* Stamm in der Lage sein mit Hilfe eines Redox-Shuttles wie Methylenblau Elektronen auch auf eine Anode übertragen zu können. Die Induzierbarkeit der Expression der genomisch integrierten Gene *cymA* und *cctA* sollte allerdings zunächst mittels eines Eisenreduktionsassays überprüft werden.

Der in dieser Arbeit mit dem IPHT Jena entwickelte Mikrofluidik-Chip konnte in ersten vorläufigen Versuchen erfolgreich für chronopotentiometrische Messungen mit *S. oneidensis* MR-1 und dem mit Arabinose induzierbaren Stamm *S. oneidensis* MtrFAB eingesetzt werden. Dabei konnte zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen unterschieden werden. Weitere Charakterisierungen der Mikrofluidik-Chips sowie Versuche mit unterschiedlichen Induktionsstufen sind dennoch für die Anwendbarkeit als Biosensor notwendig. Eine Kombination des oben beschriebenen Propionat induzierbaren *E. coli* mit den Mikrofluidik-Chips könnte zu einem einfachen und kostengünstigen MEC-basierten Propionatbiosensor führen. Dieser könnte dann beispielsweise für die Überwachung von Biogasprozessen eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ahring, B. K., Sandberg, M. and Angelidaki, I. (1995) Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**(3):, 559–565.
- Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J. and Teixeira de Mattos, M. J. (2003) Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol* **185**(1):, 204–209.
- Amani, T., Nosrati, M. and Mousavi, S. M. (2011) Using enriched cultures for elevation of anaerobic syntrophic interactions between acetogens and methanogens in a high-load continuous digester. *Bioresour. Technol.* **102**(4):, 3716–3723.
- Andrade, J. M., Cairrão, F. and Arraiano, C. M. (2006) RNase R affects gene expression in stationary phase: regulation of *ompA*. *Mol. Microbiol.* **60**(1):, 219–28.
- Andrade, J. M., Hajnsdorf, E., Régnier, P. and Arraiano, C. M. (2009) The poly(A)-dependent degradation pathway of *rpsO* mRNA is primarily mediated by RNase R. *RNA* **15**(2):, 316–26.
- Angelidaki, I. and Ahring, B. K. (1994) Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *ElsevierScience Ltd.* **28**(3):, 727–731.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M. and Stams, A. J. M. (2011) *Biomethanation and its potential. Methods Enzymol.*, **494**: 327-351.
- Appels, L., Lauwers, J., Degreve, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., et al. (2011) Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **15**(9):, 4295–4301.
- Arraiano, C. M., Andrade, J. M., Domingues, S., Guinote, I. B., Malecki, M., Matos, R. G., et al. (2010) The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**(5):, 883–923.

- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. and Thöny-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the *cbb₃* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**(3):, 744–7.
- Awano, N., Rajagopal, V., Arbing, M., Patel, S., Hunt, J., Inouye, M. and Phadtare, S. (2010) *Escherichia coli* RNase R has dual activities, helicase and RNase. *J. Bacteriol.* **192**(5):, 1344–1352.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
- Barkay, T. (1993) Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *DNA Seq.* **59**(9):, 3083–3090.
- Barredo, M. S. and Evison, L. M. (1991) Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at pifferent pH values. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(6):, 1764–1769.
- Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L. and Hunnicutt, D. (2001) MtrC, an outer membrane decahaem c-cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol. Microbiol.* **39**(3):, 722–30.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. I., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M., et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**(5. September):, 1453–1462.
- Boe, K., Steyer, J. P. and Angelidaki, I. (2008) Monitoring and control of the biogas process based on propionate concentration using online VFA measurement. *Water Sci. Technol.* **57**(5):, 661–666.

- Boer, W. de, Leveau, J. H. J., Kowalchuk, G. A., Klein Gunnewiek, P. J. A., Abeln, E. C. A., Figge, M. J., *et al.* (2004) *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(3):, 857–864.
- Bok, F. A. M. De, Plugge, C. M. and Stams, a. J. M. (2004) Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Res.* **38**(6):, 1368–1375.
- Border, P. M., Kierstan, M. P. J. and Plastow, G. S. (1987) Production of propionic acid by mixed bacterial fermentation. In: *Biotechnology Letters.* **9**(12):, 843–848.
- Bousse, L. (1996) Whole cell biosensors. *Sensors Actuators B Chem.* **34**(1–3):, 270–275.
- Bretschger, O., Obratsova, A., Sturm, C. A., Chang, I. S., Gorby, Y. A., Reed, S., *et al.* (2007) Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(21):, 7003–12.
- Brondijk, T. H. C., Fiegen, D., Richardson, D. J. and Cole, J. a. (2002) Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation. *Mol. Microbiol.* **44**(1):, 245–255.
- Bücking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S. and Gescher, J. (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**(2):, 144–51.
- Burns, J. L. and DiChristina, T. J. (2009) Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *phsA* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(16):, 5209–17.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, T. L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**(1):, 421.
- Cannistraro, V. J. and Kennell, D. (1999) The reaction mechanism of ribonuclease II and its interaction with nucleic acid secondary structures. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1433**(1-2):, 170–187.

- Carroll, P., Schreuder, L. J., Muwanguzi-Karugaba, J., Wiles, S., Robertson, B. D., Ripoll, J., *et al.* (2010) Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PLoS One* **5**(3.):
- Chandra, R., Takeuchi, H. and Hasegawa, T. (2012) Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16**(3):, 1462–1476.
- Chang, I. S., Jang, J. K., Gil, G. C., Kim, M., Kim, H. J., Cho, B. W. and Kim, B. H. (2004) Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **19**(6):, 607–613.
- Chao, G., Shen, J., Tseng, C. P., Park, S. J. and Gunsalus, R. P. (1997) Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) expression in *Escherichia coli* by the *arcA* and *fnr* gene products. *J. Bacteriol.* **179**(13):, 4299–4304.
- Chen, C. and Deutscher, M. P. (2005) Elevation of RNase R in response to multiple stress conditions. *J. Biol. Chem.* **280**(41):, 34393–34396.
- Chen, C. and Deutscher, M. P. (2010) RNase R is a highly unstable protein regulated by growth phase and stress. *RNA* **16**, 667–672.
- Cheng, Z. F. and Deutscher, M. P. (2005) An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol. Cell* **17**(2):, 313–318.
- Clark Jr., L. C. and Lyons, C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29.
- Clarke, T. A., Holley, T., Hartshorne, R. S., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Shi, L. and Richardson, D. J. (2008) The role of multihaem cytochromes in the respiration of nitrite in *Escherichia coli* and Fe(III) in *Shewanella oneidensis*. *Biochem. Soc. Trans.* **36**(Pt 5):, 1005–10.

- Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J., Hall, A., White, G. F., Bradley, J., *et al.* (2011) Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**(23):, 9384–9.
- Conrad, R., Klose, M., Claus, P. and Enrich-Prast, A. (2010) Methanogenic pathway, ¹³C isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of two clear-water lakes of Amazonia. *Limnol. Oceanogr.* **55**(2):, 689–702.
- Coursolle, D. and Gralnick, J. A. (2010) Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Mol. Microbiol.* **77**(July):, 995–1008.
- Crittenden, S. R., Sund, C. J. and Sumner, J. J. (2006) Mediating electron transfer from bacteria to a gold electrode via a self-assembled monolayer. *Langmuir* **22**(23):, 9473–6.
- Cudny, H., Zaniwski, R. and Deutscher, M. P. (1981) *Escherichia coli* RNase D. *J. Biol. Chem.* **256**(11):, 5633–5637.
- Cunningham, L., Georgellis, D., Green, J. and Guest, J. R. (1998) Co-regulation of lipoamide dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli*: Characterisation of an ArcA binding site in the *lpd* promoter. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 403–408.
- D'Souza, S. F. (2001) Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16**(6):, 337–353.
- Davenport, C. F., Neugebauer, J., Beckmann, N., Friedrich, B., Kameri, B., Kokott, S., *et al.* (2012) Genometa - A fast and accurate classifier for short metagenomic shotgun reads. *PLoS One* **7**(8):, 1–8.
- Deppenmeier, U. (2002) The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 223–283.
- Deublein, D. and Steinhauser, A. (2008) Biogas from Waste and Renewable Resources. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*

- Deutscher, M. P. and Li, Z. (2000) Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **66**, 67–105.
- Du, Z., Li, H. and Gu, T. (2007) A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* **25**(5):, 464–482.
- Erova, T. E., Kosykh, V. G., Fadl, A. A., Sha, J., Horneman, A. J. and Chopra, A. K. (2008) Cold shock exoribonuclease R (VacB) is involved in *Aeromonas hydrophila* pathogenesis. *J. Bacteriol.* **190**(10):, 3467–3474.
- Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V. (2013) Leitfaden - Biogas Von der Gewinnung zur Nutzung.
- Fonseca, B., Paquete, C., Neto, S., Pacheco, I., Soares, C. and Louro, R. (2013) Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem. J.* **108**, 101–108.
- Förster, A. H. and Gescher, J. (2014) Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**(May):, 16.
- Gao, H., Barua, S., Liang, Y., Wu, L., Dong, Y., Reed, S., et al. (2010) Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microb. Biotechnol.* **3**(4):, 455–466.
- Gerasimova, A. V, Gelfand, M. S., Makeev, V. Y., Mironov, A. A. and Favorov, A. V. (2003) ArcA regulator of Gamma-Proteobacteria : Identification of the Binding Signal and Description of the Regulon. *Biophysics (Oxf)*. **48**(Suppl 1):, 21–25.
- Gescher, J. S., Cordova, C. D. and Spormann, A. M. (2008) Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Mol. Microbiol.* **68**(3):, 706–19.

- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Iii, C. A. H., Smith, H. O. and America, N. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**(5):, 12–16.
- Gil, G. C., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, M., Jang, J. K., Park, H. S. and Kim, H. J. (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 327–334.
- Gilson, E., Clément, J. M., Perrin, D. and Hofnung, M. (1987) Palindromic units: a case of highly repetitive DNA sequences in bacteria. *Trends Genet.* **3**(8):, 226–230.
- Girotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G. and Maiolini, E. (2008) Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta* **608**(1):, 2–29.
- Golitsch, F., Bücking, C. and Gescher, J. (2013) Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens. Bioelectron.* **47**, 285–291.
- Gralnick, J. A. and Newman, D. K. (2007) Extracellular respiration. *Mol. Microbiol.* **65**(1):, 1–11.
- Gralnick, J. A., Vali, H., Lies, D. P. and Newman, D. K. (2006) Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**(12):, 4669–74.
- Grimek, T. L. and Escalante-Semerena, J. C. (2004) The *acnD* Genes of *Shewanella oneidensis* and *Vibrio cholerae* encode a new Fe/S-dependent 2-methylcitrate dehydratase enzyme that requires *prpF* function *in vivo*. *J. Bacteriol.* **186**(2):, 454–462.
- Güssow, D. and Clackson, T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**(10):, 4000.
- Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Markus, C., Maas, B., Pas-schoonen, K. Van De, et al. (2005) Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl. Environmental Microbiol.* **71**(2):, 1066–1071.

- Guzzo, J., Guzzo, A. and DuBow, M. S. (1992) Characterization of the effects of aluminum on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. *Toxicol. Lett.* **64-65**(C):, 687–693.
- Haller, T., Buckel, T., Rétey, J. and Gerlt, J. A. (2000) Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*. *Biochemistry* **39**(16):, 4622–9.
- Hansen, M. C., Palmer, R. J., Udsen, C., White, D. C., Molin, S., Palmer Jr, R. J., *et al.* (2001) Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology* **147**(Pt 5):, 1383–1391.
- Hartshorne, R. S., Jepson, B. N., Clarke, T. A., Field, S. J., Fredrickson, J., Zachara, J., *et al.* (2007) Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**(7):, 1083–94.
- Higgins, C. F., McLaren, R. S. and Newbury, S. F. (1988) Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? - a review. *Gene* **72**, 3–14.
- Hirrmann, D., Loibner, A. P., Braun, R. and Szolar, O. H. J. (2007) Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere* **67**(6):, 1236–1242.
- Hiroe, A., Tsuge, K., Nomura, C. T., Itaya, M. and Tsuge, T. (2012) Rearrangement of gene order in the *phaCAB* operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(9):, 3177–3184.
- Horswill, A. R., Dudding, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (2001) Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* **276**(22):, 19094–19101.

- Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1997) Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: Two divergently transcribed units comprise the *prp* locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the *prpBCDE* genes constitute an operon. *J. Bacteriol.* **179**(3); 928–940.
- Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1999) *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. *J. Bacteriol.* **181**(18); 5615–5623.
- Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1999) The *prpE* gene of *Salmonella typhimurium* LT2 encodes propionyl-CoA synthetase. *Microbiology* **145**, 1381–8.
- Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (2002) Characterization of the propionyl-CoA synthetase (PrpE) enzyme of *Salmonella enterica*: residue Lys592 is required for propionyl-AMP synthesis. *Biochemistry* **41**(7); 2379–87.
- Houwen, F. P., Plokker, J., Stams, A. J. M. and Zehnder, A. J. B. (1990) Enzymatic evidence for involvement by *Syntrophobacter wolinii*. *Arch. Microbiol. Lett.* **155**, 52 – 55.
- IPCC (2013): Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1–30.
- Jafri, S., Urbanowski, M. L. and Stauffer, G. V. (1995) A mutation in the *rpoA* gene encoding the α subunit of RNA polymerase that affects *metE-metR* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**(3); 524–529.
- Kartal, B., Rattray, J., Niftrik, L. A. van, Vossenberg, J. van de, Schmid, M. C., Webb, R. I., *et al.* (2007) Candidatus '*Anammoxoglobus propionicus*' a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**(1); 39–49.

- Kaspar, H. F. and Wuhrmann, K. (1978) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**(1);, 1–7.
- Kerisit, S., Rosso, K. M., Dupuis, M. and Valiev, M. (2007) Molecular computational investigation of electron-transfer kinetics across cytochrome-iron oxide interfaces. *J. Phys. Chem. C* **111**(30);, 11363–11375.
- Kim, B. H., Chang, I. S., Gil, G. C., Park, H. S. and Kim, H. J. (2003) Novel BOD (Biochemical Oxygen Demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* **25**(7);, 541–545.
- King, J. M. H., DiGrazia, P. M., Appelegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., *et al.* (1990) Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology. *Science.* **249**, 778–781.
- Kloke, A., Rubenwolf, S., Bücking, C., Gescher, J., Kerzenmacher, S., Zengerle, R. and von Stetten, F. (2010) A versatile miniature bioreactor and its application to bioelectrochemistry studies. *Biosens. Bioelectron.* **25**(12);, 2559–65.
- Kosaka, T., Uchiyama, T., Ishii, S. I., Enoki, M., Imachi, H., Kamagata, Y., *et al.* (2006) Reconstruction and regulation of the central catabolic pathway in the thermophilic propionate-oxidizing syntroph *Pelotomaculum thermopropionicum*. *J. Bacteriol.* **188**(1);, 202–210.
- Kouzuma, A., Hashimoto, K. and Watanabe, K. (2012) Roles of siderophore in manganese-oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**(1);, 91–8.
- Kumar, G. G., Sarathi, V. G. S. and Nahm, K. S. (2013) Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* **43**(1);, 461–475.
- Kumlanghan, A., Liu, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P. and Mattiasson, B. (2007) Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter. *Biosens. Bioelectron.* **22**(12);, 2939–2944.

- Lee, H., Yang, W., Wei, X., Fraiwan, A. and Choi, S. (2015) a micro-sized microbial fuel cell based biosensor for fast and sensitive detection of toxic substances in water. *Mems.* 573–576.
- Lee, S. K. and Keasling, J. D. (2005) A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11):, 6856–6862.
- Lee, S. K. and Keasling, J. D. (2008) Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible *pPro* system by conventional and auto-induction methods. *Protein Expr. Purif.* **61**(2):, 197–203.
- Lee, S. K., Newman, J. D. and Keasling, J. D. (2005) Catabolite repression of the propionate catabolic genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* : evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **187**(8):, 2793–2800.
- Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A. (2006) Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta* **568**(1-2):, 200–10.
- Li, Y.-F. and Yu, Z. (2014) Construction and evaluation of a genetic construct for specific detection and measurement of propionate by whole-cell bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **112**(2):, 1–8.
- Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M. P. (1998) 3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(6):, 2856–61.
- Lim, H. N., Lee, Y. and Hussein, R. (2011) Fundamental relationship between operon organization and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(26):, 10626–10631.
- Liu, F., Gu, J., Wang, X., Zhang, X. E. and Deng, J. (2014) Acs is essential for propionate utilization in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**(3):, 272–277. Elsevier Inc.
- Liu, H., Ramnarayanan, R. and Logan, B. E. (2004) Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**(7):, 2281–2285.

- Liu, J., Wang, Z., Belchik, S. M., Edwards, M. J., Liu, C., Kennedy, D. W., et al. (2012) Identification and characterization of MtoA: A decaheme *c*-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1. *Front. Microbiol.* **3**(FEB):, 1–11.
- Liu, Y. and Whitman, W. B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**, 171–189.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., et al. (2006) Critical Review Microbial Fuel Cells : Methodology and Technology. *Am. Chem. Soc.* **40**(17):, 5181–5192.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. and Hofacker, I. L. (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **6**(1):, 26.
- Lorenzo, M. Di, Curtis, T. P., Head, I. M. and Scott, K. (2009) A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters. *Water Res.* **43**(13):, 3145–3154.
- Lovley, D. R., Holmes, D. E. and Nevin, K. P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol.* **49**, 219-86.
- Lovley, D. R. and Malvankar, N. S. (2015) Seeing is believing: Novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function. *Environ. Microbiol.* **17**, 2209–2215.
- Lynch, A. S. and Lin, E. C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli* : characterization of DNA binding at target promoters . *J. Bacteriol.* **178**(21):, 6238–6249.
- Maier, T. M., Myers, J. M. and Myers, C. R. (2003) Identification of the gene encoding the sole physiological fumarate reductase in *J. Basic Microbiol.* **43**, 312 – 327.
- Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K., Tremblay, P.-L., Evans-Lutterodt, K., Nykypanchuk, D., et al. (2015) Structural basis for metallic-like conductivity in microbial nanowires. *MBio* **6**(2):, 1–10.

- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A. and Bond, D. R. (2008) *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(10):, 3968–73.
- Matos, R. G., Barbas, A. and Arraiano, C. M. (2009) RNase R mutants elucidate the catalysis of structured RNA: RNA-binding domains select the RNAs targeted for degradation. *Biochem. J.* **423**(2):, 291–301.
- Matsuishi, T. and Stumpf, D. A. (1991) The effect of malate on propionate mitochondrial toxicity. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46**, 177–184.
- Meyer, T. E., Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., Smet, L. de, Frishman, D., Nealson, K. H., et al. (2004) Identification of 42 possible cytochrome *c* genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *OMICS* **8**(1):, 57–77.
- Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J. M. and Logan, B. E. (2005) Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water Res.* **39**(20):, 4961–4968.
- Min, B. and Logan, B. E. (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**(21):, 5809–5814.
- Mohanty, B. K. and Kushner, S. R. (2003) Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. *Mol. Microbiol.* **50**(2):, 645–658.
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J. M. and Plugge, C. M. (2010) Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**(4):, 489–99.
- Myers, C. R. and Myers, J. M. (1993) Role of menaquinone in the reduction of fumarate, nitrate, iron(III) and manganese(IV) by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**, 215–222.

- Myers, C. R. and Nealson, K. H. (1988) Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with iron and sulfur. *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**(11):, 2727–2732.
- Myers, C. R. and Nealson, K. H. (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science (80-)*. **240**(4857):, 1319–1321.
- Myers, J. M. and Myers, C. R. (2000) Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J. Bacteriol.* **182**(1):, 67–75.
- Myers, J. M. and Myers, C. R. (2003) Overlapping role of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 in the reduction of manganese(IV) oxide. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**(1):, 21–5.
- Nielsen, H., Uellendahl, H. and Ahring, B. K. (2007) Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* **31**(11-12):, 820–830.
- Oh, S. and Logan, B. E. (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* **39**(19):, 4673–4682.
- Palacios, S. and Escalante-Semerena, J. C. (2000) *prpR*, *ntrA*, and *ihf* functions are required for expression of the *prpBCDE* operon, encoding enzymes that catabolize propionate in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *J. Bacteriol.* **182**(4):, 905–10.
- Palacios, S. and Escalante-Semerena, J. C. (2004) 2-Methylcitrate-dependent activation of the propionate catabolic operon (*prpBCDE*) of *Salmonella enterica* by the PrpR protein. *Microbiology* **150**(Pt 11):, 3877–87.
- Park, M., Tsai, S. L. and Chen, W. (2013) Microbial biosensors: engineered microorganisms as the sensing machinery. *Sensors (Basel)*. **13**(5):, 5777–5795.
- Park, S. J., Chao, G. and Gunsalus, R. P. (1997) Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode α -ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A

- synthetase: Roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter. *J. Bacteriol.* **179**(13); 4138–4142.
- Park, S. J., McCabe, J., Turna, J. and Gunsalus, R. P. (1994) Regulation of the citrate synthase (*gltA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the *arcA* gene product. *J. Bacteriol.* **176**(16); 5086–92.
- Park, S. J., Tseng, C. P. and Gunsalus, R. P. (1995) Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: Role of ArcA and Fnr. *Mol. Microbiol.* **15**(3); 473–482.
- Parke, D. and Ornston, L. N. (2004) Toxicity caused by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioester accumulation in mutants of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(5); 2974–2983.
- Perrenoud, A. and Sauer, U. (2005) Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**(9); 3171–3179.
- Pind, P. F., Angelidaki, I. and Ahring, B. K. (2003) A new VFA sensor technique for anaerobic reactor systems. *Biotechnol. Bioeng.* **82**(1); 54–61.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., et al. (2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**(35); 12883–8.
- Pitts, K. E., Dobbin, P. S., Reyes-Ramirez, F., Thomson, A. J., Richardson, D. J. and Seward, H. E. (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**(30); 27758–65.

- Ploeg, J. van der, Eichhorn, E. and Leisinger, T. (2001) Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **176**(1-2);, 1–8.
- Plugge, C. M., Dijkema, C. and Stams, a. J. M. (1993) Acetyl-CoA cleavage pathway in a syntrophic propionate oxidizing bacterium growing on fumarate in the absence of methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**(1);, 71–76.
- Pobre, V. and Arraiano, C. M. (2015) Next generation sequencing analysis reveals that the ribonucleases RNase II, RNase R and PNPase affect bacterial motility and biofilm formation in *E. coli*. *BMC Genomics* **16**, 1–12.
- Prohl, C., Wackwitz, B., Vlad, D. and Uden, G. (1998) Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **170**(1);, 1–7.
- Qian, F., Baum, M., Gu, Q. and Morse, D. E. (2009) A 1.5 μ L microbial fuel cell for on-chip bioelectricity generation. *Lab Chip* **9**(21);, 3076.
- Rabaey, K. and Verstraete, W. (2005) Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* **23**(6);, 291–298.
- Reyes, C., Murphy, J. N. and Saltikov, C. W. (2010) Mutational and gene expression analysis of *mtrDEF*, *omcA* and *mtrCAB* during arsenate and iron reduction in *Shewanella* sp. ANA-3. *Environ. Microbiol.* **12**(7);, 1878–1888.
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K. P., Johnson, J. P., Rotello, V. M. and Lovley, D. R. (2008) Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir* **24**(8);, 4376–9.
- Rickard, A. H., Stead, A. T., O'May, G. A., Lindsay, S., Banner, M., Handley, P. S. and Gilbert, P. (2005) *Adhaeribacter aquaticus* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative isolate from a potable water biofilm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**(2);, 821–829.

- Rieger, C. and Weiland, P. (2006) Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas J.* (4):, 18–20.
- Rocco, C. J. and Escalante-Semerena, J. C. (2010) In *Salmonella enterica*, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis. *J. Bacteriol.* **192**(3):, 771–8.
- Romine, M. F., Carlson, T. S., Norbeck, A. D., McCue, L. A. and Lipton, M. S. (2008) Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(10):, 3257–3265.
- Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. a and Bond, D. R. (2011) Towards electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the *mtr* pathway for reductive metabolism. *PLoS One* **6**(2):, e16649.
- Salmond, C. V, Kroll, R. G. and Booth, I. R. (1984) The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2845–2850.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F and Maniatis, T. (1989). In Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour laboratory, 2nd edition, Cold Spring Harbour, NY, USA. 191
- Schirawski, J. and Uden, G. (1998) Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *Eur. J. Biochem.* **257**(1):, 210–5.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A. M. and Gescher, J. (2009) Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes Mtra and Fcca of *Shewanella oneidensis* Mr-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(24):, 7789–96.
- Schwalb, C., Chapman, S. K. and Reid, G. a. (2003) The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry* **42**(31):, 9491–7.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. a, Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**(12):, 1567–72.

- Shen, J. and Gunsalus, R. P. (1997) Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **26**(02):, 223–236.
- Slater, W. R., Merigh, M., Ricker, N. L., Labib, F., Ferguson, J. F. and Benjamin, M. M. (1990) A microcomputer-based instrumentation system for anaerobic wastewater treatment processes. *Water Res.* **24**(1):, 121–123.
- Snider, R. M., Strycharz-Glaven, S. M., Tsoi, S. D., Erickson, J. S. and Tender, L. M. (2012) Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**(38):, 15467–15472.
- Spickler, C. and Mackie, G. A. (2000) Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *J. Bacteriol.* **182**(9):, 2422–2427.
- Sams, A. J. M., Dijk, J. B. Van, Dijkema, C. and Plugge, C. M. (1993) Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(4):, 1114–1119.
- Sams, A. J. M. and Plugge, C. M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(8):, 568–577.
- Steyer, J.-P., Buffière, P., Rolland, D. and Moletta, R. (1999) Advanced control of anaerobic digestion. *Water Res.* **33**(9):, 2059–2068.
- Stookey, L. L. (1970) Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**(7):, 779–781.
- Stronach, S. M., Rudd, T., Lester, J. N. (1986). Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment. *Springer Berlin Heidelberg*.

- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O. and Gescher, J. (2015) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J.* **9**(8):, 1802–1811.
- Styrvold, O. B. and Strom, A. R. (1984) Dimethylsulphoxide and trimethylamine oxide respiration of *Proteus vulgaris* Evidence for a common terminal reductase. *Arch. Microbiol.* **140**, 74–78.
- Su, L., Jia, W., Hou, C. and Lei, Y. (2011) Microbial biosensors: A review. *Biosens. Bioelectron.* **26**(5):, 1788–1799.
- Sun, M., Zhang, F., Tong, Z. H., Sheng, G. P., Chen, Y. Z., Zhao, Y., et al. (2010) A gold-sputtered carbon paper as an anode for improved electricity generation from a microbial fuel cell inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosens. Bioelectron.* **26**(2):, 338–343.
- Suvorova, I. A., Ravcheev, D. A. and Gelfand, M. S. (2012) Regulation and evolution of malonate and propionate catabolism in proteobacteria. *J. Bacteriol.* **194**(12):, 3234–40.
- Textor, S., Wendisch, V. F., Graaf, A. A. De, Müller, U., Linder, M. I., Linder, D. and Buckel, W. (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch. Microbiol.* **168**(5):, 428–36.
- Thauer, R. K. K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **41**(3):, 100–180.
- Tobe, T., Sasakawa, C., Okada, N., Honma, Y. and Yoshikawa, M. (1992) *vacB*, a novel chromosomal gene required for expression of virulence genes on the large plasmid of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **174**(20):, 6359–6367.
- Toya, Y., Nakahigashi, K., Tomita, M. and Shimizu, K. (2012) Metabolic regulation analysis of wild-type and *arcA* mutant *Escherichia coli* under nitrate conditions using different levels of omics data. *Mol. Biosyst.* **8**(10):, 2593.

- Tront, J. M., Fortner, J. D., Plötze, M., Hughes, J. B. and Puzrin, A. M. (2008) Microbial fuel cell technology for measurement of microbial respiration of lactate as an example of bioremediation amendment. *Biotechnol. Lett.* **30**(8):, 1385–1390.
- Tront, J. M., Fortner, J. D., Plötze, M., Hughes, J. B. and Puzrin, A. M. (2008) Microbial fuel cell biosensor for in situ assessment of microbial activity. *Biosens. Bioelectron.* **24**(4):, 586–590.
- Tsang, A. W., Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1998) Studies of regulation of expression of the propionate (*prpBCDE*) operon provide insights into how *Salmonella typhimurium* LT2 integrates its 1,2-propanediol and propionate catabolic pathways. *J. Bacteriol.* **180**(24):, 6511–8.
- Ullah, M. A., Kim, K.-H., Szulejko, J. E. and Cho, J. (2014) The gas chromatographic determination of volatile fatty acids in wastewater samples: evaluation of experimental biases in direct injection method against thermal desorption method. *Anal. Chim. Acta* **820**, 159–67.
- Uden, G. and Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1320**(3):, 217–234.
- Velasquez-Orta, S. B., Head, I. M., Curtis, T. P., Scott, K., Lloyd, J. R. and Canstein, H. von. (2010) The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(5):, 1373–81.
- Wallrabenstein, C., Hauschild, E. and Schink, B. (1994) Pure culture and cytological properties of *Syntrophobacter wolinii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**(3):, 249–254.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J. and Meng, L. (2009) Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy* **33**(5):, 848–853.
- Ward, A. J., Bruni, E., Lykkegaard, M. K., Feilberg, A., Adamsen, A. P. S., Jensen, A. P. and Poulsen, A. K. (2011) Real time monitoring of a biogas digester with gas chromatography, near-infrared spectroscopy, and membrane-inlet mass spectrometry. *Bioresour. Technol.*

102(5); 4098–4103.

Webster, D. P., TerAvest, M. A., Doud, D. F. R., Chakravorty, A., Holmes, E. C., Radens, C. M., *et al.* (2014) An arsenic-specific biosensor with genetically engineered *Shewanella oneidensis* in a bioelectrochemical system. *Biosens. Bioelectron.* **62**, 320–324.

Wei, J., Liang, P. and Huang, X. (2011) Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* **102**(20); 9335–9344.

Wood, P. M. (1981) The redox potential for dimethyl sulphoxide reduction to dimethyl sulphide Evaluation and biochemical implications. *FEBS Letters.* **124**(1); 11–14.

Zumbusch, P. V, Meyer-Jens, T., Brunner, G. and Markl, H. (1994) On-line monitoring of organic substances with high-pressure liquid chromatography (HPLC) during the anaerobic fermentation of waste-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**(1); 140–146.

Zuo, Y. and Deutscher, M. P. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* **29**(5); 1017–1026.

Zuo, Y., Wang, Y. and Malhotra, A. (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* RNase D, an exoribonuclease involved in structured RNA processing. *Structure* **13**(7); 973–984.

Internetquellen:

Agentur für erneuerbare Energien e.V. (<https://www.unendlich-viel-energie.de/erneuerbare-energie/bioenergie>) aufgerufen am 25.04.2016

Jürgen Paeger, Ökosystem Erde (<http://www.oekosystem-erde.de/html/energie.html>), aufgerufen am 25.04.2016

Anhang

Tabelle S1: Transkriptomdaten der unter anaeroben Bedingungen differenziell exprimierten Gene.

locus ID	gene	annotation	NO3 vs O2		mut vs WT	
			GPO_GPN		GN_AGN	
			log2fc	padj	log2fc	padj
b0199	metD/N	DL-methionine transporter subunit	4,46	7,74E-20	-4,30	3,96E-26
b0198	metI	DL-methionine transporter subunit	3,14	4,26E-19	-4,01	4,46E-40
b0197	metQ	DL-methionine transporter subunit	0,86	1,36E-03	-3,11	8,46E-54
b2942	metK	S-adenosylmethionine synthetase	3,04	9,71E-10	-3,92	7,34E-22
b3828	metR	DNA-binding transcriptional activator; homocysteine-binding	4,75	1,57E-08	-3,94	8,29E-08
b3829	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine S-methyltransferase	2,18	2,16E-12	-5,87	5,51E-122
b3938	metU	DNA-binding transcriptional repressor; S-adenosylmethionine-binding	2,46	7,28E-10	-1,75	2,01E-07
b3939	metB	cystathionine gamma-synthase; PLP-dependent	5,42	6,32E-49	-4,38	3,13E-47
b3940	metM/L	fused aspartokinase II/homoserine dehydrogenase II	4,31	1,66E-53	-3,46	3,51E-54
b3941	metF	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	4,72	6,03E-08	-4,37	1,91E-08
b4013	metA	homoserine O-transsuccinylase	3,32	9,97E-19	-4,75	4,86E-46
b1987	cblI	DNA-binding transcriptional activator for the ssuEADCB and tauABCD operons	1,19	1,40E-01	-2,30	2,15E-04
b0365	tauA	taurine transporter subunit	1,08	3,54E-01	-3,52	2,67E-04
b0366	tauB	taurine transporter subunit	0,69	5,68E-01	-1,88	4,88E-02
b0367	tauC	taurine transporter subunit	-1,10	NA	-1,61	NA
b0368	tauD	taurine dioxygenase; 2-oxoglutarate-dependent	0,28	8,54E-01	-0,54	6,82E-01
b1275	cysB	DNA-binding transcriptional dual regulator; O-acetyl-L-serine-binding	2,27	1,69E-08	-1,67	1,01E-06
b2425	cysP	thiosulfate-binding protein	1,20	2,73E-01	-3,11	1,42E-04
b2424	cysU	sulfate/thiosulfate ABC transporter permease	1,30	2,30E-01	-2,08	2,03E-02
b2423	cysW	sulfate/thiosulfate ABC transporter subunit	1,18	1,98E-01	-1,29	1,06E-01
b2422	cysA	sulfate/thiosulfate transporter subunit	0,80	4,13E-01	-0,96	2,49E-01
b2421	cysM	cysteine synthase B (O-acetylserine sulfhydrylase B)	0,69	1,61E-01	-0,80	4,46E-02
b2752	cysD	sulfate adenyltransferase; subunit 2	1,51	1,67E-01	-2,60	4,09E-03
b2751	cysN	sulfate adenyltransferase; subunit 1	1,20	2,32E-01	-1,76	3,46E-02
b2750	cysC	adenosine 5'-phosphosulfate kinase	1,10	2,70E-01	-1,44	8,84E-02
b0260	mmuP	CP4-6 prophage; predicted S-methylmethionine transporter	6,33	4,25E-48	-5,31	3,89E-51
b3511	hdeD	acid-resistance membrane protein	-0,65	1,89E-01	3,57	7,34E-22
b3510	hdeA	stress response protein acid-resistance protein	-2,42	5,76E-08	3,59	5,25E-24
b3509	hdeB	acid-resistance protein	-1,95	6,39E-06	2,94	9,19E-18
b3508	yhiD	predicted Mg(2+) transport ATPase; inner membrane protein	-1,78	1,77E-02	2,91	1,61E-07
b2096	gatY	D-tagatose 1;6-bisphosphate aldolase 2; catalytic subunit	-5,44	3,40E-79	0,44	1,53E-01
b2095	gatZ	D-tagatose 1;6-bisphosphate aldolase 2; subunit	-4,56	1,02E-57	1,96	3,13E-16
b2094	gatA	galactitol-specific enzyme IIA component of PTS	-4,28	1,14E-47	2,81	8,22E-31
b2093	gatB	galactitol-specific enzyme IIB component of PTS	-4,10	1,57E-24	4,18	2,88E-36
b2092	gatC	galactitol PTS permease - GatC subunit	-0,13	8,46E-01	7,96	1,05E-129
b2091	gatD	galactitol-1-phosphate dehydrogenase; Zn-dependent and NAD(P)-binding	0,06	9,54E-01	8,11	1,05E-77
b2979	glcD	glycolate oxidase subunit; FAD-linked	-4,60	2,97E-19	3,58	4,32E-13
b4468	glcE	glycolate oxidase FAD binding subunit	-4,81	3,86E-13	2,95	5,98E-06
b4467	glcF	glycolate oxidase 4Fe-4S iron-sulfur cluster subunit	-4,71	2,70E-17	1,77	3,17E-04
b2977	glcG	conserved protein	-5,31	3,54E-24	1,25	1,42E-02
b2976	glcB	malate synthase G	-5,08	1,87E-27	1,69	6,31E-05
b2975	glcA	glycolate transporter	-3,44	5,58E-10	0,75	2,42E-01
b2241	glpA	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic); large subunit; FAD/NAD(P)-binding	-5,32	1,97E-30	1,91	1,37E-06
b2242	glpB	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic); membrane anchor subunit	-4,30	2,00E-23	2,47	4,65E-11
b2243	glpC	anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase; C subunit; 4Fe-4S iron-sulfur cluster	-3,74	3,55E-16	3,45	4,55E-16
b2659	cisD	carbon starvation protein	-4,06	1,35E-06	1,87	3,73E-02
b2660	ihgO	L-2-hydroxyglutarate oxidase	-3,55	2,86E-06	0,16	8,81E-01
b2661	gabD	succinate-semialdehyde dehydrogenase I; NADP-dependent	-3,27	1,87E-10	0,72	1,76E-01
b2662	gabT	4-aminobutyrate aminotransferase; PLP-dependent	-3,08	5,18E-11	2,20	3,55E-06

Tabelle S2: Übersicht der Transkriptomdaten des 2-Methylcitrat-Zyklus und des Citrat-Zyklus.

locus ID	gene	annotation	NO3 vs O2		mut vs WT	
			GPO_GPN		GPN_ΔGPN	
			log2fc	padj	log2fc	padj
b0330	<i>prpR</i>	propionate catabolism operon regulatory protein	-1,47	1,47E-01	-1,85	1,10E-01
b0331	<i>prpB</i>	2-methylisocitrate lyase	-2,14	1,01E-05	-0,65	2,89E-01
b0333	<i>prpC</i>	2-methylcitrate synthase	-2,79	7,20E-12	-0,70	1,80E-01
b0334	<i>prpD</i>	2-methylcitrate dehydratase	-4,07	4,54E-23	0,17	7,99E-01
b0335	<i>prpE</i>	propionate--CoA ligase	-5,29	1,15E-42	2,03	1,63E-06
b0114	<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase; decarboxylase component E1; thiamin-binding	-0,16	7,27E-01	0,20	6,53E-01
b0115	<i>aceF</i>	pyruvate dehydrogenase; dihydrolipoyltransacetylase component E2	-1,01	2,44E-04	1,21	1,30E-05
b0116	<i>lpdA</i>	lipoamide dehydrogenase; E3 component is part of three enzyme complexes	-0,78	1,70E-02	0,86	9,05E-03
b0720	<i>gltA</i>	citrate synthase	-2,85	3,71E-21	0,73	4,44E-02
b1276	<i>acnA</i>	aconitate hydratase 1	-0,82	1,40E-04	0,30	2,67E-01
b0118	<i>acnB</i>	bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase	-0,68	4,16E-02	0,40	2,95E-01
b1136	<i>icd</i>	e14 prophage; isocitrate dehydrogenase; specific for NADP	-1,21	9,81E-05	0,41	2,92E-01
b0728	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase; beta subunit	-4,47	3,57E-93	1,13	3,32E-06
b0729	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase; NAD(P)-binding; alpha subunit	-4,98	5,14E-96	1,65	1,80E-10
b0726	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate decarboxylase; thiamin-requiring	-3,46	2,80E-23	1,43	2,05E-04
b0727	<i>sucB</i>	dihydrolipoyltranssuccinase	-4,14	1,18E-41	1,72	2,03E-07
b0721	<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase; membrane subunit; binds cytochrome b556	-1,87	2,46E-04	1,25	2,70E-02
b0722	<i>sdhD</i>	succinate dehydrogenase; membrane subunit; binds cytochrome b556	-2,29	5,17E-06	0,69	2,75E-01
b0723	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase; flavoprotein subunit	-2,59	3,38E-09	1,38	4,70E-03
b0724	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase; FeS subunit	-2,69	1,26E-10	1,00	4,21E-02
b2897	<i>sdhE</i>	flavinator of succinate dehydrogenase	0,47	2,99E-01	-0,22	6,56E-01
b1611	<i>fumC</i>	fumarate hydratase (fumarase C); aerobic Class II	-1,73	1,65E-04	0,94	7,49E-02
b1612	<i>fumA</i>	fumarate hydratase (fumarase A); aerobic Class I	-2,81	9,97E-19	-0,08	8,90E-01
b4122	<i>fumB</i>	anaerobic class I fumarate hydratase (fumarase B)	-0,57	6,08E-01	1,14	2,24E-01
b3236	<i>mdh</i>	malate dehydrogenase; NAD(P)-binding	-3,00	1,28E-24	1,67	7,90E-08

Manuskript

Submitted to Molecular Microbiology

1 Investigation on the anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12

2

3 Francesca M. Simonte¹, Andreas Dötsch³, and Johannes Gescher^{1,2#}

4

5 Department of Applied Biology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute
6 of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany¹

7 Institute for Biological Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology (KIT),
8 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany²

9 Department of Microbiology on Natural and Technical Interfaces, Institute of
10 Functional Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Eggenstein-
11 Leopoldshafen, Germany³

12

13 Running Head: Anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12

14

15 #Address correspondence to Johannes Gescher, Johannes.gescher@kit.edu

16

17 Keywords:

18 Propionate, anaerobic metabolism, posttranscriptional regulation, RNase R

19 **Abstract**

20 Propionate is an abundant carboxylic acid in nature. Microorganisms metabolize
21 propionate aerobically via the 2-methylcitrate pathway. This pathway depends on a
22 series of three reactions in the citric acid cycle that leads to the conversion of succinate
23 to oxaloacetate. Interestingly, the γ -proteobacterium *Escherichia coli* can use propionate
24 as a carbon and electron source under oxic but not under anoxic conditions. The typical
25 downregulation of the citric acid cycle under anoxic conditions is only partially
26 responsible for the inability to use propionate under anoxic conditions since an *arcA*
27 mutant shows very limited growth on propionate. RT-PCR and transcriptomic analysis
28 revealed a posttranscriptional regulation of the *prp*-gene cluster encoding the necessary
29 enzymes for propionate metabolism. The polycistronic mRNA was hydrolyzed in the 3'-5'
30 direction under anoxic conditions. This regulatory strategy is highly constructive because
31 the last gene of the operon encodes the first enzyme of the propionate metabolism.
32 Further analysis revealed that RNase R is involved in the hydrolysis of the *prp*
33 transcripts. Consequently, an *mr*-deletion strain could metabolize propionate under
34 anoxic conditions. To the best of our knowledge, this is the first study describing the
35 influence of RNase R on the anaerobic metabolism of *E. coli*.

36

37

38

39

40 Introduction

41 Propionate is an abundant volatile fatty acid (VFA) in nature. This is at least partly
42 due to the formation of this carboxylic acid as a fermentation end product by a variety of
43 microorganisms. Propionate is used in such applications as biopolymer production
44 (Jiang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010) or as a food preservative. The mechanism through
45 which propionate exerts antimicrobial activity is the uncoupling of the cytoplasmic
46 membrane potential as it enters the cell as a protonated molecule and then dissociates
47 in the cytoplasm (Salmond *et al.*, 1984). Other lines of evidence suggest that the
48 intracellular accumulation of VFA like propionate blocks a number of metabolic
49 pathways and consequently arrests cell growth (Horswill *et al.*, 2001). Enteric bacteria
50 such as *Salmonella spp.* or *Escherichia coli* are exposed to high concentrations of
51 propionate in their environment because it is produced in high quantities by the
52 gastrointestinal microbiota of the mammalian hosts (Border *et al.*, 1987). Prokaryotes
53 have developed several pathways to metabolize this compound in order to use it as a
54 carbon and energy source and potentially overcome its negative effects. For example,
55 *S. enterica* and *E. coli* metabolize propionate via the 2-methylcitrate cycle (Horswill and
56 Escalante-Semerena, 1999; Textor *et al.*, 1997). The *prp*-gene cluster is required for the
57 oxidation of propionate to pyruvate via 2-methylcitrate. The five genes of this cluster are
58 arranged in an operon with 2 divergently transcribed units (Figure 1) (Suvorova *et al.*,
59 2012). The first unit consists of the transcriptional activation regulator gene *prpR*, which
60 encodes a putative member of the σ^{54} dependent regulator family. The second
61 transcriptional unit -consisting of the *prpBCDE* genes - contains the genetic information
62 for propionate degradation (Horswill and Escalante-Semerena, 1997; Tsang *et al.*,

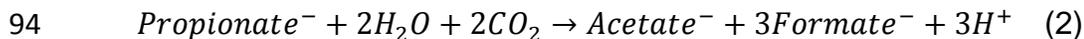
63 1998). The 2-methylcitrate pathway is initiated via the activation of propionate to
64 propionyl-CoA by the propionyl-CoA synthetase (PrpE) (Horswill and Escalante-
65 Semerena, 1999; Horswill and Escalante-Semerena, 2002; Liu *et al.*, 2014; Textor *et*
66 *al.*, 1997). The following condensation of oxaloacetate with propionyl-CoA is catalyzed
67 by the 2-methylcitrate synthase (PrpC) resulting in the production of 2-methylcitrate. An
68 accumulation of the latter compound inhibits cell growth possibly due to the inhibition of
69 the fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), which is a key enzyme of gluconeogenesis
70 (Rocco and Escalante-Semerena, 2010). In the next step, the 2-methylcitrate
71 dehydratase (PrpD) isomerizes 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate, which is further
72 cleaved to pyruvate and succinate by the 2-methylisocitrate lyase (PrpB). The
73 consecutive oxidative regeneration of oxaloacetate from succinate via the citric acid
74 cycle completes the 2-methylcitrate pathway (Textor *et al.*, 1997).

75 The regulation of the *prp*-operon is complex because previous studies with *S.*
76 *enterica* have demonstrated that transcriptional activation of the *prpBCDE* operon
77 requires: (I) the transcription factor PrpR, which needs to be activated by 2-
78 methylcitrate; (II) the σ^{54} factor RpoN; and (III) the global regulation factor IHF
79 (integration host factor) (Horswill and Escalante-Semerena, 1997; Palacios and
80 Escalante-Semerena, 2000; Rocco and Escalante-Semerena, 2010; Tsang *et al.*, 1998).
81 Furthermore, a putative c-AMP receptor protein (CRP)-binding site in the promoter
82 region of the *prp*-operon suggests a role for catabolite repression in the regulation of
83 propionate (Lee *et al.*, 2005). Nevertheless, the propionate-inducible promoter $P_{prpBCDE}$
84 responds at least under oxic conditions proportional to increasing inducer
85 concentrations. It was presented as a cost-effective alternative to IPTG inducible

86 expression systems (Lee and Keasling, 2005, 2008). However, little is known about the
87 anaerobic expression and regulation of the *prp*-operon. Thus far, anaerobic oxidation of
88 propionate is mostly described in secondary fermentative organisms. These processes
89 are energetically unfavorable with standard changes in Gibbs free energy (ΔG°) of +76
90 kJ/mol or 65.3 kJ/mol as illustrated in equations (1) and (2), respectively (Müller *et al.*,
91 2010; Thauer *et al.*, 1977).



93



95

96 Thus, oxidation by propionate degraders is only possible when the concentrations of
97 the products, H_2 and/or formate, are kept low by H_2 and/or formate-depleting organisms
98 such as methanogens (Stams *et al.*, 1993; Stams and Plugge, 2009). Anaerobic
99 propionate-fermenting bacteria commonly degrade propionate via the methylmalonyl-
100 CoA (MMC) pathway (Houwen *et al.*, 1990; Kosaka *et al.*, 2006; Plugge *et al.*, 1993;
101 Wallrabenstein *et al.*, 1994). Within this pathway, electrons are released in three
102 reactions: oxidation of succinate to fumarate, malate to oxaloacetate, and pyruvate to
103 acetyl-CoA. The conversion of succinate to fumarate is the limiting step (Kosaka *et al.*,
104 2006). It is hypothesized that the mechanism that drives succinate oxidation to fumarate
105 during syntrophic growth is possibly similar to the reverse mechanism of energy
106 conservation during fumarate respiration in *Wolinella succinogenes* because electrons
107 released during the oxidation of succinate are shifted to a lower redox potential via

108 reversed electron transport (RET) (Stams *et al.*, 1993; Stams and Plugge, 2009).
109 Although propionate fermentation is energetically unfavorable, an anaerobic respiratory
110 propionate oxidation is with $\Delta G^{\circ'}$ values of -835.5 and -527.7 kJ per mol propionate for
111 nitrate ammonification and DMSO reduction, respectively, favorable. Nevertheless, our
112 results showed that *E. coli* cannot grow anaerobically with propionate using nitrate or
113 DMSO as an electron acceptor. DMSO reduction is menaquinol-dependent. It is
114 possible that the low midpoint redox potential of the menaquinone/menaquinol pair ($E^{\circ'} =$
115 -74 mV) blocks respiratory propionate consumption coupled to DMSO reduction
116 because *E. coli* cannot use an RET-coupled succinate oxidation. Nevertheless, the
117 utilization of nitrate as an electron acceptor should sustain succinate oxidation. Along
118 these lines, Prohl and colleagues could show that the anaerobic glycerol metabolism
119 coupled to nitrate reduction proceeds to 70% completely through the citric acid cycle
120 and is not blocked by the oxidative step from succinate to fumarate (Prohl *et al.*, 1998).

121 The aim of this study was to elucidate why organisms like *E. coli* cannot use
122 propionate as a carbon and electron source under anoxic conditions using nitrate as
123 electron acceptor. Single nucleotide resolution RNA-sequencing revealed that mRNA
124 stability determines whether anaerobic growth with propionate is possible or not. It also
125 showed the pivotal role of RNase R for anaerobic growth of *E. coli* with propionate.

126 **Results**

127 **Propionate metabolism under oxic and anoxic conditions.** Growth of *E. coli* K12
128 was assayed in defined minimal media with 10 mM propionate as the sole carbon and
129 electron source and either oxygen, 50 mM nitrate or 50 mM DMSO as the electron

130 acceptor. The strain grew under aerobic conditions from an OD₆₀₀ of 0.05 to 0.53 within
131 80 h. On the contrary, the cells did not grow within the monitored 100 h under anoxic
132 conditions with NO₃⁻ or DMSO as electron acceptor (Figure 2). Moreover, propionate
133 was not even consumed by the cells under anoxic conditions in the presence of glycerol
134 as the co-substrate (Figure S1). These results suggested that the *prp*-operon might be
135 subjected to a global transcriptional regulatory mechanism that is triggered by the
136 presence or absence of oxygen. Of note, propionate metabolism is dependent on three
137 reactions of the citric acid cycle that regenerate oxaloacetate from succinate. The TCA
138 cycle is usually downregulated under anoxic conditions. This downregulation is
139 dependent on the two component system ArcAB and can be omitted by deletion of the
140 *arcA* gene (Förster and Gescher, 2014). Furthermore, Gerasimova *et al.* (2003) found
141 bioinformatical evidence for an ArcA binding site within the promoter region of the *prp*-
142 gene cluster indicating a putative direct regulation by ArcA. Thus, an ArcA-deficient *E.*
143 *coli* K12 strain was also tested under anoxic conditions with nitrate as the electron
144 acceptor (Figure 1). Nevertheless, this mutant showed only limited growth as the optical
145 density increased within 60 h from an OD₆₀₀ of 0.06 to 0.12.

146 **Transcriptional analysis of the *prp*-operon.** Because the deletion of the *arcA* gene
147 did not lead to significant growth with propionate under nitrate reducing conditions, we
148 searched for other regulatory mechanisms that would inhibit *prp*-gene transcription. RNA
149 isolation of *E. coli* K12 cells incubated under oxic and anoxic conditions in the presence
150 of propionate and subsequent RT-PCR using primer sets for each gene of the *prp*-gene
151 cluster showed that the operon is not uniformly transcribed (Figure 3A). Even though the
152 mRNA of the gene for the regulator PrpR was hardly detectable under oxic conditions,

153 transcripts of the genes *prpB*, *prpC* and *prpD* were quite detectable. The *prpE* band was
154 comparably weak but still above the negative control signal. Interestingly, *prpE* and *prpR*
155 could not be detected under anoxic conditions. The mRNA of *prpD* was only detectable
156 as a weak PCR signal, while *prpB* and *prpC* signals were identified with higher signal
157 strength (Figure 3B). The individual signal intensities were compared using the Image
158 Lab software (BioRad, München, Germany). While this approach will not lead to
159 quantitative data, it visualizes potential differences in *prp*-gene transcription.
160 Interestingly, it seems as if there would be an almost linear decrease in the amount of
161 transcripts from *prpB* to *prpE* under anoxic conditions, which is not detectable under oxic
162 conditions. These results suggested the existence of a further anoxic regulatory element
163 beyond the promoter region.

164 **Single nucleotide resolution RNA-sequencing.** Quantitative data regarding *prp*-
165 gene transcription was achieved using a transcriptome analysis of *E. coli* K12 cultivated
166 under four different conditions. The cells were cultured (I/II) aerobically in M4 minimal
167 media with 50 mM glycerol with and without 10 mM propionate and (III/IV) anaerobically
168 with 50 mM glycerol and 50 mM nitrate with and without 10 mM propionate. The RNA
169 isolation was conducted in the exponential growth phase of the cells.

170 As expected, comparison of the transcriptomes of anaerobically and aerobically
171 grown cells with glycerol and propionate revealed differential gene expression. The
172 transcription of genes in the citric acid cycle showed typical down regulation under
173 anoxic conditions (Figure 4A). Interestingly, the genes of the propionate-degrading
174 pathway also showed a 5- to 38-fold decreased expression level. A closer look at the
175 normalized expression of the individual *prp* genes under the individual growth condition

176 (Figure 4B) reveals the transcriptional differences within the *prp*-operon under anoxic
177 conditions. While aerobically grown cultures showed similar transcription rates of *prpB*,
178 *prpC*, *prpD* and *prpE*, the anoxic samples showed a steep decrease along the operon
179 independent of the induction with propionate. This drastic differential expression towards
180 the 3' end of the mRNA agrees with the RT-PCR data (Figure 3B) and suggests that the
181 *prp*-operon is subjected to posttranscriptional regulation, possibly by a 3'-5'
182 exoribonuclease.

183 **Palindromic elements downstream of *prpE* as possible interaction sites for**
184 **ribonuclease R (RNase R).** The striking decrease of transcripts of the *prp*-gene cluster
185 under anoxic conditions suggest the possible role of RNA hydrolyzing enzymes in the
186 regulation of propionate metabolism. Hence, it was sought for RNases that were
187 specifically upregulated under anoxic conditions. Out of the overall 8 known
188 exoribonucleases that proceed in 3' to 5' direction only three showed a significant
189 differential expression ($p_{adj} < 0.05$). The ribonuclease with the most significant and
190 highest increase in expression under nitrate reducing conditions with glycerol and
191 propionate as substrate compared to oxic conditions was RNase R, encoded by the
192 gene *rnr*. This ribonuclease was up to 4-fold higher expressed under anoxic than oxic
193 conditions (Table S1). The other two ribonucleases (RNase D and RNase II) showed
194 only half of the expression change of RNase R.

195 Interestingly, the exoribonuclease RNase R uses secondary structures of mRNA to
196 localize targets to degrade them due to the enzyme's helicase activity (Awano *et al.*,
197 2010). The genomic structure of the *prp*-operon in *E. coli* K12 consists of two
198 transcriptional units controlled by a divergent promoter region between *prpR* and *prpB*.

199 Further annotated extragenic regions are placed between *prpB* und *prpC* (bp 349,605
200 until 349,969) and downstream of *prpE* (Blattner *et al.*, 1997) (Figure 1). These regions
201 contain repetitive extragenic palindromic elements referred to as REP25 and REP26,
202 respectively. This potentially leads to the formation of secondary mRNA structures. The
203 REP26 element starts at 8 nucleotides downstream of the *prpE* stop-codon (bp 354,599)
204 and ends after 171 nucleotides at position 354,769 of the *E. coli* K12 genome. This
205 region contains 4 REP sequences (Figure S2). REP regions are normally considered to
206 stabilize and protect mRNA from hydrolytic degradation catalyzed by exoribonucleases
207 such as RNase II.

208 This suggests the possible involvement of the RNase R in the posttranscriptional
209 regulation of the *prp*-operon under anoxic conditions. Hence, PrpE the first enzyme of
210 the propionate degradation pathway would be affected most significantly by this
211 regulatory mechanism. Without the activation of propionate to propionyl-CoA by PrpE,
212 propionate consumption and further conversion is strongly impaired.

213

214 **Effect of RNase R deletion.** Experiments with an *E. coli* Δrnr strain were conducted
215 to prove the hypothesis of an involvement of the RNase R in the regulation of the *prp*-
216 operon of *E. coli* K12. Cell growth and propionate consumption were monitored. Under
217 oxic conditions and with propionate as the sole carbon source, the deletion strain
218 showed slightly increased growth compared to the wild type strain (Figure 5A).
219 Intriguingly, the strain also showed differing growth behaviors under anoxic conditions
220 with nitrate as the electron acceptor. Here, the *E. coli* Δrnr strain grew to an optical
221 density of 0.21, and this growth was accompanied by propionate consumption (Figure

222 5B). Interestingly, the strain could not metabolize all propionate that was added to the
223 media. This might be due to a further limitation—perhaps due to a downregulation of the
224 citric acid cycle. Thereafter, the deletion strain was complemented using a pMal
225 plasmid, which allowed IPTG-inducible expression of the *rnr*-gene (pMal_*rnr*). As a
226 control, the *E. coli* Δrnr strain was also transformed with an empty pMal_p2E vector.
227 Expectedly, the vector based expression of the RNase gene rendered the *E. coli* Δrnr
228 strain deficient for growth on and consumption of propionate. The control cells
229 containing an empty vector showed no different growth behavior (Figure 5C). In addition,
230 deletion of the RNase R gene also leads to an anaerobic consumption of propionate in
231 the presence of the co-substrate glycerol (Figure S1). These results nicely correspond to
232 the transcriptomic analysis of the *E. coli* Δrnr strain (Figure 6). The absence of the
233 exoribonuclease stabilizes the mRNA of the *prp*-operon, which can be seen by the more
234 homogeneous transcription of the *prp* genes towards the 3' end of the operon versus
235 wild type strain. Nevertheless, anaerobic growth on propionate was only possible with
236 nitrate as the electron acceptor. The mutant strain *E. coli* Δrnr did not grow with DMSO
237 as the electron acceptor (Figure 7).

238 The collected transcriptome data was also screened for further operons that are
239 directly or indirectly regulated by RNase R. Because the main focus in our work was the
240 anaerobic metabolism of *E. coli* K12, differential expression of genes between oxic and
241 anoxic growth conditions was compared to the anaerobically cultivated *E. coli* Δrnr cells.
242 Thus, we could determine that the genes involved in sulfur metabolism were
243 downregulated in the mutant strain (Table S2). Almost all genes of the methionin
244 biosynthesis pathway (*met* genes), cysteine biosynthesis (*cys* genes) and taurine

245 degradation pathway (*tau* genes) showed significantly decreased expression versus wild
246 type. Hence, it is likely that RNase R indirectly regulates expression probably through a
247 transcriptional regulator like CysB. This is a positive regulator for the *met*, *cys* and *tau*
248 genes and was also downregulated in the mutant strain. Screening for significantly
249 upregulated genes in the mutant strain compared to the wild type strain under anoxic
250 conditions resulted in the detection of four clusters: glycolate and glyoxylate degradation
251 pathway (*glc* genes), galactitol metabolism (*gat* genes), anaerobic glycerol metabolism
252 (*glpABC*), and acid stress response genes (*hde* and *yhiD*) (Table S2). In these cases,
253 the absence of RNase R increased the expression of these genes.

254

255 **Abundance of homologous *prp*-gene clusters.** To see if this additional
256 posttranscriptional regulation mechanism of the *prp*-operon might also be propagated in
257 other propionate-degrading organisms, a *blast* search was conducted with the *E. coli prp*
258 cluster against a database containing the genome of 1551 bacterial species (previously
259 published with the Genometa metagenomics software, Davenport *et al.*, 2012).
260 Homologs to the *prp* cluster that seem to carry a terminal *prpE* were found in 28
261 species. About 57% of these including *E. coli* K12, possess a *prpBCDE* operon setup
262 (Table S3). The remaining 43% mainly degrade propionate via the so-called 2-
263 methylcitrate cycle II using 2-methylcitrate dehydratase (*AcnD*) and aconitate isomerase
264 (*PrpF*) rather than *PrpD* (Brämer and Steinbüchel, 2001; Grimek and Escalante-
265 Semerena, 2004).

266
267

Discussion:

268
269 Propionate is a very abundant fermentation end product of microorganisms. Besides
270 acetate and butyrate, it is one of the three major substances in many prefermenter
271 percolates. Nevertheless, the anaerobic respiratory propionate metabolism is not well
272 studied. We observed that some organisms can use propionate under oxic but not under
273 anoxic conditions. *E. coli* is one example of these microbes. One reason for the
274 observed inability to use propionate under anoxic conditions might be that three
275 reactions of the citric acid cycle are involved in the 2-methylcitrate cycle. The most
276 crucial of these reactions is the oxidation of succinate to fumarate, which is in many
277 cases ubiquinol-dependent. This ubiquinol-dependency will limit the use of anaerobic
278 electron acceptors because many anoxic respiratory pathways require the more
279 negative redox potential of menaquinol to function. Still, nitrate would be an abundant
280 electron acceptor that can be reduced even via the intermediate ubiquinol because the
281 redox pair $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ has an $E_0' = +433$ mV (Brondijk *et al.*, 2002; Thauer *et al.*, 1977).
282 Recently, enrichment cultures of anammox bacteria have been described to oxidize
283 propionate to CO_2 with nitrate as an electron acceptor. These bacteria were even
284 enriched through addition of this carbon source. The mechanism of how these anammox
285 bacteria utilize propionate is still unclear because it is not possible to isolate and
286 cultivate these bacteria into pure cultures so far (Güven *et al.*, 2005; Kartal *et al.*, 2007).

287 One reason for the impaired anaerobic propionate oxidation by *E. coli* K12 might be
288 the occurrence of a putative ArcA binding site within the promoter region of the *prpR*
289 gene (Figure S2) (Gerasimova *et al.*, 2003). Experiments conducted with a mutant
290 strain, lacking the *arcA* gene, showed a slightly improved anaerobic growth with

291 propionate as the sole carbon source. However, within 74 h, only one doubling from
292 OD₆₀₀ 0.06 to 0.12 was reached (Figure 2). The function of ArcA is very likely not limited
293 to its direct influence on *prp*-gene transcription but includes also its function as global
294 regulator, repressing genes encoding enzymes of the citric acid cycle (*gltA*, *icdA*,
295 *sdhCDAB*, *sucABCD*, *mdh*, and *lpdA*) (Chao *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998;
296 Lynch and Lin, 1996; Park *et al.*, 1997; Shen and Gunsalus, 1997).

297 Nevertheless, our experiments suggest that the *prp*-operon of *E. coli* K12 is not
298 solely regulated transcriptionally by regulators like IHF, PrpR, RpoN, CRP or ArcA, but
299 also on the posttranscriptional level. In this study, we determined that at least *E. coli*
300 uses mRNA stability to prevent the anaerobic metabolism of propionate. This is the first
301 study that shows in detail the possible direct impact of RNase R on an anaerobic
302 metabolic process. RNase R belongs to the RNase II family of exoribonucleases. The
303 enzyme is rather unstable in exponentially growing cells while it is stabilized within
304 stationary phase (Chen and Deutscher, 2005). RNase R is a key enzyme in RNA quality
305 control as well as the degradation of polyadenylated RNA. In a very recent study, Pobre
306 and Arraiano (2015) analyzed the effect of RNase R deficiency in *E. coli* under aerobic
307 conditions. The authors observed that deletion of the *mnr* gene significantly affected 202
308 transcripts. Surprisingly, the presence of RNase R increased more than 50% of these
309 202 transcripts indicating that RNase activity is not only accompanied by an overall
310 destabilization of RNA.

311 Other ribonucleases are sensitive to secondary structures, and RNase R uses these
312 structures as signatures for the recognition of targets. The helicase activity of the
313 enzyme helps unfolding of the secondary structures prior to 3'-5' hydrolytic degradation

314 (Awano *et al.*, 2010). The genomic structure of the *prp*-operon in *E. coli* K12 features
315 two REP regions including REP26, which is localized downstream of the *prpE* gene.
316 This region could be a typical target for RNase R, although there is still a general lack of
317 knowledge regarding the precise structural requirements for the secondary structures of
318 RNase R interaction sites (Andrade *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2009; Vincent and
319 Deutscher, 2006). Nevertheless, folding prediction for REP26 shows high probability for
320 very strong secondary RNA structures. Hence, this locus could very well be a potential
321 target for direct interaction (Figure S2). Further evidence comes from the conducted
322 transcriptomic analysis which reveals a typical decrease of transcripts in 5' to 3' direction
323 within the *prp*-gene cluster. Still, although the position of the REP26 locus would nicely
324 correlate with a direct interaction with RNase R, it is so far not possible to assign this
325 region conclusively as the direct target. The transcriptomic results show for both REP
326 regions a strong decrease in transcript abundance which impairs a detection of the
327 definitive end of the transcript. This is most probably a result of the formation of strong
328 secondary structures.

329

330 Up to now, RNase R levels were described to increase dramatically under a variety
331 of conditions including cold shock, entry into stationary phase, growth in minimal media,
332 and starvation for carbon, nitrogen or phosphate (Andrade *et al.*, 2006; Chen and
333 Deutscher, 2005). In this study, an upregulation of the *mnr* gene under anoxic conditions
334 was observed. This upregulation was accompanied with a detectable degradation of the
335 polycistronic *prp*-mRNA. The structure of the operon nicely correlates with the strategy
336 of using 3'-5' hydrolysis as a regulatory mechanism. The last gene of the operon codes

337 for an enzyme that catalyzes the activation of propionate to propionyl-CoA, which is the
338 first step of the pathway. Apparently, it offers a selective advantage to control the
339 propionate metabolism more tightly under anaerobic conditions than aerobic conditions.
340 This might be due to three reasons: (I) the conversion of propionate to propionyl-CoA is
341 accompanied by the use of 1 molecule of ATP per propionate converted. Hence,
342 stopping the pathway already at this stage prevents a futile use of metabolic energy. (II)
343 An accumulation of CoA-esters can have toxic effects on cells (Matsuishi and Stumpf,
344 1991; Parke and Ornston, 2004). Because oxaloacetate, the co-substrate of the second
345 reaction of the cycle, might not be present in high quantities under anoxic conditions, it
346 could be especially beneficial to stop the pathway already at the first reaction in the
347 absence of oxygen. (III) Condensation of propionyl-CoA with oxaloacetate leads to 2-
348 methylcitrate, which is toxic to the cell (Horswill *et al.*, 2001). The risk of a block of the
349 pathway under anoxic conditions due to the inability to oxidize succinate might be so
350 high that evolution selected for a complete block of the pathway rather than for
351 connection with the regulatory machinery for nitrate respiration. As propionate
352 degradation via the 2-methylcitrate cycle is widespread among bacteria, a screen for
353 further organisms carrying the *prp* cluster was conducted. At least five structural
354 variations of *prp*-operons are described thus far for bacteria. Of these, only two have a
355 terminal *prpE* (Grimek and Escalante-Semerena, 2004). This resulted in a hit list of only
356 a few organisms with an *E. coli*-like *prpBCDE* operon setup (Table S3) including some
357 *Citrobacter* species as well as *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species. One can
358 hypothesize that these organisms might also use a posttranscriptional regulation of the
359 propionate metabolism.

360 The here conducted transcriptome analysis reveals that RNase R in *E. coli* also
361 affects other operons besides the *prp*-operon under anoxic conditions. Repression of
362 motility, which was recently observed for oxic conditions (Pobre and Arraiano, 2015)
363 also occurs under anoxic growth conditions. Moreover, the mutation in *E. coli* Δrnr is
364 also affecting sulfate metabolism as well as the galactitol and glyoxylate metabolism.
365 While the methionine and cysteine pathways are downregulated relative to the wild type,
366 gene cluster coding for the metabolism of two further carbon sources, galactitol and
367 glyoxylate, are upregulated in the absence of the RNase R (Table S2). It cannot be
368 definitively concluded whether the regulation mechanism is direct or indirect through
369 transcriptional regulators. However, the differential expression of these genes or
370 clusters, especially the *gat* and *glc* genes, indicates the importance of RNase R for the
371 regulation of carbon source utilization under anaerobic conditions.

372 **Experimental Procedures**

373 **Reagents.** Chemicals and biochemicals were obtained from Sigma-Aldrich, Roth
374 and Promega. Enzymes were purchased from New England Biolabs.

375 **Growth conditions and media.** All strains used in this study are listed in Table 1.
376 *Escherichia coli* Δrnr (JW5741-1) was obtained from the Keio Collection (Baba *et al.*,
377 2006). *Escherichia coli* strains were grown aerobically in LB medium at 37°C or in M4
378 minimal medium under oxic and anoxic conditions. The minimal medium (1.27 mM
379 K_2HPO_4 , 0.73 mM KH_2PO_4 , 5 mM sodium HEPES, 150 mM NaCl, 9 mM $(NH_4)_2SO_4$) was
380 supplemented with 0.1 g l⁻¹ caseinhydrolysate, 1 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$ and trace
381 elements (5 μM $CoCl_2$, 0.2 μM $CuSO_4$, 57 μM H_3BO_3 , 5.4 μM $FeCl_2$, 1.3 μM $MnSO_4$,

382 67.2 μM Na_2EDTA , 3.9 μM Na_2MoO_4 , 1.5 μM Na_2SeO_4 , 5 μM NiCl_2 , and 1 μM ZnSO_4).
383 The pH of the media was adjusted to 7.2. Glycerol (50 mM) and/or propionate (10 mM)
384 served as the carbon and electron sources, respectively. Potassium nitrate (50 mM) was
385 the electron acceptor under anoxic conditions. When necessary the medium was
386 supplemented with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin.

387 **Construction and transformation of the plasmids.** The plasmid pMal_*rnr* was
388 constructed by replacing the *malE* gene on the commercially available plasmid
389 pMal_p2E (New England BioLabs GmbH, Frankfurt a. M., Germany) with the *rnr* gene
390 from the *E. coli* K12. The primers 23 and 24 (Table S4) were used to amplify *rnr* with
391 additional NdeI and BamHI restriction sites for ligation into pMal_p2E, previously
392 digested with NdeI and BamHI. The resulting plasmid pMal_*rnr* and the control plasmid
393 pMal_p2E were transformed into *E. coli* Δrnr by electroporation. Expression of the genes
394 was induced by addition of 50 μM IPTG.

395 **RNA Isolation.** Total RNA for RT-PCR and transcriptome analysis was isolated with
396 the RNeasy Protect Bacteria Mini Kit from Qiagen (Hilden, Germany). The isolated RNA
397 was further purified from genomic DNA contaminations using Ambion DNase I treatment
398 following the manufacturer's instructions (DNA-free, Ambion by Life Technologies,
399 Darmstadt, Germany). RNA samples that were used for transcriptome analysis were
400 further subjected to an mRNA enrichment step using the MICROBExpress Kit from
401 Ambion according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Darmstadt,
402 Germany). RNA yields and sample quality were assessed with a NanoDrop
403 spectrophotometer (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

404 **Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).** The RT-PCR experiments were carried out
405 using RNA that was isolated from *E. coli* K12 cells grown in M4 minimal medium with 50
406 mM glycerol and 10 mM propionate under oxic or anoxic conditions. Cells were
407 harvested in the onset of the exponential growth phase. Culture triplicates were pooled
408 prior to total RNA isolation (see above). The cDNA synthesis was performed using the
409 SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Luckenwalde, Germany) following the
410 manufacturer's instructions. Specific primer pairs for each gene of the *prp*-operon and
411 the reference gene *rpoA* as well as a primer set for the intergenic region between *pgaA*
412 and *ycdT* as negative control were used for analysis. All primer sequences are listed in
413 Table S4. For each primer set, a positive and negative control was conducted using
414 genomic DNA and no-template, respectively. PCR reactions were carried out with 50 ng
415 of DNA as the template and 2 pmol μl^{-1} primer. The reaction was carried out in 28 cycles
416 with an annealing temperature of 58°C and an extension time of 30 s at 72°C. The
417 amplicon length varied from 335 bp to 549 bp. Semiquantitative densitometric analysis
418 of the bands was carried out with the software Image Lab (BioRad, München,
419 Germany).

420 **Single-nucleotide resolution RNA sequencing.** Cells were grown in M4 minimal
421 medium under four different conditions: glycerol (50 mM) or glycerol (50 mM) plus
422 propionate (10 mM) were used carbon source under oxic and anoxic conditions. Two
423 triplicates per condition were pooled prior to RNA isolation. Total RNA was prepared as
424 described above. Strand-specific cDNA libraries were prepared from 50 ng of rRNA-
425 depleted samples following the TruSeq RNA protocol (Illumina, San Diego, CA, USA,
426 without purification) with modification of the 2nd strand cDNA synthesis as previously

427 described (Parkhomchuk *et al.*, 2009). The libraries were prepared using multiplex
428 primers to allow simultaneous sequencing in a single lane. Sequencing was performed
429 on a HiSeq1500 using SBS v3 kits (Illumina) to generate paired-end reads of 2 x 50
430 nucleotides. Cluster detection and base calling were performed using RTA v1.13
431 (Illumina), and the quality of the reads was assessed with CASAVA v1.8.1 (Illumina).
432 Sequencing yielded between 15 and 33 million read pairs for each library with an
433 average of 90% of the bases having a quality of Q30 or better. The data discussed in
434 this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar *et al.*,
435 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE78814.
436 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=epuxeqqyxjgdtmx&acc=GSE78814>)
437 4)

438 **RNA-sequence data analysis.** The sequence data were mapped against the
439 genome sequence of *E. coli* K12 (NCBI accession number NC_000913.3) using Bowtie2
440 (Langmead and Salzberg, 2012). Gene expression was calculated as reads per gene by
441 determining the number of reads that overlapped with the annotated gene loci using
442 HTSeq (Anders *et al.*, 2015). The normalization of gene expression and statistical
443 testing using a negative binomial distribution were performed using the R package
444 DESeq2 (Love *et al.*, 2014).

445 **Identification of *prp* homologs in other species.** The DNA sequence of the
446 genomic region around the *prp*-gene cluster representing chromosomal position 347,406
447 to 354,316 of the K12 reference genome was extracted in FASTA format and aligned
448 using tblastn version 2.2.25+ (Camacho *et al.*, 2009) to the full genomes of 1551
449 individual bacterial species published elsewhere (Genometa dataset v2 "one genome

450 per species”, available for download from <http://genomics1.mh-hannover.de/genometa/>,
451 (Davenport *et al.*, 2012). If the blast search revealed the potential presence of
452 homologous sequences to *prpB*, *C*, *D* and *E*, it was manually analyzed whether the four
453 genes could theoretically be localized in a single operon.

454 **Prediction of RNA secondary structures.** Sequence and repeat regions of interest
455 were analyzed regarding their probability of secondary structure formation by the Vienna
456 package RNAfold tool incorporated in the Geneious software (Lorenz *et al.*, 2011).

457 **Acknowledgements**

458 This work was funded by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
459 within the BioProFi program “ESE-BIOGAS“ (03SF0424A) and the program
460 “BioInterfaces in Technology and Medicine BIF-TM” of the Helmholtz Association. The
461 authors declare that they have no conflict of interest.

462

463 **References**

464 Anders, S., Pyl, P. T. and Huber, W. (2015) HTSeq-A Python framework to work with
465 high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**(2), 166–169.

466 Andrade, J. M., Cairrão, F. and Arraiano, C. M. (2006) RNase R affects gene expression
467 in stationary phase: regulation of *ompA*. *Mol. Microbiol.* **60**(1), 219–228.

468 Andrade, J. M., Hajnsdorf, E., Régnier, P. and Arraiano, C. M. (2009) The poly(A)-
469 dependent degradation pathway of *rpsO* mRNA is primarily mediated by RNase R.
470 *RNA* **15**(2), 316–26.

- 471 Awano, N., Rajagopal, V., Arbing, M., Patel, S., Hunt, J., Inouye, M. and Phadtare, S.
472 (2010) *Escherichia coli* RNase R has dual activities, helicase and RNase. *J.*
473 *Bacteriol.* **192**(5), 1344–1352.
- 474 Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., *et al.* (2006)
475 Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the
476 Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
- 477 Blattner, F., Plunkett, G. I., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The
478 Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**(5.
479 September), 1453–1462.
- 480 Border, P. M., Kierstan, M. P. J. and Plastow, G. S. (1987) Production of propionic acid
481 by mixed bacterial fermentation. In: *Biotechnology Letters* (Intergovernmental Panel
482 on Climate Change, ed.), Vol. 9, 843–848. Cambridge: Cambridge University Press.
- 483 Brämer, C. O. and Steinbüchel, a. (2001) The methylcitric acid pathway in *Ralstonia*
484 *eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. *Microbiology*
485 **147**(Pt 8), 2203–14.
- 486 Brondijk, T. H. C., Fiegen, D., Richardson, D. J. and Cole, J. a. (2002) Roles of NapF,
487 NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in
488 ubiquinol oxidation. *Mol. Microbiol.* **44**(1), 245–255.
- 489 Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and
490 Madden, T. L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*
491 **10**(1), 421.

- 492 Chao, G., Shen, J., Tseng, C. P., Park, S. J. and Gunsalus, R. P. (1997) Aerobic
493 regulation of isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) expression in *Escherichia coli* by
494 the *arcA* and *fnr* gene products. *J. Bacteriol.* **179**(13), 4299–4304.
- 495 Chen, C. and Deutscher, M. P. (2005) Elevation of RNase R in response to multiple
496 stress conditions. *J. Biol. Chem.* **280**(41), 34393–34396.
- 497 Cunningham, L., Georgellis, D., Green, J. and Guest, J. R. (1998) Co-regulation of
498 lipoamide dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase synthesis in
499 *Escherichia coli*: Characterisation of an ArcA binding site in the *lpd* promoter. *FEMS*
500 *Microbiol. Lett.* **169**, 403–408.
- 501 Davenport, C. F., Neugebauer, J., Beckmann, N., Friedrich, B., Kameri, B., Kokott, S., *et*
502 *al.* (2012) Genometa - A fast and accurate classifier for short metagenomic shotgun
503 reads. *PLoS One* **7**(8), 1–8.
- 504 Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A. E. (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI
505 gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* **30**(1),
506 207-210
- 507 Förster, A. H. and Gescher, J. (2014) Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for
508 production of mixed-acid fermentation end products. *Front. Bioeng. Biotechnol.*
509 **2**(May), 16.
- 510 Gerasimova, A. V, Gelfand, M. S., Makeev, V. Y., Mironov, A. A. and Favorov, A. V.
511 (2003) ArcA regulator of Gamma-Proteobacteria : Identification of the binding signal
512 and description of the regulon. *Biophysics (Oxf)*. **48**(Suppl 1), 21-25.

- 513 Grimek, T. L. and Escalante-Semerena, J. C. (2004) The *acnD* genes of *Shewenella*
514 *oneidensis* and *Vibrio cholerae* encode a new Fe/S-dependent 2-methylcitrate
515 dehydratase enzyme that requires *prpF* function *in vivo*. *J. Bacteriol.* **186**(2), 454–
516 462.
- 517 Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Markus, C., Maas, B., Pas-schoonen, K. Van De, *et*
518 *al.* (2005) Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-
519 oxidizing bacteria. *Appl. Environmental Microbiol.* **71**(2), 1066–1071.
- 520 Horswill, A. R., Dudding, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (2001) Studies of
521 propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent
522 inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* **276**(22), 19094–19101.
- 523 Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1997) Propionate catabolism in
524 *Salmonella typhimurium* LT2: Two divergently transcribed units comprise the *prp*
525 locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the *sigma*-54 family of
526 activators, and the *prpBCDE* genes constitute an operon. *J. Bacteriol.* **179**(3), 928–
527 940.
- 528 Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1999) *Salmonella typhimurium* LT2
529 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. *J. Bacteriol.* **181**(18), 5615–
530 5623.
- 531 Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1999) The *prpE* gene of *Salmonella*
532 *typhimurium* LT2 encodes propionyl-CoA synthetase. *Microbiology* **145**, 1381–
533 1388.
- 534 Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (2002) Characterization of the propionyl-

- 535 CoA synthetase (PrpE) enzyme of *Salmonella enterica*: residue Lys592 is required
536 for propionyl-AMP synthesis. *Biochemistry* **41**(7), 2379–2387.
- 537 Houwen, F. P., Plokker, J., Stams, A. J. M. and Zehnder, A. J. B. (1990) Enzymatic
538 evidence for involvement by *Syntrophobacter wolinii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 52
539 – 55.
- 540 Jiang, Y., Hebly, M., Kleerebezem, R., Muyzer, G. and Loosdrecht, M. C. M. van. (2011)
541 Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA)
542 production. *Water Res.* **45**(3), 1309–1321.
- 543 Kartal, B., Rattray, J., Niftrik, L. A. van, Vossenberg, J. van de, Schmid, M. C., Webb, R.
544 I., *et al.* (2007) Candidatus ‘*Anammoxoglobus propionicus*’ a new propionate
545 oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*
546 **30**(1), 39–49.
- 547 Kosaka, T., Uchiyama, T., Ishii, S. I., Enoki, M., Imachi, H., Kamagata, Y., *et al.* (2006)
548 Reconstruction and regulation of the central catabolic pathway in the thermophilic
549 propionate-oxidizing syntroph *Pelotomaculum thermopropionicum*. *J. Bacteriol.*
550 **188**(1), 202–210.
- 551 Langmead, B. and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2.
552 *Nat. Methods* **9**(4), 357–9.
- 553 Lee, S. K. and Keasling, J. D. (2005) A propionate-inducible expression system for
554 enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11), 6856–6862.
- 555 Lee, S. K. and Keasling, J. D. (2008) Heterologous protein production in *Escherichia coli*

- 556 using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction
557 methods. *Protein Expr. Purif.* **61**(2), 197–203.
- 558 Lee, S. K., Newman, J. D. and Keasling, J. D. (2005) Catabolite repression of the
559 propionate catabolic genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: evidence
560 for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **187**(8), 2793–2800.
- 561 Liu, F., Gu, J., Wang, X., Zhang, X. E. and Deng, J. (2014) *Acs* is essential for
562 propionate utilization in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**(3),
563 272–277.
- 564 Lorenz, R., Bernhart, S. H., zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. and
565 Hofacker, I. L. (2011) {ViennaRNA} Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **6**(1), 26.
- 566 Love, M. I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and
567 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**(12), 1–34.
- 568 Lynch, A. S. and Lin, E. C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-
569 component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA
570 binding at target promoters. *J. Bacteriol.* **178**(21), 6238–6249.
- 571 Matos, R. G., Barbas, A. and Arraiano, C. M. (2009) RNase R mutants elucidate the
572 catalysis of structured RNA: RNA-binding domains select the RNAs targeted for
573 degradation. *Biochem. J.* **423**(2), 291–301.
- 574 Matsuishi, T. and Stumpf, D. A. (1991) The Effect of Malate on Propionate Mitochondrial
575 Toxicity. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46**, 177–184.
- 576 Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J. M. and Plugge, C. M. (2010) Syntrophic

- 577 butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction
578 mechanisms. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**(4), 489–499.
- 579 Palacios, S. and Escalante-Semerena, J. C. (2000) *prpR*, *ntrA*, and *ihf* functions are
580 required for expression of the *prpBCDE* operon, encoding enzymes that catabolize
581 propionate in *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *J. Bacteriol.* **182**(4),
582 905–910.
- 583 Park, S. J., Chao, G. and Gunsalus, R. P. (1997) Aerobic regulation of the *sucABCD*
584 genes of *Escherichia coli*, which encode α -ketoglutarate dehydrogenase and
585 succinyl coenzyme A synthetase: Roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB*
586 promoter. *J. Bacteriol.* **179**(13), 4138–4142.
- 587 Parke, D. and Ornston, L. N. (2004) Toxicity caused by hydroxycinnamoyl-coenzyme A
588 thioester accumulation in mutants of *Acinetobacter sp.* strain ADP1. *Appl. Environ.*
589 *Microbiol.* **70**(5), 2974–2983.
- 590 Parkhomchuk, D., Borodina, T., Amstislavskiy, V., Banaru, M., Hallen, L., Krobitsch, S.,
591 *et al.* (2009) Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of
592 complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* **37**(18), 1–7.
- 593 Plugge, C. M., Dijkema, C. and Stams, A. J. M. (1993) Acetyl-CoA cleavage pathway in
594 a syntrophic propionate oxidizing bacterium growing on fumarate in the absence of
595 methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**(1), 71–76.
- 596 Pobre, V. and Arraiano, C. M. (2015) Next generation sequencing analysis reveals that
597 the ribonucleases RNase II, RNase R and PNPase affect bacterial motility and
598 biofilm formation in *E. coli*. *BMC Genomics* **16**, 1–12.

- 599 Prohl, C., Wackwitz, B., Vlad, D. and Unden, G. (1998) Functional citric acid cycle in an
600 *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions.
601 *Arch. Microbiol.* **170**(1), 1–7. doi:10.1007/s002030050608
- 602 Rocco, C. J. and Escalante-Semerena, J. C. (2010) In *Salmonella enterica*, 2-
603 methylcitrate blocks gluconeogenesis. *J. Bacteriol.* **192**(3), 771–8.
- 604 Salmond, C. V, Kroll, R. G. and Booth, I. R. (1984) The effect of food preservatives on
605 pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2845–2850.
- 606 Shen, J. and Gunsalus, R. P. (1997) Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic
607 regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia*
608 *coli*. *Mol. Microbiol.* **26**(02), 223–236.
- 609 Stams, A. J. M., Dijk, J. B. Van, Dijkema, C. and Plugge, C. M. (1993) Growth of
610 syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of
611 methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(4), 1114–1119.
- 612 Stams, A. J. M. and Plugge, C. M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of
613 anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(8), 568–577.
- 614 Suvorova, I. A., Ravcheev, D. A. and Gelfand, M. S. (2012) Regulation and evolution of
615 malonate and propionate catabolism in proteobacteria. *J. Bacteriol.* **194**(12), 3234–
616 3240.
- 617 Textor, S., Wendisch, V. F., Graaf, A. A. De, Müller, U., Linder, M. I., Linder, D. and
618 Buckel, W. (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation
619 of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch. Microbiol.* **168**(5), 428–36.

- 620 Thauer, R. K. K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977) Energy conservation in
621 chemotrophic anaerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **41**(3), 100–180.
- 622 Tsang, A. W., Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C. (1998) Studies of
623 regulation of expression of the ropionate (*prpBCDE*) operon provide insights into
624 how *Salmonella typhimurium* LT2 integrates its pathways. *J. Bacteriol.* **180**(24),
625 6511–6518.
- 626 Vincent, H. A. and Deutscher, M. P. (2006) Substrate recognition and catalysis by the
627 exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.* **281**(40), 29769–29775.
- 628 Wallrabenstein, C., Hauschild, E. and Schink, B. (1994) Pure culture and cytological
629 properties of *Syntrophobacter wolinii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**(3), 249–254.
- 630 Yang, Y. H., Brigham, C. J., Budde, C. F., Boccazzi, P., Willis, L. B., Hassan, M. A., *et*
631 *al.* (2010) Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate
632 (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol.*
633 *Biotechnol.* **87**(6), 2037–2045.

634

635

636

637

638

639

640 **Tables and Table Legends**641 **Table 1** List of strains and plasmids used in this work

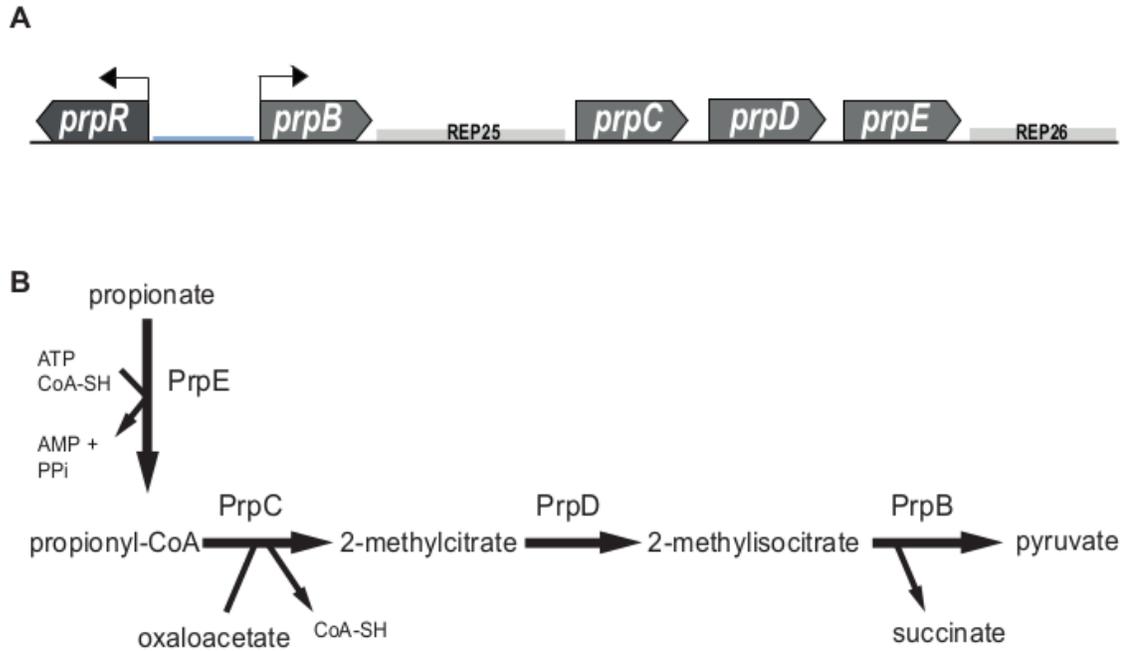
strains and plasmids	genotype	source
strains		
<i>Escherichia coli</i> K12	F ⁻ λ ⁻ ilvG ⁻ rfb-50 rph-1	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
<i>Escherichia coli</i> Δ <i>arcA</i> (JW4364-1)	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> , Δ <i>arcA</i> 726:: <i>kan</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i> Δ <i>rnr</i> (JW5741-1)	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, Δ <i>rnr</i> -729:: <i>kan</i> , <i>hsdR514</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
plasmids		
pMal_2pE	Amp ^R , P _{Lac} , <i>malE</i>	(Riggs, 1992)
pMal_rnr	Amp ^R , P _{Lac} , <i>malE</i> :: <i>rnr</i>	This work

642

643

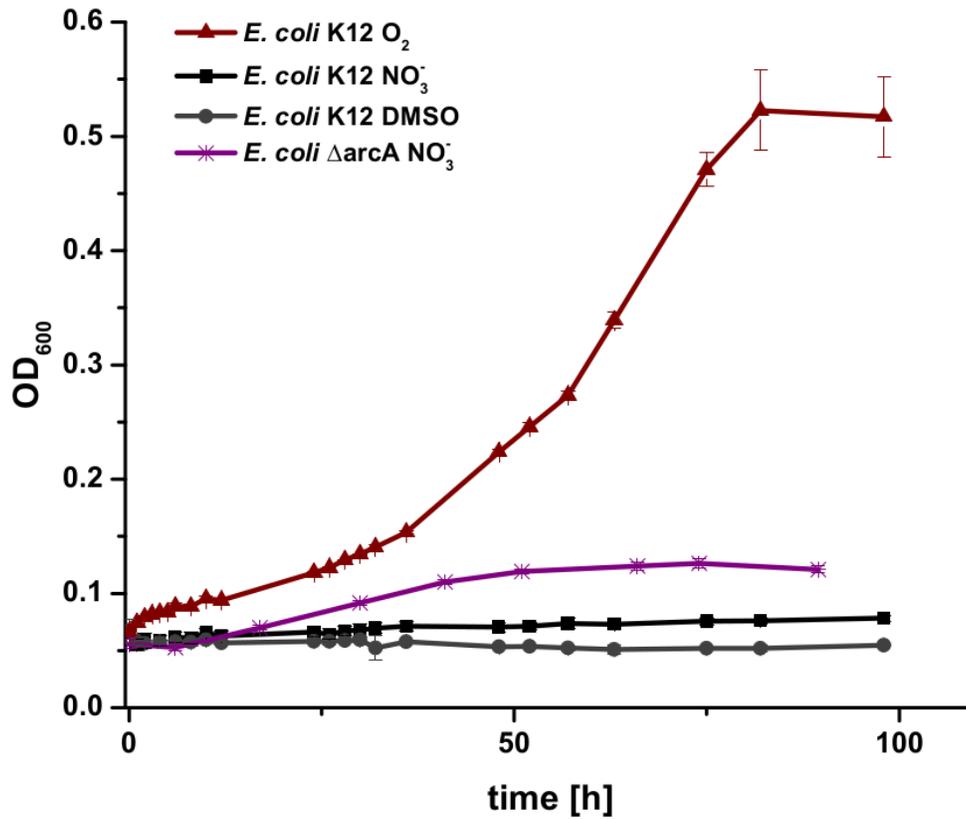
644

645 **Figure Legends**



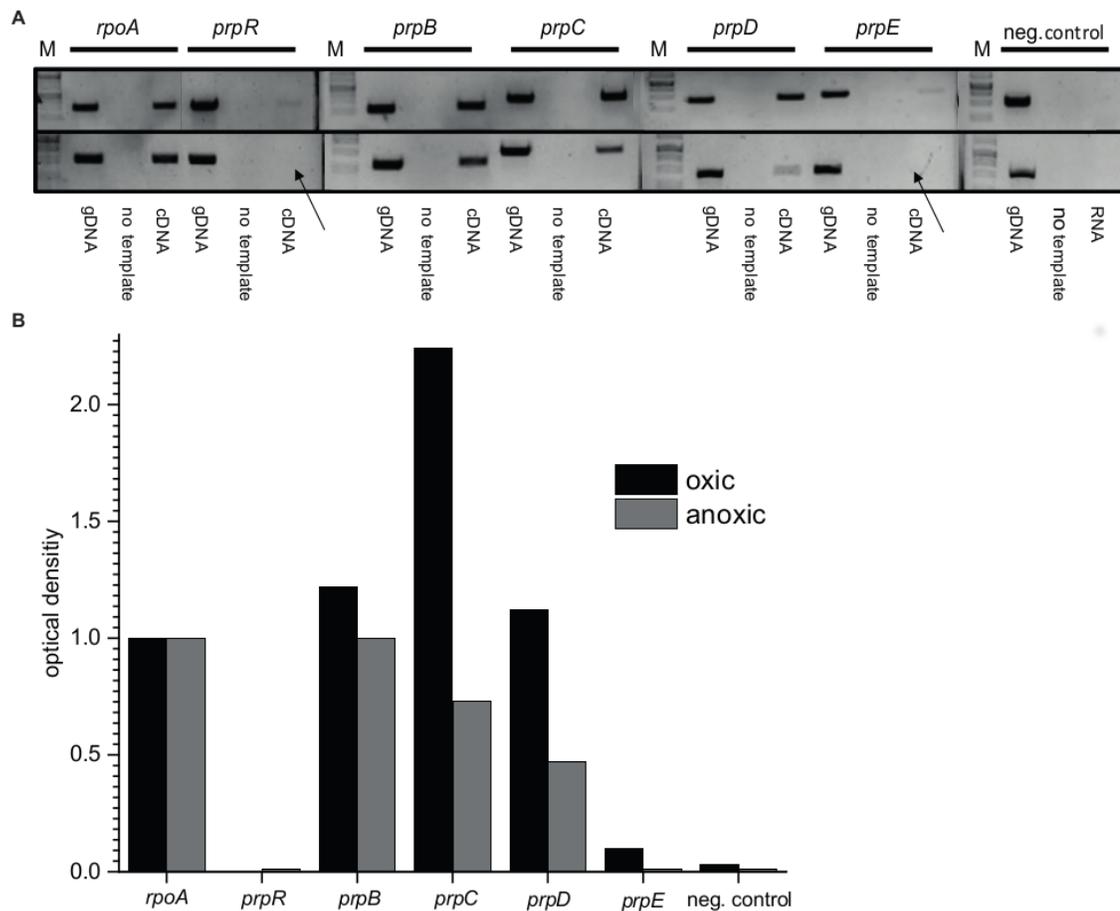
646

647 **Figure 1: A) Organization of the *prp*-operon in the genome of *E. coli* K12 with the divergent**
 648 **promoter region and the extragenic regions REP25 and REP26. The indicated features are not drawn**
 649 **to scale. B) Overview of the 2-methylcitrate pathway.**



650

651 **Figure 2: Cell growth of *E. coli* K12 wild type strain under oxic and anoxic conditions.** Cells
 652 were grown in M4 minimal medium supplemented with 10 mM propionate and O₂ (red triangles), 50 mM
 653 nitrate (black squares) and 50 mM DMSO (grey circles) as electron acceptor. *E. coli* K12 Δ*arcA* was
 654 cultivated under anoxic conditions with 10 mM propionate and 50 mM nitrate (purple stars).



655

656 **Figure 3 A) PCR reactions of the genes *prpR*, *prpB*, *prpC*, *prpD*, *prpE*, and *rpoA* and an**

657 **intergenic region (neg. control on RNA) of the gDNA as well as water (no template as**

658 **contamination control) and cDNA of *E. coli* K12. The gene *rpoA* served as reference gene for cDNA**

659 **quantification. *E. coli* K12 was cultivated aerobically with 50 mM glycerol and 10 mM propionate (upper**

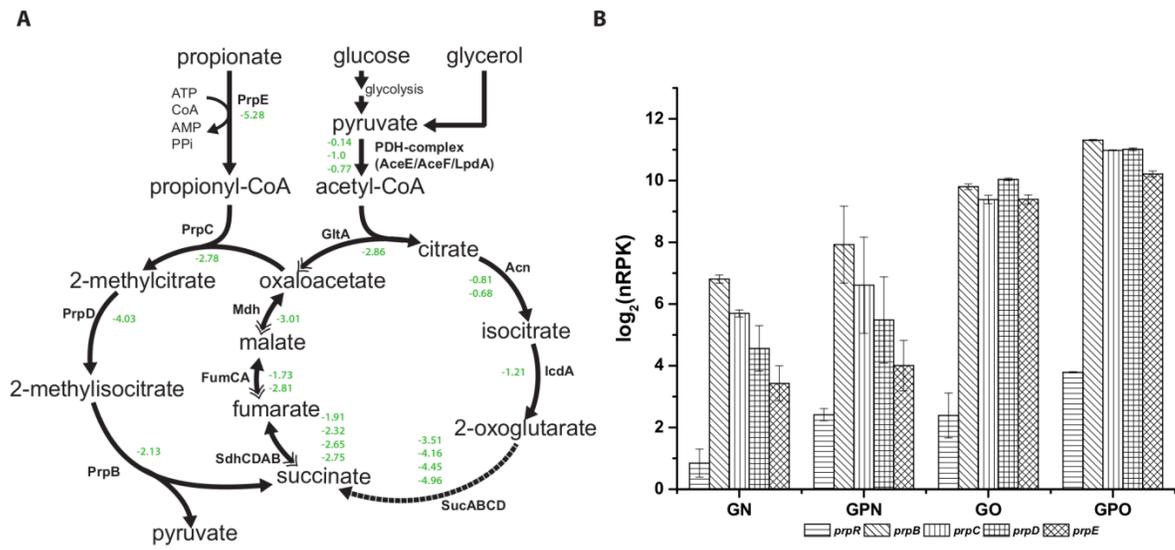
660 **row) and anaerobically with 50 mM glycerol, 10 mM propionate and 50 mM nitrate before RNA isolation**

661 **and following RT-PCR. The arrows indicate the significantly differentially transcribed genes. B)**

662 **Densitometric analysis of the differentially transcribed genes of the *prp*-operon compared to the**

663 **reference gene *rpoA* under oxic (black) and anoxic (grey) and anoxic conditions.**

664



665

666 **Figure 4 A) 2-methylcitrate pathway and TCA cycle of *E. coli* K12.** The expression values are log₂-

667 fold changes of *E. coli* K12 grown anaerobically with 50 mM glycerol, 10 mM propionate and 50 mM

668 nitrate compared to the reference transcriptome of *E. coli* K12 grown aerobically with 50 mM glycerol and

669 10 mM propionate. The double arrows show the reductive part of the anaerobic TCA cycle used for

670 oxaloacetate regeneration in the 2-methylcitrate cycle. **B) Normalized gene expression (reads per**

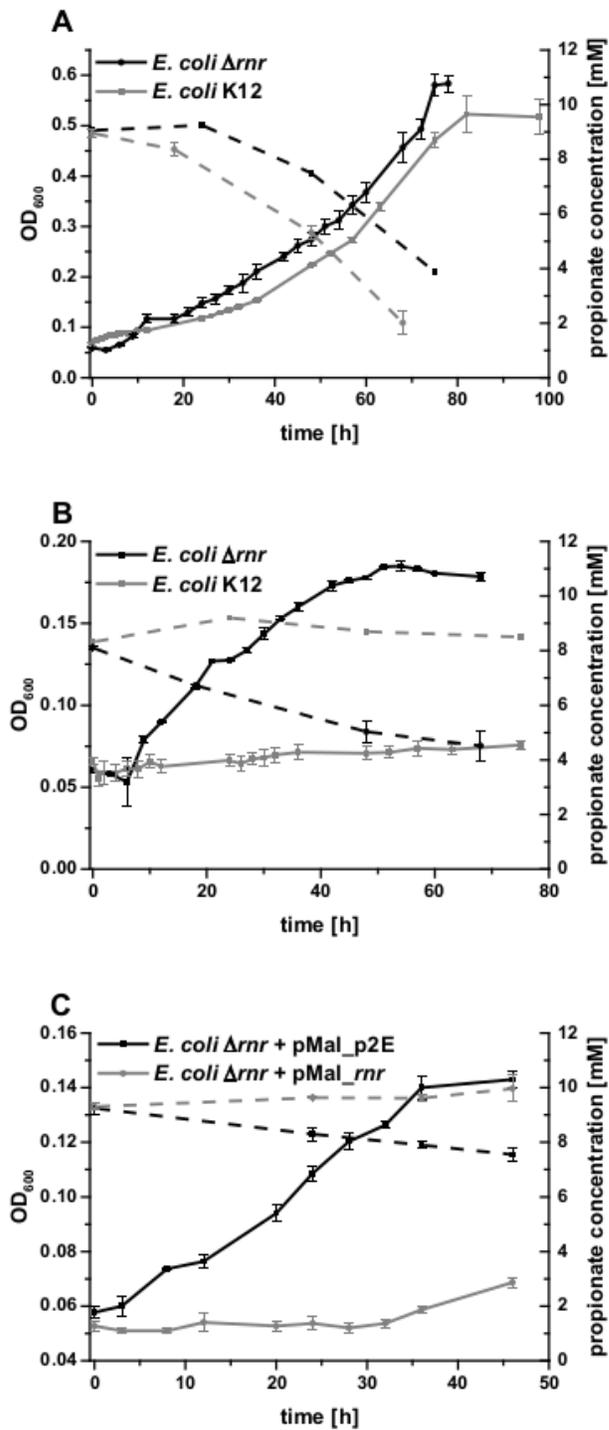
671 **kilobasepair, nRPK) of each gene of the *prp*-operon of wild type *E. coli* K12 cells grown under**

672 **different conditions in minimal media.** GN = 50 mM glycerol and 50 mM nitrate; GPN = 50 mM glycerol,

673 10 mM propionate and 50 mM nitrate; GO = 50 mM glycerol and oxygen; GPO = 50 mM glycerol, 10 mM

674 propionate and oxygen.

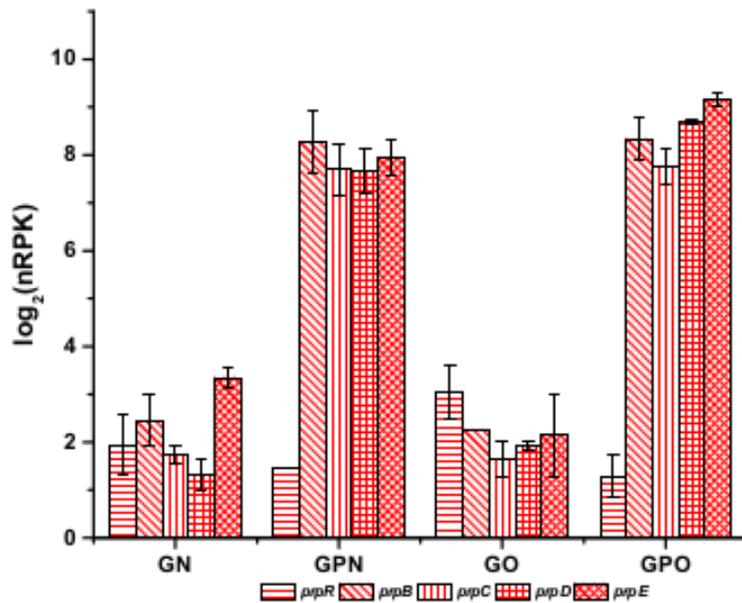
675



676
 677 **Figure 5: Growth of *E. coli* K12 (grey) and *E. coli* Δnrn (black) cultivated A) aerobically and B)**
 678 **anaerobically in M4 minimal medium with 10 mM propionate as the sole carbon source. The**

679 respective dotted lines depict the propionate consumption during growth. **C) Complementation**
 680 **experiment of *E. coli* Δrnr with either pMal_p2E (black) or with pMal_rnr (grey).** Expression of the
 681 plasmids was induced with 50 μ M IPTG. Propionate consumption is depicted in the respective dotted
 682 lines.

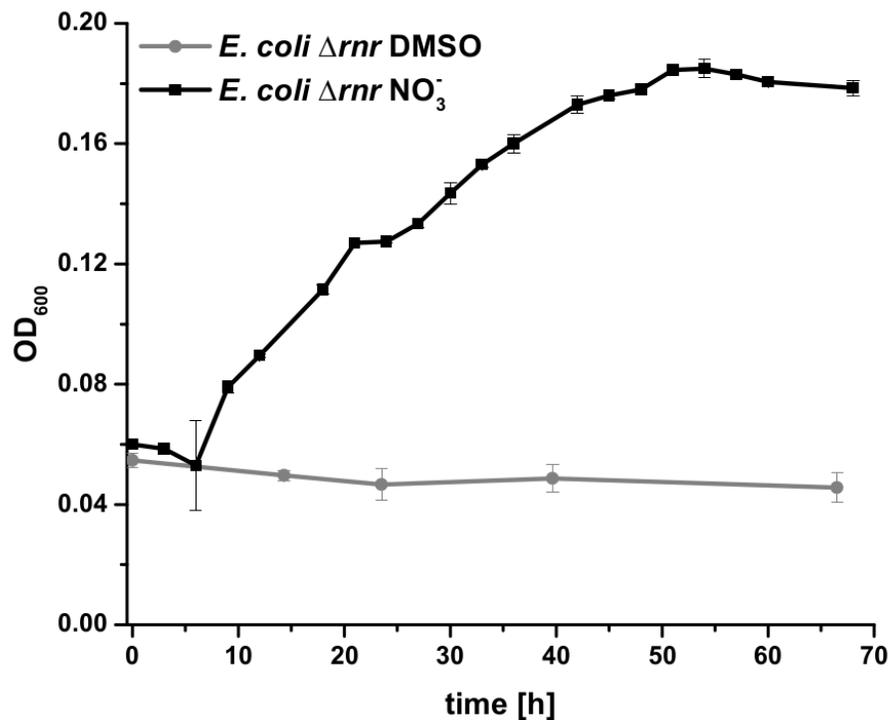
683



684

685 **Figure 6: Normalized gene expression of each gene of the *prp*-operon of *E. coli* Δrnr cells**
 686 **grown under different conditions in minimal media.** GN = 50 mM glycerol and 50 mM nitrate; GPN=
 687 50 mM glycerol, 10 mM propionate and 50 mM nitrate; GO = 50 mM glycerol and oxygen; GPO = 50 mM
 688 glycerol, 10 mM propionate and oxygen.

689



690
 691 **Figure 7: Anaerobic growth of *E. coli* Δrrn with 10 mM propionate as sole carbon source and**
 692 **50 mM nitrate (black squares) or 50 mM DMSO (grey circles) as electron acceptor.**

693
 694 **Supplementary Table Legends**

695 **Table S1: Significantly differentially expressed exoribonucleases in *E. coli* K12 under anoxic**
 696 **growth conditions**

locus ID	gene	annotation	GPO_GPN	
			log2fc	padj
b4179	<i>rrn</i>	exoribonuclease R; RNase R	1,97	5,47E-14
b1804	<i>rnd</i>	ribonuclease D; Rnase D	1,13	1,99E-03
b1286	<i>rnb</i>	ribonuclease II; Rnase II	0,97	1,11E-02

697

698 **Table S2: Representation of further operons and genes also affected by the absence of the *rnr* gene under anoxic conditions.** The values
699 are log₂-fold changes in the expression compared to the reference genome.

			NO3 vs O2		mut vs WT	
			GPO_GPN		GN_ΔGN	
locus ID	gene	annotation	log2fc	padj	log2fc	padj
b0199	<i>metD/N</i>	DL-methionine transporter subunit	4,46	7,74E-20	-4,30	3,96E-26
b0198	<i>metI</i>	DL-methionine transporter subunit	3,14	4,26E-19	-4,01	4,46E-40
b0197	<i>metQ</i>	DL-methionine transporter subunit	0,86	1,36E-03	-3,11	8,46E-54
b2942	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase	3,04	9,71E-10	-3,92	7,34E-22
b3828	<i>metR</i>	DNA-binding transcriptional activator; homocysteine-binding	4,75	1,57E-08	-3,94	8,29E-08
b3829	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine S-methyltransferase	2,18	2,16E-12	-5,87	5,51E-122
b3938	<i>metJ</i>	DNA-binding transcriptional repressor; S-adenosylmethionine-binding	2,46	7,28E-10	-1,75	2,01E-07

b3939	<i>metB</i>	cystathionine gamma-synthase; PLP-dependent	5,42	6,32E-49	-4,38	3,13E-47
b3940	<i>metM/L</i>	fused aspartokinase II/homoserine dehydrogenase II	4,31	1,66E-53	-3,46	3,51E-54
b3941	<i>metF</i>	5;10-methylenetetrahydrofolate reductase	4,72	6,03E-08	-4,37	1,91E-08
b4013	<i>metA</i>	homoserine O-transsuccinylase	3,32	9,97E-19	-4,75	4,86E-46
b1987	<i>cbl</i>	DNA-binding transcriptional activator for the ssuEADCB and tauABCD operons	1,19	1,40E-01	-2,30	2,15E-04
b0365	<i>tauA</i>	taurine transporter subunit	1,08	3,54E-01	-3,52	2,67E-04
b0366	<i>tauB</i>	taurine transporter subunit	0,69	5,68E-01	-1,88	4,88E-02
b0367	<i>tauC</i>	taurine transporter subunit	-1,10	NA	-1,61	NA
b0368	<i>tauD</i>	taurine dioxygenase; 2-oxoglutarate-dependent	0,28	8,54E-01	-0,54	6,82E-01
b1275	<i>cysB</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator; O-acetyl-L-serine-binding	2,27	1,69E-08	-1,67	1,01E-06
b2425	<i>cysP</i>	thiosulfate-binding protein	1,20	2,73E-01	-3,11	1,42E-04
b2424	<i>cysU</i>	sulfate/thiosulfate ABC transporter permease	1,30	2,30E-01	-2,08	2,03E-02
b2423	<i>cysW</i>	sulfate/thiosulfate ABC transporter subunit	1,18	1,98E-01	-1,29	1,06E-01

b2422	<i>cysA</i>	sulfate/thiosulfate transporter subunit	0,80	4,13E-01	-0,96	2,49E-01
b2421	<i>cysM</i>	cysteine synthase B (O-acetylserine sulfhydrylase B)	0,69	1,61E-01	-0,80	4,46E-02
b2752	<i>cysD</i>	sulfate adenylyltransferase; subunit 2	1,51	1,67E-01	-2,60	4,09E-03
b2751	<i>cysN</i>	sulfate adenylyltransferase; subunit 1	1,20	2,32E-01	-1,76	3,46E-02
b2750	<i>cysC</i>	adenosine 5'-phosphosulfate kinase	1,10	2,70E-01	-1,44	8,84E-02
b0260	<i>mmuP</i>	CP4-6 prophage; predicted S-methylmethionine transporter	6,33	4,25E-48	-5,31	3,89E-51
b3511	<i>hdeD</i>	acid-resistance membrane protein	-0,65	1,89E-01	3,57	7,34E-22
b3510	<i>hdeA</i>	stress response protein acid-resistance protein	-2,42	5,76E-08	3,59	5,25E-24
b3509	<i>hdeB</i>	acid-resistance protein	-1,95	6,39E-06	2,94	9,19E-18
b3508	<i>yhiD</i>	predicted Mg(2) transport ATPase; inner membrane protein	-1,78	1,77E-02	2,91	1,61E-07
b2096	<i>gatY</i>	D-tagatose 1;6-bisphosphate aldolase 2; catalytic subunit	-5,44	3,40E-79	0,44	1,53E-01
b2095	<i>gatZ</i>	D-tagatose 1;6-bisphosphate aldolase 2; subunit	-4,56	1,02E-57	1,96	3,13E-16
b2094	<i>gatA</i>	galactitol-specific enzyme IIA component of PTS	-4,28	1,14E-47	2,81	8,22E-31

b2093	<i>gatB</i>	galactitol-specific enzyme IIB component of PTS	-4,10	1,57E-24	4,18	2,88E-36
b2092	<i>gatC</i>	galactitol PTS permease - GatC subunit	-0,13	8,46E-01	7,96	1,05E-129
b2091	<i>gatD</i>	galactitol-1-phosphate dehydrogenase; Zn-dependent and NAD(P)-binding	0,06	9,54E-01	8,11	1,05E-77
b2979	<i>glcD</i>	glycolate oxidase subunit; FAD-linked	-4,60	2,97E-19	3,58	4,32E-13
b4468	<i>glcE</i>	glycolate oxidase FAD binding subunit	-4,81	3,86E-13	2,95	5,98E-06
b4467	<i>glcF</i>	glycolate oxidase 4Fe-4S iron-sulfur cluster subunit	-4,71	2,70E-17	1,77	3,17E-04
b2977	<i>glcG</i>	conserved protein	-5,31	3,54E-24	1,25	1,42E-02
b2976	<i>glcB</i>	malate synthase G	-5,08	1,87E-27	1,69	6,31E-05
b2975	<i>glcA</i>	glycolate transporter	-3,44	5,58E-10	0,75	2,42E-01
b2241	<i>glpA</i>	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic); large subunit; FAD/NAD(P)-binding	-5,32	1,97E-30	1,91	1,37E-06
b2242	<i>glpB</i>	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic); membrane anchor subunit	-4,30	2,00E-23	2,47	4,65E-11
b2243	<i>glpC</i>	anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase; C subunit; 4Fe-4S iron-sulfur cluster	-3,74	3,55E-16	3,45	4,55E-16

b2659	<i>cisD</i>	carbon starvation protein	-4,06	1,35E-06	1,87	3,73E-02
b2660	<i>ihgO</i>	L-2-hydroxyglutarate oxidase	-3,55	2,86E-06	0,16	8,81E-01
b2661	<i>gabD</i>	succinate-semialdehyde dehydrogenase I; NADP-dependent	-3,27	1,87E-10	0,72	1,76E-01
b2662	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase; PLP-dependent	-3,08	5,18E-11	2,20	3,55E-06

700

701

702 **Table S3: List of organisms carrying the same *prpBCDE* operon setup as *E. coli* K12**

Organism	RefSeq	repeat regions/distinctive feature	Family	Class
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	NC_000913.2	REP25, REP26	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Shigella</i> sp. D9	NC_i00220	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	NC_011740.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Adhaeribacter aquaticus</i> MBRG1.5, DSM 16391	NC_i00381	-	Cytophagaceae	Cytophagia
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220	NC_i00071/NZ	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria

	_GG730299.1			
<i>Citrobacter sp. 30_2</i>	NC_i00203/NZ_KI391991.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	NC_009792.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419	NC_015761.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	NC_003197.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	NC_013716.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Photorhabdus asymbiotica</i> subsp. <i>asymbiotica</i> ATCC 43949	NC_012962.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	NC_014228.1	-	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1	NC_005126.1	631 nt downstream of <i>prpE</i>	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004	NC_013892.1	427 nt downstream of <i>prpE</i>	Enterobacteriaceae	Gammaproteobacteria
<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	NC_015856.1	hypothetical protein between <i>prpD</i> and <i>prpE</i>	Oxalobacteraceae	Betaproteobacteria

<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1	NC_013959.1	<i>prpR</i> is in the same orientation as <i>prpBCDE</i>	Gallinellaceae	Betaproteobacteria
---	-------------	--	----------------	--------------------

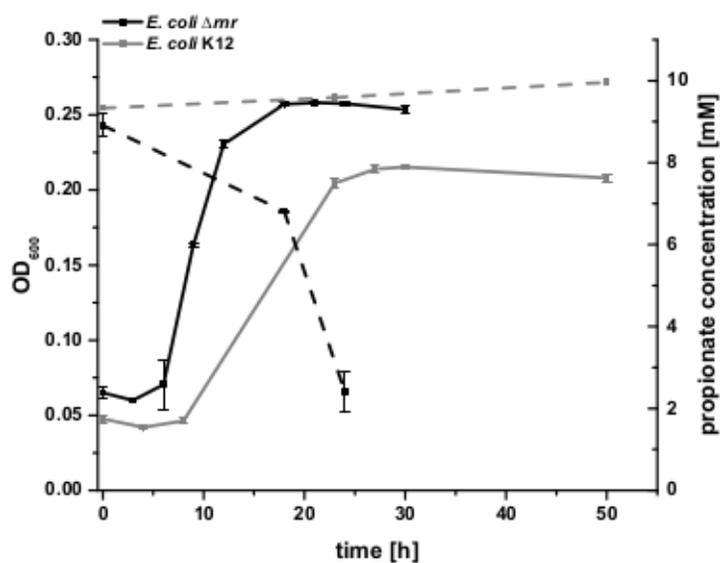
703

704 **Table S4: List of primers used in this work**

number	primer name	sequence
1	<i>prpR</i> _RT_for	CAAGAAACTGGCAAACGAAC
2	<i>prpR</i> _RT_rev	CGGGCATACAGCAAAATAGT
3	<i>prpB</i> _RT_for	ATTGAAGATCAGGTTGGTGC
4	<i>prpB</i> _RT_rev	AATTCGTCGGTGGTAAACAG
5	<i>prpC</i> _RT_for	GGTATCACTACAGCCACAAC
6	<i>prpC</i> _RT_rev	GGGGAACATCTTTTTGCTCT
7	<i>prpD</i> _RT_for	TGTTCAAATCTCCTTCCCG
8	<i>prpD</i> _RT_rev	CCACCACTTCTTCAAATCGT
9	<i>prpE</i> _RT_for	ACTTACTGGTCGCTGTTTTC
10	<i>prpE</i> _RT_rev	GGATCATCAATGGTCGTCAG
15	Neg3_RT_for	GGCACCTTTTTCTGCTACTT
16	Neg3_RT_rev	CCCACAAACAATACCGATGA
21	<i>rpoA</i> _for	CACCAAAGAAGGCGTTCAG
22	<i>rpoA</i> _rev	TCTCTTCTTCACTTCAGGC
23	<i>rnr</i> _NdeI_for	CTTAGTACATATGTCACAAGATCCTTTCCA
24	<i>rnr</i> _BamHI_rev	CGGCTATGGATCCTCACTCTGCCACTTTTTTC

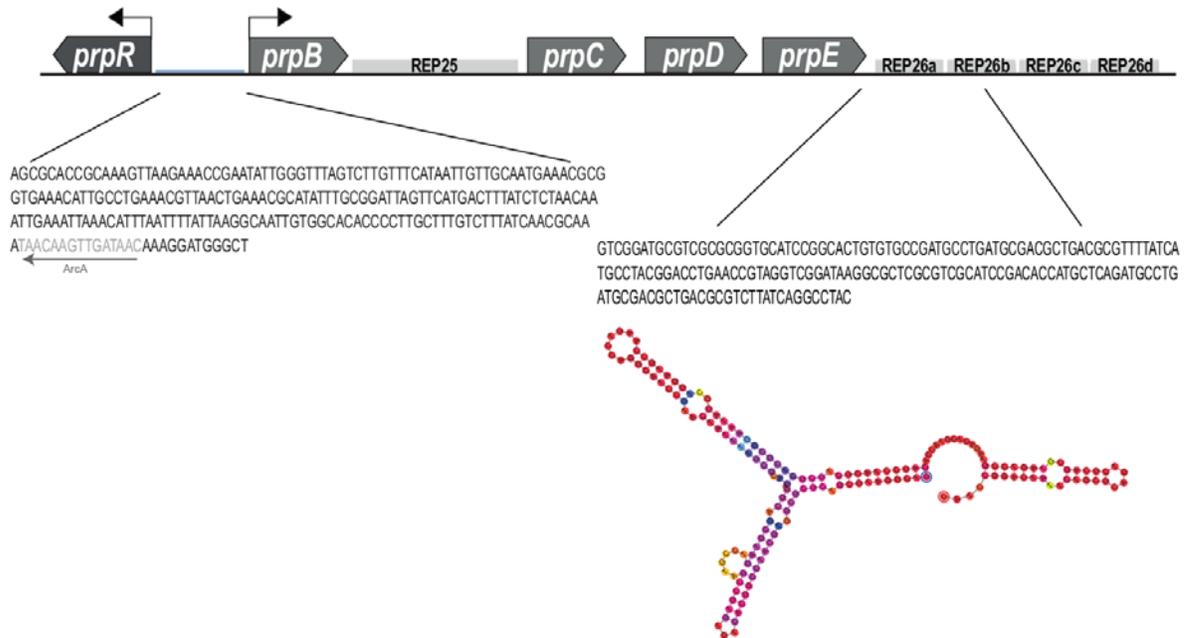
705

706

Supplementary Figure Legends

707

708 **Figure S1 Anaerobic cell growth of *E. coli* K12 (grey stars) and *E. coli* Δrnr (black diamonds) in**
 709 **M4 minimal medium supplemented with 10 mM propionate, 50 mM glycerol as co-substrate and 50**
 710 **mM nitrate as electron acceptor.** Propionate consumption is depicted in dotted lines, respectively.



711
 712 **Figure S2: Depiction of the genomic *prp*-operon with the putative ArcA binding site within the**
 713 **promoter region and the extragenic regions REP25 and REP26. The REP of interest, REP26, builds a**
 714 **strong secondary structure that is recognized by RNase R.**

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Fachzeitschriften:

Simonte, F., Dötsch, A. und Gescher, J. (2016). Investigation on the anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12. Submitted to *Molecular Microbiology*

Konferenzbeiträge:

Simonte, F., Dötsch, A. und Gescher, J. (2016). Investigation of the anaerobic propionate metabolism in *Escherichia coli* K12. Vortrag, Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jahrestagung 2016, 13.–16.03.2016, Jena.

Simonte, F., Golitsch, F. und Gescher, J. (2015). Development of a bioanode based biosensor for volatile fatty acids (VFA) quantification in biogas reactors. Posterpräsentation, 3rd European Congress of Applied Biotechnology (ECAB), 27.09.-01.10.2015, Nizza, Frankreich.

Simonte, F., Prokhorova, A., Ziegler, S., und Gescher J. (2015). Biogas plant performance boost by implementation of the MFC technology. Posterpräsentation, Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jahrestagung 2015, 01.–04.03.2015, Marburg.

Simonte, F., Golitsch, F. und Gescher, J. (2013). Proof of principle for a microbial fuel cell biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. Posterpräsentation, 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology, 12.-15.05.2013, Sitges, Spanien.