

**Analysen zur Substrataufnahme und
Produktbildung des elektroautotrophen
Biokatalysators *Kyrpidia spormannii***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Tobias Marco Jung

aus Heidelberg

KIT-Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Koreferent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut für Angewandte Biowissenschaften archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2017 bis April 2020 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Betreuer Johannes Gescher dafür danken, die Möglichkeit erhalten zu haben, meine Promotion bei ihm machen zu dürfen. Du hast wirklich ein tolles Arbeitsumfeld geschaffen, das mich immer motiviert und inspiriert hat! Man merkt mit wie viel Leidenschaft du dich um deine Arbeitsgruppe kümmerst. Ich finde das ist nicht selbstverständlich und hoffe, dass du diese Art deine Arbeitsgruppe zu leiten nicht verlierst! Vielen Dank dafür, dass du mich immer darin ermutigt hast, meine eigenen Ideen mit in das Projekt einfließen zu lassen und ich mich dabei immer von dir unterstützt gefühlt habe.

Ich möchte außerdem all meinen Kollegen im Labor und am EBI danken. Vielen Dank für all eure Unterstützung und die schöne Zeit mit euch. So eine tolle, hilfsbereite Truppe findet man nicht zweimal! Ein besonderer Dank geht an die Boyband von BioElectroPlast, bestehend aus Ebi, Max und Jonas. Wir waren in all der Zeit ein tolles Team, das durch Höhen und Tiefen gegangen ist, sei es beim Reaktorbau, dem guten alten Mysterium der Elektrochemie oder wenn Kyrpi mal wieder nicht wollte. Ich glaube wir haben so viel voneinander gelernt, dass uns alle unglaublich weitergebracht hat! Rocket Science! Auch meiner Sitznachbarin Laura möchte ich für die vielen lustigen, aber auch hilfreichen und persönlichen Gespräche danken. Meinen fleißigen Korrektoren Ebi, Max und Laura möchte ich noch einmal einen extra Dank aussprechen für ihre hilfreichen Korrekturen und dafür, dass sie während des Schreibens immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme hatten!

All meinen Freunden möchte ich danken für die tolle Unterstützung in den letzten Jahren. Ein spezieller Dank geht an Robin und Chris aus Freiburg, meiner dritten Heimat. Ihr seid immer offen für Besuche und gemütliche Abende gewesen, durch die man einfach mal vom Laboralltag abschalten konnte.

Meiner Familie kann ich gar nicht genug Dank aussprechen. Ihr wart in all den Jahren immer für mich da und habt Rücksicht auf mich genommen, wenn die Zeiten mal schwieriger waren. Ich finde es immer wieder schön wie toll wir einander helfen und uns gegenseitig unterstützen, egal unter welchen Umständen und Gegebenheiten.

Mein abschließender Dank geht an meine Frau, Judith. Du hast mich in den letzten Jahren immer wieder ausgehalten, wenn ich mal schlecht drauf war, weil mal wieder etwas nicht geklappt hat und hast sehr viel Rücksicht und Verständnis gezeigt, obwohl du wahrscheinlich bis zu Schluss nicht 100%ig verstanden hast was ich da eigentlich Tag für Tag mache. Auch während des Schreibens hast du mich aus so manchem Loch herausgezogen. Wir sind ein tolles Team und ich kann mich immer auf dich und deine Hilfe verlassen. Dafür will ich dir von ganzem Herzen danken!

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen

Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J.E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A., Wagner, M. (2020) Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chem Eng J* **390**: 124604

Reiner, J.E., Geiger, K., Hackbarth, M., Fink, M., Lapp, C.J., Jung, T., Dötsch, A., Hügler, M., Wagner, M., Hille-Reichel, A., Wilcke, W., Kerzenmacher, S., Horn, H., Gescher, J. (2020) From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: Identifying a novel *Knallgas* bacterium as cathodic biofilm biocatalyst. *ISME J* **14**: 1125-1140

Reiner, J.E., Jung, T., Lapp, C.J., Siedler, M., Bunk, B., Overmann, J., and Gescher, J. (2018) *Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at São Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 3735-3740

Warnke, M., Jung, T., Jacoby, C., Agne, M., Feller, F.M., Philipp, B., Seiche, W., Breit, B., Boll, M. (2018) Functional characterization of three specific acyl-coenzyme A synthetases involved in anaerobic cholesterol degradation in *Sterolibacterium denitrificans* Chol1S. *Appl Environ Microbiol* **84**: e02721-17

Warnke, M., Jacoby, C., Jung, T., Agne, M., Mergelsberg, M., Starke, R., Jehmlich, N., von Bergen, M., Richnow, H.-H., Brüls, T., Boll, M. (2017) A patchwork pathway for oxygenase-independent degradation of side chain containing steroids. *Environ Microbiol* **19**: 4684–4699

Warnke, M., Jung, T., Dermer, J., Hipp, K., Jehmlich, N., von Bergen, M., Ferlino, S., Fries, A., Müller, M., Boll, M. (2016) 25-Hydroxyvitamin D3 synthesis by enzymatic steroid side-chain hydroxylation with water. *Angew Chem Int Ed* **55**:1881–1884

Konferenzbeiträge

Vortrag – Workshop: Plattforminitiative - Mikrobielle Bioelektrotechnologie, Ruhr-Universität Bochum, November 2019; *Developing the biofilm growth capabilities of the novel electroautotrophic biocatalyst Kyrpidia spormannii*.

Vortrag – 17th International Conference for Carbon Dioxide Utilization (ICCDU), Aachen (DE), Juni 2019; *Using a thermoacidophilic cathodic biofilm to drive waste-gas driven polyhydroxyalkanoate production*.

Workshops

Teilnahme – nova Session: Bio-based Building Blocks and Polymers – Markets, Trends and Innovations, Mai 2017, Köln.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
I. Einleitung	1
1.1. Das Treibhausgas Kohlenstoffdioxid.....	1
1.2. Der Rohstoff Kohlenstoffdioxid.....	3
1.3. Biotechnologische Nutzung von CO ₂	4
1.3.1. CO ₂ -Fixierungswege in der Biotechnologie.....	6
1.4. Bioelektrochemische Nutzung von CO ₂	10
1.4.1. Bioelektrochemische Systeme.....	10
1.4.2. Mikrobielle Elektrosynthese.....	12
1.5. <i>Kyrpidia spormannii</i>	21
1.6. Die Biogenese von PHB und seine Anwendung.....	23
1.7. Ziele der Arbeit.....	27
II. Material und Methoden	28
2.1. Chemikalien.....	28
2.2. Mikroorganismen und Plasmide.....	28
2.2.1. Verwendete Bakterienstämme.....	28
2.2.2. Verwendete Plasmide.....	29
2.3. Kultivierungen.....	30
2.3.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	30
2.3.2. Heterotrophe Kultivierung von <i>K. spormannii</i>	31
2.3.3. Litho-autotrophe Kultivierung von <i>K. spormannii</i>	31
2.3.4. Stammerhaltung.....	33
2.4. Bioelektrochemische Biofilmkultivierung.....	33
2.4.1. Aufbau der Fließzellen und der Peripherie.....	33
2.4.2. Fließzellen-Kultivierung.....	34
2.5. UV-unterstützte elektroautotrophe Adaption.....	35
2.6. Bildgebende Methoden.....	36
2.6.1. Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie.....	36
2.6.2. Optische Kohärenztomographie – Prinzip und Auswertung.....	38
2.7. Molekularbiologische Methoden.....	38
2.7.1. Sicherung synthetisierter DNA-Sequenzen.....	38
2.7.2. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	38

2.7.3.	DNA-Amplifikation	39
2.7.4.	Restriktion	42
2.7.5.	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.7.6.	Isothermale <i>in-vitro</i> Ligation.....	43
2.7.7.	DNA-Methylierung und Dot-Blot Test	44
2.7.8.	Transformationen	45
2.7.9.	Isolation genomischer DNA.....	48
2.7.10.	Sequenzierungen	48
2.8.	Proteinbiochemie	49
2.8.1.	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	49
2.8.2.	Präparation der Plasmafraktion	49
2.8.3.	Hitzefällung.....	50
2.8.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.8.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.8.6.	Colorimetrischer MurA Aktivitätstest.....	52
2.9.	Analytische Methoden	53
2.9.1.	Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC)	53
2.9.2.	Polyhydroxybutyrat-Nachweis mittels HPLC	54
2.9.3.	Ionenaustauschchromatographie (IC).....	55
2.10.	Bioinformatische Methoden.....	56
2.10.1.	Allgemeine <i>in-silico</i> DNA-Arbeiten	56
2.10.2.	Codon-optimierung	56
2.10.3.	Restriktionsmodifikationssystem Analyse	56
2.10.4.	Genomische Variantendetektion	56
2.10.5.	BLAST- und Proteindomänen-Analysen	57
2.10.6.	Proteinmodellierung und Darstellung	57
III.	Ergebnisse	58
3.1.	Adaption von <i>Kyrpidia spormannii</i> an elektroautotrophe Wachstumsbedingungen	58
3.1.1.	Kathodisches Biofilmwachstum von <i>K. spormannii</i> Stamm EAD.....	59
3.1.2.	Heterotrophes und hydrogenotrophes Wachstum.....	72
3.2.	Variationsanalyse von <i>Kyrpidia spormannii</i> Stamm EAD	73
3.2.1.	Allgemeine Sequenzierungs- und Variationsauswertung.....	73
3.2.2.	Analyse der Varianten mit großer Häufigkeit	76
3.2.3.	Analyse der Gene mit hoher Mutationsrate.....	92
3.3.	Identifizierung und Funktionalitätstests der PHB-Synthesegene.....	96
3.3.1.	Identifizierung weiterer Gene der PHB-Biogenese	96
3.3.2.	Heterologe Expression potentieller PHB-Synthesegene in <i>E. coli</i>	99
3.4.	Entwicklung eines genetischen Systems für <i>K. spormannii</i>	101
3.4.1.	Das Selektionssystem.....	101
3.4.2.	Klonierung der Transformationsplasmide.....	103

3.4.3.	Entwicklung eines <i>host-mimicking</i> Plasmids	104
3.4.4.	Transformationsversuche	108
IV.	Diskussion	110
4.1.	Generelle Beobachtungen der Variantendetektion.....	110
4.2.	Auswirkungen der Varianten auf das elektroautotrophe Biofilmwachstum	113
4.2.1.	Kathodische Biofilmbildung	114
4.2.2.	Elektronenaufnahme.....	118
4.2.3.	Kohlenstoffassimilation	123
4.3.	Die PHB-Biogenese in <i>Kyrpidia spormannii</i>	124
4.4.	Evaluation der Transformations-Experimente	126
4.5.	Ausblick	129
V.	Literaturverzeichnis.....	131
VI.	Anhang	147

Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der immer mehr sichtbaren Auswirkungen des anthropogenen Klimawandels rückt die Entwicklung von Technologien, die in der Lage sind die Treibhausgasemissionen zu senken, immer weiter in den gesellschaftlichen und wissenschaftlichen Fokus. Die noch recht junge aber vielversprechende Technologie der mikrobiellen Elektrosynthese vereint dabei die biologisch-katalysierte Umsetzung von CO₂ zu organischen Verbindungen, wobei elektrischer Strom in Form von kathodischen Elektronen als alleinige Energie- und Elektronenquelle dient. Es stehen bisher jedoch noch relativ wenige, gut charakterisierte Biokatalysatoren für solch einen Prozess zur Verfügung. Vor kurzem konnte das thermoacidophile Knallgasbakterium *Kyrpidia spormannii* als ein aussichtsreicher Biokatalysator isoliert werden, welcher in der Lage ist unter elektroautotrophen, oxischen Bedingungen CO₂ zu fixieren. Außerdem ist dieser Mikroorganismus ein natürlicher Produzent von Polyhydroxybutyrat (PHB), einem industriell interessanten Biopolymer, das zur Herstellung von biologisch abbaubarem Kunststoff verwendet wird. Das Ziel dieser Arbeit war es über eine Adaption unter elektroautotrophen Bedingungen sowie durch eine darauffolgende genomische Analyse ein besseres Verständnis über die zugrundeliegenden Mechanismen des Wachstums eines elektroautotrophen Biofilms zu erhalten. Außerdem sollten die PHB-Synthesegene analysiert werden um die Produktbildung in *K. spormannii* optimieren zu können.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Adaption an elektroautotrophe Bedingungen, stellt die erste Adaption eines Mikroorganismus unter solchen Bedingungen dar. Die Anpassung von *K. spormannii* zeigte sich besonders in einer bis zu vierfach gesteigerten Biofilm-Akkumulationsrate, einer schnelleren vollständigen Kathodenbedeckung und der Ausbildung eines homogenen Biofilms. Durch die genomische Variantendetektion des adaptierten Stamms konnten eine Vielzahl verschiedener Variationen detektiert werden, wovon einigen eine direkte Auswirkung auf die elektroautotrophen Wachstumsbedingungen zugeschrieben werden konnte. So deuten die Variationen zum einen auf eine Anpassung an oxidativen Stress hin, der durch die Sauerstoffreduktion zu reaktiven Sauerstoffspezies in oxischen bioelektrochemischen Systemen hervorgerufen wird. Zum anderen sprechen Variationen der EPS- und Peptidoglykansynthese für deren Anpassung an die Substrat- und Nährstofflimitationen innerhalb des Biofilms und eine potentielle verbesserte Aufnahme durch die dicke Peptidoglykanschicht des Gram-positiven *K. spormannii*. Eine weitere Mutation konnte in einem in *K. spormannii* noch unbekanntem Gencluster eines Heterodisulfid-

Reduktase-Komplex identifiziert werden, welcher an der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen beteiligt zu sein scheint. Daraufhin konnte auch das lithoautotrophe Wachstum mit elementarem Schwefel als alleiniger Energie- und Elektronenquelle in *K. spormannii* bewiesen werden. Diese Fähigkeit diente auch der Postulation eines potentiellen Schwefel-basierten Elektronenaufnahmemechanismus, der neben einem Mechanismus auf der Basis von Wasserstoff existieren könnte. Durch Sequenzanalysen des PHB-Synthese Genclusters konnten mit PhaQ und PhaP außerdem weitere wichtige Komponenten in der Bildung von PHB identifiziert und die Funktionalität des gesamten Genclusters durch eine heterologe Expression in *E. coli* bewiesen werden. Überdies, konnten auf dem Weg zur Entwicklung eines genetischen Systems erste wichtige Schritte, wie die Entwicklung eines Selektionssystem oder eines *host-mimicking*-Plasmids, gemacht werden. Dieses System soll in späteren Versuchen dazu genutzt werden, den Biokatalysator *K. spormannii* mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen für einen mikrobielle Elektrosyntheseprozess zu optimieren.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Globale Treibhausgas-Emissionen im Zeitraum von 1989 bis 2018. Es sind die fünf schädlichsten Treibhausgase aufgeführt, wozu fluoriierte Gase (F-gase), Stickstoffmonoxid (N₂O), Methan (CH₄) und fossile CO₂-Emissionen gehören, sowie die Emissionen, die durch die Landnutzungsänderung entstehen. Die angegebenen absoluten Mengen der Treibhausgase sind in ihrem GtCO₂-Äquivalent angegeben. Verändert nach Kuramochi *et al.*, 2019. 2
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus (A) und des Wood-Ljungdahl-Wegs (B). In der Darstellung (A) des Calvin-Zyklus sind die beiden Schlüsselreaktionen durch die Ribulose-5-Phosphat-Kinase und die RuBisCO in Lila, die Schritte, die Teil der Gluconeogenese sind, in Rot und Teile des Pentose-Phosphat-Weg in Blau dargestellt. Die Schritte in blau werden von der Transketolase und der Transaldolase katalysiert. In (B) sind die Schritte der Acetogenese in Grün und die der Methanogenese in Gelb dargestellt. Verändert nach (Bar-Even *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2017; Reiner, 2019). THF – Tetrahydrofolat; AH₂ – reduzierter Elektronendonator; Fd_{red} – reduziertes Ferredoxin; MFR – Methanofuran; H₄TP – Tetrahydromethanopterin oder Tetrahydroscarinopterin. 6
- Abb. 3: Schematische Darstellung der (A) mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC) und der (B) mikrobiellen Elektrosynthesezelle (MES). Die ablaufenden Redoxreaktionen sind exemplarisch dargestellt. 12
- Abb. 4: Übersicht über potentielle Elektronenaufnahme-Mechanismen von einer Kathode in die Zelle. Bei der (A) direkten Elektronenaufnahme ist kein Mediator notwendig. (B)-(D) beruhen auf der Entstehung von H₂ oder Formiat, entweder gänzlich abiotisch (B) oder Enzym-katalysiert (D). Bei der (C) biotisch-induzierten H₂-Entstehung führt die biotische Oxidation von abiotisch entstandenem Wasserstoff durch den niedrigeren Partialdruck (Pa) zu einer vermehrten H₂-Entstehung. Der (E) Redoxmediator-basierte Transport kann auf einer Reihe verschiedener redox-aktiver Substanzen beruhen. Nach Tremblay *et al.*, 2017; Lienemann *et al.*, 2018 und Philips, 2020. 17
- Abb. 5: Schematische Darstellung des angestrebten biotechnologischen mikrobiellen Elektrosynthese-Prozess von *Kyrpidia spormannii*. 23
- Abb. 6: Darstellung der enzymatischen Schritte zur Produktion von Poly-3-hydroxybutyrat (PHB). Die Zwischenprodukte der Synthese, sowie die relevanten Enzyme und deren Cofaktoren sind abgebildet. 24
- Abb. 7: Darstellung des Aufbaus der Fließzellenperipherie (A) und Explosionszeichnung der Fließzellen (B). 34
- Abb. 8: Schema der UV-unterstützte elektroautotrophe Kultivierung. 1) Kultivierung von *K. spormannii* in der Fließzelle. 2) Biofilmentnahme und heterotrophe Kultivierung. 3) UV-Bestrahlung des Inokulums der erneuten Kultivierung in der Fließzelle. 4) Entnahme des elektroautotroph-adaptierten Stamms. 5) Vergleich des elektroautotrophen Biofilmwachstums des Wildtyps und des adaptierten Stamms. 36
- Abb. 9: Fotografische Aufnahme des Biofilms von *Kyrpidia spormannii* nach 10 Tagen Inkubation. Der Biofilm ist als gräulicher Schleier auf der schwarzen Kathode zu erkennen. Die verwendete Graphitkathode ist 10 x 2 cm (L x B) groß. Die Fließrichtung des Mediums innerhalb der Fließzelle ist gekennzeichnet. 59
- Abb. 10: Strömungssimulation der verwendeten Fließzellen. Die Strömungslinien zeigen die resultierende Strömungsgeschwindigkeit des Mediums bei einem Volumenstrom von 100 ml min⁻¹, 0,5 mm oberhalb der Kathodenoberfläche (v_{0,5 mm}). Zusätzlich ist v_{0,5 mm} über die Länge der Kathode in einem Diagramm dargestellt. Die Messstellen der OCT-Aufnahmen sind mit A, B und C gekennzeichnet. Aus Hackbarth *et al.*, 2020. 60
- Abb. 11: Verlauf des ermittelten Biovolumens BV und des mittleren Biovolumens \overline{BV} von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. A, zeigt den Verlauf von BV für die einzelnen Messstellen der beiden Stämme, während B den Verlauf von \overline{BV} darstellt. Die Kurven

stellen einen polynomialen Fit (5. Ordnung) dar ($R^2 > 0,96$). Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.	61
Abb. 12: Verlauf der ermittelten Biofilm Akkumulationsrate BV^* (A) und die maximalen Biofilm Akkumulationsraten BV_{\max}^* bzw. \overline{BV}_{\max}^* (B) von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. BV^* wurde mithilfe der 1. Ableitung der BV-Polynome ermittelt. BV_{\max}^* bzw. \overline{BV}_{\max}^* sind für die einzelnen Messstellen ABC, sowie für die gemittelten Biovolumen-Werte abgebildet.	62
Abb. 13: Verlauf der Höhenprofile des Biofilms von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzell-Kultivierung. Gezeigt sind die Höhenprofile der Tage 0, 0,75, 1, 3, 5 und 10 für die jeweiligen Messstellen A, B, und C. Zu beachten sind die variierenden Legenden für die unterschiedlichen Messstellen, die in mm angegeben sind.	64
Abb. 14: Verlauf des Oberflächen-Rauheits-Koeffizient R_a^* des Biofilms von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. Die jeweiligen Werte der einzelnen Messstellen (ABC) wurden anhand der Auswertung der Höhenprofile ermittelt. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.	65
Abb. 15: Verlauf der mittleren Substratbedeckung \overline{SC} (A) und SC_{95} bzw. \overline{SC}_{95} (B) von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. Die jeweiligen Werte der einzelnen Messstellen (ABC) wurden anhand der Auswertung der Höhenprofile ermittelt. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.	66
Abb. 16: Verlauf der Stromdichte I_D und I_D/\overline{SC} der Fließzellensysteme von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Kultivierung. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.	67
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Graphitkathode (A) und von Biofilm-Flocken (B) des Biofilms nach 10 Tagen (10x-Objektiv). A. Nilrot-Färbung der Kathode. B. Nilrot- und DAPI-Färbung von entnommenen Biofilm-Flocken. Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle sind klein, deren Überlagerung groß dargestellt.	69
Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Graphitkathode mit Biofilms nach 10 Tagen (63x-Objektiv). A. Nilrot-Färbung der Kathode. B. Live/Dead-Färbung der Kathode. Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle sind klein, deren Überlagerung groß dargestellt.	70
Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von entnommenen Biofilm-Flocken nach 10 Tagen (100x-Objektiv). A. Nilrot- und DAPI-Färbung von entnommenen Biofilm-Flocken. B. Live/Dead-Färbung von entnommenen Biofilm-Flocken. Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle sind klein, deren Überlagerung groß dargestellt.	71
Abb. 20: Wachstumskurve des heterotrophen Wachstums von <i>K. spormannii</i> Stamm EAD und dem Wildtyp (WT). Die Kultivierung erfolgte dabei im Triplikat.	72
Abb. 21: Wachstumskurve des hydrogenotrophen Wachstums von <i>K. spormannii</i> Stamm EAD und dem Wildtyp (WT). H_2 diente hierbei als Elektronen- und Energiequelle, CO_2 war die einzige Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte dabei im Triplikat.	72
Abb. 22: Aufteilung der ermittelten Variationen, die mit einer Häufigkeit von über 10 % in der Population von Stamm EAD aufgetreten sind. SNVs – <i>single nucleotide variations</i> ; MNVs – <i>multiple nucleotide variations</i> ; Del. – Deletionen; Ins. – Insertionen.	75
Abb. 23: Häufigkeit mit der eine bestimmte Base der Referenz-Sequenz durch eine andere Base in den ermittelten Varianten mit einer Häufigkeit von über 10 % ersetzt wurde.	75
Abb. 24: A: Die absolute Variantenanzahl, die mit einer steigenden Häufigkeit auftreten. B: Eine genauere Unterteilung der Variationen die mit einer Häufigkeit von über 33% auftreten.	76
Abb. 25: Vorhergesagte Proteinstruktur von Acs2. Das Modell wurde anhand von Homologien zur Kristallstruktur der Acetyl-CoA Synthetase von <i>Salmonella typhimurium</i> (PDB-Nr. 2P2M) durch Swiss-Model erstellt. Rot: fehlende Aminosäure durch die Variation T425fs; Blau: Aminosäuren des aktiven Zentrums; Türkis: Produkt (Acetyl-CoA).	79

Abb. 26: Vorhergesagte Proteinstruktur von CVV_06825. Das Modell wurde anhand von Homologien zur Kristallstruktur von PerR aus <i>Bacillus subtilis</i> (PDB-Nr. 2RGV) durch Swiss-Model erstellt. A: Struktur des Homodimers von PerR. B: Detail-Aufnahme der Zink-Bindestelle mit den komplexierenden Cystein-Resten. C: Detailaufnahme der Zink-Bindestelle mit der Variation C137F.	81
Abb. 27: Schematische Darstellung des <i>hdr</i> -ähnlichen Genclusters von <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> AMDSBA1 mit der jeweiligen Sequenzidentität (in %) zu dem potentiellen Gencluster aus <i>K. spormannii</i> . Die Sequenzabdeckung war für alle untersuchten Proteine über 90 %. Nach Justice <i>et al.</i> , 2014.....	83
Abb. 28: Wachstumskurve von <i>Kyrpidia spormannii</i> WT und Stamm EAD unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen mit S ⁰ als Elektronen- und Energiequelle und O ₂ als Elektronenakzeptor. Die Änderung der Sulfat-Konzentration (ΔSO_4^{2-}) und der pH-Wert wurden aufgezeichnet. Die Kontrolle stellte ein abiotisches Experiment dar. Die Wachstumskurven wurden im Triplikate durchgeführt.	84
Abb. 29: Schematische Darstellung der von MurA katalysierten enzymatischen Reaktion. PEP – Phosphoenolpyruvat; P _i – anorganisches Phosphat.....	85
Abb. 30: SDS-Gele der Aufreinigung von His-MurA _{WT} (A) und His-MurA _{Mut} (B). Die Gele zeigen jeweils den Zellextrakt nach der Zellyse (CE, 30 µg Protein), den Überstand nach der Ultrazentrifugation (ÜS, 30 µg Protein), die Proteinfraction nach der Hitzefällung (20 µg Protein), den Durchfluss des His-Tag Aufreinigung (20 µg Protein) und die einzelnen Elutions-Fractionen (je 5 µg Protein). Die Größen des Markers (M) entsprechen dem Marker BlueStar Prestained Protein Marker und sind in kDa angegeben.....	87
Abb. 31: Auswertung der Aktivitätstests von MurA _{WT} (schwarz) und MurA _{Mut} (rot). Der Test wurde im Triplikate durchgeführt.	88
Abb. 32: Vorhergesagte 3D-Proteinstruktur von MurA aus <i>K. spormannii</i> (A) und die strukturellen Änderungen von MurA während der Reaktion (B). A: Die Struktur wurde mit SWISS-MODEL anhand der Strukturhomologien zu MurA1 aus <i>Bacillus anthracis</i> (PDB-Nr: 3SG1) erstellt. Der rote Pfeil deutet die Stelle an, in der sich die Mutation I233N befindet. B: Links: Offene, liganden-freie Form von MurA aus <i>Enterobacter cloacae</i> (PDB-Nr.: 1NAW) und geschlossene Form mit UDP-GlcNAc und Fosfomycin aus <i>Escherichia coli</i> (PDB-Nr.: 1UAE). Aus Barreteau <i>et al.</i> , 2008.	89
Abb. 33: Katalysierte Reaktion der potentiellen Pyruvat-Oxidase CVV_16300.	90
Abb. 34: Schematische Darstellung des nicht-kodierenden Bereichs zwischen den Genen CVV_07755 und CVV_07760 mit der Insertion der zwei Guaninen nach Nukleotid 1515328.	91
Abb. 35: Anzahl der CDS, die eine unterschiedliche Anzahl an Variationen besitzen.	92
Abb. 36: Schematische Darstellung des PHB-Synthese Genclusters in <i>B. megaterium</i> und der bisher identifizierten Gene in <i>K. spormannii</i> . <i>phaP</i> – Phasin; <i>phaQ</i> – Regulatorprotein; <i>phaR</i> – Regulatorprotein und Teil der PHA-Synthaseeinheit; <i>phaB</i> – Acetoacetyl-CoA Reduktase; <i>phaC</i> – PHA-Synthase. Die Gennummern des <i>phaR-phaB-phaC</i> – Genclusters aus <i>K. spormannii</i> sind als CVV_XXXXX angegeben.	96
Abb. 37: Vorhersage der α -Helices in der Aminosäuresequenz des Genprodukts von CVV_08500 aus <i>K. spormannii</i>	97
Abb. 38: Analysen der 3D-Strukturen des potentiellen PhaP von <i>K. spormannii</i> (PhaP _{Ksp}). A: Vorhergesagte 3D-Struktur anhand des PhaPs von <i>Aeromonas hydrophila</i> (PhaP _{Ahy}). B: Analyse der Oberflächen-Hydrophobizität von PhaP _{Ksp} und PhaP _{Ahy}	98
Abb. 39: Schematische Darstellung des potentiellen PHB-Synthese Genclusters in <i>K. spormannii</i> . <i>phaP</i> – Phasin; <i>phaQ</i> – Regulatorprotein; <i>phaR</i> – Regulatorprotein und Teil der PHA-Synthaseeinheit; <i>phaB</i> – Acetoacetyl-CoA Reduktase; <i>phaC</i> – PHA-Synthase. Die jeweiligen Gennummern sind als CVV_XXXXX aus <i>K. spormannii</i> angegeben.	98

Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Nilrot-gefärbten <i>E. coli</i> BL21 pBAD202_phaA_phaQPRBC (A) und eines <i>E. coli</i> BL21 Wildtyps (B).....	99
Abb. 41: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> pT7blue_ P _{Met} -FFTS-YFP _{Ksp}	102
Abb. 42: Wachstumskurven von <i>E. coli</i> BL21 pT7blue_ P _{Nat} -TK101 _{Ksp} und <i>E. coli</i> BL21 pT7blue_ P _{Met} -TK101 _{Ksp} mit 50 µg ml ⁻¹ (Kan50) und ohne (-) Kanamycin. Als Kontrolle diente <i>E. coli</i> BL21 WT.	103
Abb. 43: Restriktions-/Modifikationssystem Typ I von <i>Kyrpidia spormannii</i> . A: Darstellung der Gene des R-/M-Systems im Genom von <i>K. spormannii</i> : Methylierungsuntereinheit (<i>M.KspEAI1</i>), Spezifitätsuntereinheit (<i>S.KspEAI1</i>) und Restriktionsuntereinheit (<i>KspEAIIP</i>) mit deren jeweiligen Gen-Nummern (als <i>CVV_XXXXX</i>). B: Erkennungssequenz des R/M-Systems mit den methylierten Adenosinen (m6A-Methylierung).....	105
Abb. 44: Schematische Darstellung der Klonierung des Methylierungs- bzw. <i>host-mimicking</i> -Plasmids pMET-MS. Die Klonierung erfolgte dabei in zwei Schritten: Zuerst wurden die Methylierungs- und Spezifitäts-Untereinheiten des R-/M-Systems fusioniert und in den Vektor pBAD202 kloniert (pBAD-MS). Anschließend wurde dessen Kanamycin-Resistenzgen (<i>kanR</i>) und der <i>high-copy</i> -Ori <i>colE1</i> durch das Chloramphenicol-Resistenzgen (<i>chlR</i>) und den <i>low-copy</i> -Ori <i>p15A</i> ersetzt, um schließlich pMET-MS zu erhalten.	106
Abb. 45: Dot-Blot Test einiger Transformationsplasmide. Die Nitrocellulosemembran zeigt Plasmide, die in dem Methylierungsstamm durch eine Induktion von pMET-MS methyliert wurden (Ind.). Als Kontrollen wurden die Plasmide eines nicht-induzierten Methylierungsstamms (UI), PCR-Produkt und ddH ₂ O aufgetragen.....	107
Abb. 46: Phasenkontrast-Mikroskopie der Protoplasten-Generierung in <i>K. spormannii</i> nach 22 h. ..	108
Abb. 47: Schematische Darstellung eines Biofilm-Reliefs von Stamm EAD und dem Wildtyp (WT). Sie zeigt die unterschiedliche kleinste Höhe der Biofilme und die daraus resultierenden Sauerstoff-Diffusionstrecken.	116
Abb. 48: Schematische Darstellung eines potentiellen schwefel-basierten Elektronenaufnahmemechanismus von <i>K. spormannii</i> . Eine oxidierte Schwefelverbindung (S _{ox}) wird mithilfe kathodischer Elektronen zu einer reduzierten Schwefelverbindung (S _{red}) reduziert. Diese werden auf bisher noch unbekannte Weise als Persulfid-Gruppe (-SSH) an den Cysteinrest eines cytoplasmatischen Proteins übertragen. Das Persulfid wird durch den HDR-Komplex zu einer Sulfid-Gruppe (-SH) und Sulfid oxidiert. Der Elektronenakzeptor des HDR-Komplexes ist momentan noch nicht genau geklärt, jedoch wird von NAD ⁺ oder dem Quinonpool (Q → QH ₂) ausgegangen. Nach Cao <i>et al.</i> , 2018.	121
Abb. 49: Verlauf der ermittelten Rauheitskoeffizienten R _a [*] von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung für die einzelnen Messstellen A, B und C. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist gekennzeichnet.....	147
Abb. 50: Verlauf der ermittelten Substratbedeckung SC von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung für die einzelnen Messstellen A, B und C. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist gekennzeichnet.....	147
Abb. 51: Plasmidkarte von pASK-IBA43plus_ his-murA (WT/Mut).....	149
Abb. 52: Plasmidkarte von pBAD202_ phaA_ phaPQRBC.....	150
Abb. 53: Sequenz von P _{Nat} -TK101 _{Ksp} . Die Sequenz von P _{Nat} ist grau hinterlegt. Die restliche Sequenz bildet die codon-optimierte Sequenz von TK101.....	151
Abb. 54: Sequenz von P _{Met} -FFTS-YFP _{Ksp} . Die Sequenz von P _{Met} ist grau hinterlegt. Die restliche Sequenz bildet die codon-optimierte Sequenz von FFTS-YFP.....	151
Abb. 55: Plasmidkarte von pG1A_ P _{Met} -TK101 _{Ksp} bzw. _P _{Nat} -TK101 _{Ksp}	152
Abb. 56: Plasmidkarte von pG2A_ P _{Met} -TK101 _{Ksp} bzw. _P _{Nat} -TK101 _{Ksp}	152

Abb. 57: Plasmidkarte von pNW33N__{Met}-TK101_{Ksp} bzw. _{Nat}-TK101_{Ksp}..... 153

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Die Stammbezeichnung und der relevante Genotyp beziehen sich auf die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften.	28
Tab. 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	29
Tab. 3: Zusammensetzung des <i>Lysogeny-Broth</i> Mediums (LB, nach Lennox). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.	30
Tab. 4: Zusammensetzung des 2xYT-Mediums. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. .	30
Tab. 5: Zusammensetzung des TB _{Gluk} -Mediums. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt..	31
Tab. 6: Zusammensetzung des RR2A Mediums. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6 eingestellt.....	31
Tab. 7: Zusammensetzung des ES Mediums. Der pH-Wert betrug 3,5.	32
Tab. 8: Zusammensetzung des Wolfe's mineral elixirs. Der pH wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf 1 eingestellt.	32
Tab. 9: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Herstellung der einzelnen Plasmide.	40
Tab. 10: Zusammensetzung eines präparativen PCR-Ansatzes. Standardmäßig wurde ein 50 µl Ansatz verwendet.	41
Tab. 11: Zusammensetzung eines analytischen PCR-Ansatzes. Es wurde standardmäßig ein 15 µl Ansatz verwendet.	42
Tab. 12: Zyklisches Temperaturprotokoll der analytischen und präparativen PCR. Dabei wurden die Schritte 2-4 im Thermocycler 29-30 mal wiederholt.	42
Tab. 13: Zusammensetzung eines 50 µl-Restriktionsansatzes.	42
Tab. 14: Zusammensetzung des TAE-Puffers. Der pH wurde mit Hilfe von Essigsäure auf 8,0 eingestellt.	43
Tab. 15: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die isothermale <i>in-vitro</i> Ligation.....	44
Tab. 16: Zusammensetzung des 5x-Reaktionspuffers für die isothermale <i>in-vitro</i> Ligation.	44
Tab. 17: Zusammensetzung von 2x SMM Puffer. Der pH wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt.....	47
Tab. 18: Zusammensetzung von RR2A _{reg} Medium.	47
Tab. 19: Zusammensetzung des Sepiolith-Puffers. Der pH wurde mit KOH auf 6,3 eingestellt.	48
Tab. 20: Zusammensetzung des HEPES-Puffers. Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.	49
Tab. 21: Zusammensetzung der Bradford-Reagenz. Die Substanzen wurden in der Reihenfolge von unten nach oben zugesetzt und filtriert.....	50
Tab. 22: Zusammensetzung des 6x Ladepuffers für die SDS-PAGE.....	51
Tab. 23: Zusammensetzung der diskontinuierlichen SDS-Gele. Die Angaben sind angegeben für 1 kleines Gel.....	52
Tab. 24: Zusammensetzung von 1 l des SDS-Laufpuffers (10x). Der pH wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt.	52
Tab. 25: Zusammensetzung der Färbelösung. Die einzelnen Komponenten wurden in 0,7 M HCl gelöst und durch ein Whatman-Paper filtriert. Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.	53
Tab. 26: Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Ni ²⁺ -IMAC. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.	53
Tab. 27: Zusammensetzung des PBS-Puffers (pH 7,4).	54

Tab. 28: Ergebnisse der Variantendetektion der Variationen mit einer Häufigkeit von über 33 %. Die Nummerierung der Nukleotide (Nt-Nr.) und die Annotationen beziehen sich auf das sequenzierte und annotierte Genom von <i>K. spormannii</i> (GenBank: CP024955.1). CR – coding region (engl. für kodierende Region); AS – Aminosäure.....	77
Tab. 29: Ergebnis der Blast-Analyse von <i>mfd</i> (CVV_00395). Es sind die ersten beiden signifikanten Treffer gezeigt.	77
Tab. 30: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in <i>mfd</i> (CVV_00395). Es sind die ersten beiden Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer gezeigt.	77
Tab. 31: Ergebnis der Blast-Analyse von <i>acs2</i> (CVV_05350). Es sind die ersten beiden signifikanten Treffer gezeigt.	78
Tab. 32: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in <i>acs2</i> (CVV_05350). Es sind die ersten drei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer gezeigt.	79
Tab. 33: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in CVV_06825. Es sind die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen, mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer gezeigt.	80
Tab. 34: Ergebnis der Blast-Analyse von CVV_06825. Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.	80
Tab. 35: Ergebnis der Blast-Analyse von CVV_12480. Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.	82
Tab. 36: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in CVV_12480. Es sind die ersten drei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer gezeigt.	82
Tab. 37: Ergebnis der Blast-Analyse von <i>murA2</i> (CVV65_15980). Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.	85
Tab. 38: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in <i>murA2</i> (CVV65_15980). Es sind die ersten drei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer gezeigt.	85
Tab. 39: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in Genen, die eine stille Mutation tragen. Die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer sind gezeigt. Es sind lediglich Treffer mit e-Werten unter e^{-10} aufgeführt.	90
Tab. 40: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen der Gene, die sich vor bzw. nach einer Variation in einem nicht-kodierenden Bereich befinden. Die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen, mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer sind gezeigt. Es sind lediglich Treffer mit e-Werten unter e^{-10} aufgeführt.	91
Tab. 41: Übersicht der ermittelten Daten der Variationen mit einer hohen Mutationsrate. Die hier aufgeführte Zusammenfassung der Proteindomänenanalysen ist im Anhang, Tab. 44 genauer erläutert.	93
Tab. 42: Verwendete Primer für die Klonierung der Transformationsplasmide.	104
Tab. 43: Ergebnis der Blast-Analyse der Gene des HDR-Komplexes aus <i>K. spormannii</i> . Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.	148
Tab. 44: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in Genen, die eine hohe Mutationsrate aufweisen. Die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen accession-Nummer sind gezeigt. Es sind lediglich Treffer mit e-Werten unter e^{-5} aufgeführt.	149

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BES	Bioelektrochemisches System
CA	Chronoamperometrie
cDNA	Komplementäre DNA
CDS	Kodierende Sequenz (<i>engl.: coding sequence</i>)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _x -Körper	Kohlenstoffgerüst mit X-Kohlenstoffatomen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Del.	Deletion (Variationstyp)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ΔH_f^0	Standardbildungsenthalpie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
E ^{0'}	Standard-Redoxpotential
eDNA	Extrazelluläre DNA
EET	Extrazellulärer Elektronentransport
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fd	Ferredoxin
g	Erdbeschleunigung
gDNA	Genomische DNA
GtCO ₂ e	Emittiertes Kohlenstoffdioxid in Gigatonnen
H ⁺	Proton
HDR	Heterodisulfidreduktase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I _D	Stromdichte
IC	Ionenchromatographie
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
Ins.	Insertion (Variation)
(k)Da	(kilo)Dalton

LSV	Lineare Voltammetrie
MFC	Mikrobielle Brennstoffzelle
MES	Mikrobielle Elektrosynthese
MET	Mikrobielle elektrochemische Technologie
MNV	<i>Multiple nucleotide variation</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NAD ⁺ /NADH	Oxidierte/reduzierte Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
Nt	Nukleotid
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Ori	<i>Origin of replication</i> ; Replikationsursprung
P _i	Anorganisches Phosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEGX	Polyethylenglykol der Molekülmasse X
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Poly-(3)-hydroxybutyrat
R/M-System	Restriktions-/Modifikationssystem
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHE	<i>Standard hydrogen electrode</i>
SNV	<i>Single nucleotide variation</i>
tRNA	<i>Transfer RNA</i>
UDAG	UDP-N-Acetylglucosamin
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vs.	Versus
WT	Wildtyp

I. Einleitung

1.1. Das Treibhausgas Kohlenstoffdioxid

Das Pariser Klimaabkommen aus dem Jahr 2015 ist ein Projekt der Klimarahmenkonvention der Vereinten Nationen mit dem Ziel, den anthropogenen Klimawandel und die damit verbundene globale Erwärmung nicht höher als 2 °C bzw. 1,5 °C gegenüber des vorindustriellen Niveaus steigen zu lassen. Das *Zwei-Grad-Ziel* ist dabei das vorgegebene Ziel des Abkommens. Zusätzlich soll aber auch die Vermeidung einer Erhöhung von 1,5 °C verfolgt werden, um die Risiken des Klimawandels zu verringern (FCCC, 2015). Das Abkommen wurde bis heute von 187 Nationen ratifiziert und die jeweiligen national festgelegten Beiträge (*nationally determined contributions*, NDCs) zum Erfüllen dieses Abkommens festgehalten (United Nations Treaty Collection, 2019). Ungeachtet dieser nationalen Bemühungen erreichten die globalen Treibhausgasemissionen im Jahr 2018 jedoch einen neuen Höchststand von 55,3 GtCO₂e (Olhoff und Christensen, 2019).

Zu den Treibhausgasen, welche den größten Einfluss auf den anthropogenen Klimawandel haben, gehören Fluorkohlenwasserstoffe, Methan (CH₄), Stickstoffmonoxid (N₂O) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) (Abb. 1). Letzteres gilt in seiner heutigen Abundanz als das mit Abstand klimaschädlichste Treibhausgas (Hofmann *et al.*, 2006). Innerhalb der letzten 800.000 Jahre war die atmosphärische CO₂ Konzentration – wie die von CH₄ und N₂O – nie höher als heute. Im Zeitraum zwischen 1750 und 2011 stieg die CO₂-Konzentration um etwa 40 % auf eine Konzentration von circa 400 ppm an (IPCC, 2014; Friedlingstein *et al.*, 2019; Kuramochi *et al.*, 2019; Olhoff und Christensen, 2019). Insbesondere seit Ende des 19. Jahrhunderts, und speziell ab den 1950er Jahren ist ein besonders starker Anstieg der CO₂-Konzentration zu verzeichnen (Friedlingstein *et al.*, 2019). Dies ist nachweislich vor allem auf die Nutzung fossiler Brennstoffe und die exzessive Landnutzung des Menschen zurückzuführen, weshalb der beobachtete Klimawandel und die damit verbundene globale Erwärmung als anthropogenen Ursprungs gilt (IPCC, 2013, 2014).

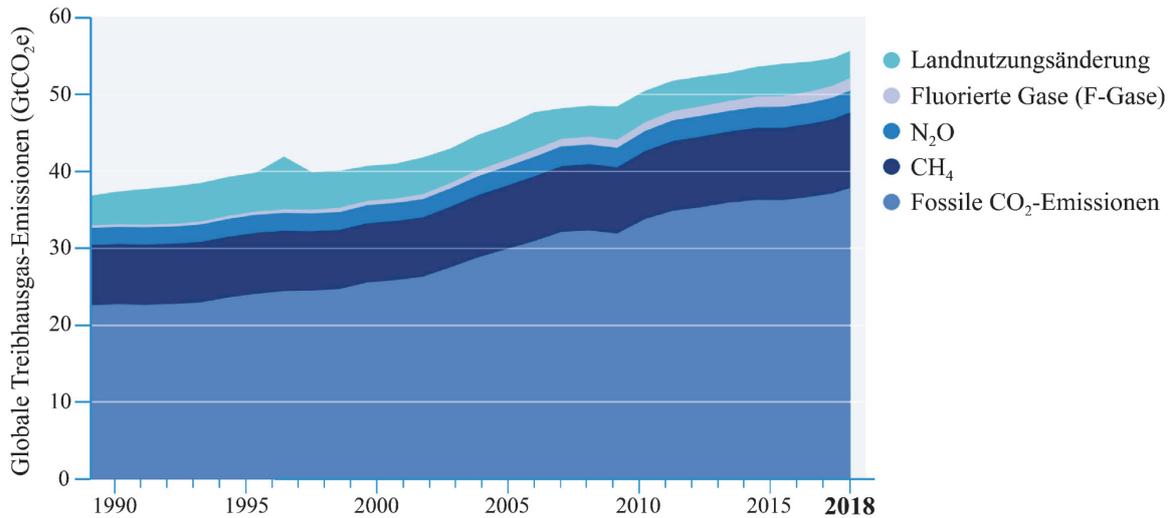


Abb. 1: Globale Treibhausgas-Emissionen im Zeitraum von 1989 bis 2018. Es sind die fünf schädlichsten Treibhausgase aufgeführt, wozu fluorierte Gase (F-gase), Stickstoffmonoxid (N₂O), Methan (CH₄) und fossile CO₂-Emissionen gehören, sowie die Emissionen, die durch die Landnutzungsänderung entstehen. Die angegebenen absoluten Mengen der Treibhausgase sind in ihrem GtCO₂-Äquivalent angegeben. Verändert nach Kuramochi *et al.*, 2019.

Nach heutigen Angaben würden die angestrebten NDCs für eine Erhöhung der weltweiten Temperaturen um 3,2 °C sorgen und damit das 2 °C-Ziel klar verfehlen. Besorgniserregend ist dabei, dass ein Großteil der G20 Staaten, die für 78 % der weltweiten Emissionen verantwortlich sind, laut UN-Angaben selbst diese angestrebten NDCs vermutlich nicht erreichen werden (Olhoff und Christensen, 2019). Aus diesem Grund muss sich die momentane Abhängigkeit unserer Gesellschaft von fossilen Brennstoffen radikal ändern, wenn die Klimaziele erreicht werden sollen. Je später dabei gehandelt wird, desto radikaler muss dieser Wechsel zu erneuerbaren Energien und energieeffizienteren Systemen vollzogen werden. Auch die angestrebte CO₂-Neutralität von Industrien, die stark von kohlenstoff-haltigen Rohstoffen abhängig sind, sollte schneller voranschreiten (TWI2050, 2019). CO₂-haltige Abgasströme, die heute noch als Abfallprodukte gelten, müssen als Rohstoff angesehen werden, damit eine Abkehr des heutigen linearen „one-way cradle to grave manufacturing model“ (Peterson, 2004) hin zu einer zirkulären Kohlenstoffwirtschaft möglich wird (Europäische Kommission, 2015; Lee, Keller, *et al.*, 2017; Lee, Wolfersdorf, *et al.*, 2017).

1.2. Der Rohstoff Kohlenstoffdioxid

Das Ziel einer Wertschöpfungskette, in der Kohlenstoffdioxid (CO₂) als Rohstoff eingesetzt wird, ist, den darin gebundenen Kohlenstoff wieder als Ausgangsrohstoff für die chemische Industrie oder biologischen Prozessen zur Verfügung zu stellen. Bei letzterer kann es sich dabei um eine Reintegration in umweltbiologische Systeme oder die biotechnologische Nutzung derer handeln. Obwohl es verschiedene Konzepte gibt, emittiertes CO₂ zu speichern (engl.: *Carbon Capture and Storage, CCS*), liegt vermehrt der wissenschaftliche und gesellschaftliche Fokus auf sogenannten CCU-Technologien (engl.: *Carbon Capture and Utilisation*) (Koch *et al.*, 2016). Deren Hauptaugenmerk liegt nicht auf der Speicherung von emittiertem CO₂, sondern auf einem reduzierten Verbrauch fossiler Ressourcen. Somit könnte CO₂ als industrieller Rohstoff verwendet werden, und es würde ein technischer Kohlenstoffkreislauf entstehen. Dabei stellen jedoch die chemischen Eigenschaften von Kohlenstoffdioxid die größten Herausforderungen bei der stofflichen Nutzung von CO₂ dar. Es handelt sich bei CO₂ aus thermodynamischer Sicht um ein sehr reaktionsträges Molekül mit einer Standardenthalpie ΔH_f° von -396 kJ mol⁻¹ (Aresta *et al.*, 2014). Bis auf die Herstellung von Carbonaten aus CO₂ bedarf es dadurch bei der Nutzung von CO₂ einer relativ hohen Aktivierungsenergie (Aresta *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017). Dafür sind meist spezielle Technologien und Katalysatoren von Nöten, welche die Aktivierungsenergien senken und somit die Reaktion bei geeigneten Temperaturen ermöglichen (Koch *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017). Eine der größten Herausforderungen für neue Technologien im Bereich der Umsetzung von CO₂ ist daher auch die unzureichende katalytische Aktivität und/oder Langlebigkeit der momentan verwendeten Katalysatoren (Zheng *et al.*, 2017). Heutzutage wird meist Wasserstoff (H₂) als Energieträger für die Reduktion von CO₂ genutzt. Weitere Energieträger können jedoch auch Wärme, Licht oder Elektrizität sein. Allerdings muss erwähnt werden, dass photo- und elektrochemische Reduktionstechnologien noch Probleme bei der Selektivität und der Ausbeute haben (Koch *et al.*, 2016).

Chemische Verfahren zur Nutzung von CO₂ gab es schon in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts. Viele von ihnen setzen in erster Linie auf die initiale Herstellung von Synthesegas (CO/H₂), hergestellt aus CO₂ und – im ökologisch besten Falle „grünem“, also nachhaltig produziertem – Wasserstoff. Synthesegas dient vor allem in der sogenannten Fischer-Tropsch-Synthese für die Herstellung von verschiedenen Kohlenwasserstoffen wie Benzin, Diesel oder Heizöl. Dabei wird das gewünschte Produkt in dieser Reaktion durch Syntheseparameter wie Temperatur und Druck eingestellt (Kelly, 2018). Die Wirtschaftlichkeit

dieser Synthese wird momentan jedoch durch unzureichende Reinheit der Produkte verhindert. Synthesegas kann ebenfalls als Ausgangsrohstoff zur Methanolsynthese verwendet werden. Solche Anlagen sind schon heutzutage in Gebrauch, beispielsweise auf Island, wo sie an ein Geothermiekraftwerk gekoppelt sind (Marlin *et al.*, 2018). Nachhaltig produziertes Methanol ist vor allem als Kraftstoff bzw. Energiespeicher interessant. Weitere Synthesen, bei denen CO₂ als Edukt eingesetzt werden kann, sind beispielsweise die Synthese von Methan, Formiat, Harnstoff oder verschiedenen Polymeren wie Polypropylencarbonat (PPC) oder Polyethercarbonatpolyol (PECP) (Aresta *et al.*, 2014; France *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017). Die größten Probleme mit denen chemische Verfahren jedoch zu kämpfen haben sind die teilweise noch geringe Ausbeuten und die Entstehung unerwünschte Nebenprodukte (Kruse *et al.*, 2015). Außerdem müssen die Edukte, allen voran die CO₂-Quellen eine relativ hohe Reinheit aufweisen um eine Vergiftung des Katalysators zu vermeiden, wodurch oftmals sehr aufwendige und kostenintensive Aufreinigungsschritte erforderlich sind (Kruse *et al.*, 2015). Außerdem kommt hinzu, dass momentan die Preise für CO₂ zu niedrig und für „grünen“ Wasserstoff zu hoch sind, sodass die Verfahren aus wirtschaftlicher Sicht unrentabel sind (Koch *et al.*, 2016).

1.3. Biotechnologische Nutzung von CO₂

Eine weitere Möglichkeit zur Nutzung von CO₂ bieten biologische bzw. biotechnologische Verfahren. Ein deutlicher Vorteil gegenüber chemischen Verfahren ist die besondere Robustheit von Biokatalysatoren gegenüber Verunreinigungen in verwendeten CO₂-haltigen Abgasströmen. Dies ist vor allem auf die Spezifität und Selektivität der im Metabolismus aktiven Enzyme zur CO₂-Fixierung zurückzuführen (Zheng *et al.*, 2017). Dadurch ergibt sich der Vorteil, dass ein biotechnologischer Prozess direkt an der jeweiligen Emissionsquelle eingesetzt werden kann.

Dabei muss unterschieden werden zwischen Spezies, die in der Lage sind CO₂ aufzunehmen, und solchen die in der Lage sind dieses als alleinige Kohlenstoffquelle zu benutzen (Hu *et al.*, 2019). Organismen, die zu letzterem befähigt sind, werden auch als „autotroph“ (altgriech. *autos* „selbst“ und *trophe* „Ernährung“) bezeichnet. Die wohl herkömmlichste biologische Nutzung bietet die CO₂ Fixierung von Pflanzen mithilfe der Photosynthese. Licht liefert hierbei die Energie für die Reduktion von CO₂, weswegen man von Photo(auto)trophie (altgriech. *phos* „Licht“) spricht. Die Biomasse dieser Energiepflanzen kann, je nach Pflanze, anschließend genutzt werden um Biokraftstoffe wie Biodiesel oder Bioethanol herzustellen, oder verbrannt

werden um Energie und/oder Wärme zu gewinnen (Koch *et al.*, 2016). Außerdem werden auch photosynthetisch aktive, aquatische Organismen wie Makro- und Mikroalgen oder Cyanobakterien biotechnologisch genutzt, da sie eine wesentlich höhere Wachstumsrate als Landpflanzen besitzen, nicht in Konkurrenz mit landwirtschaftlichen Flächen zum Anbau von Nutzpflanzen stehen und höherwertige Produkte herstellen können, teilweise durch genetische Manipulationen des Metabolismus einzelner Organismenarten (Claassens *et al.*, 2016). Für verschiedene Algen haben sich schon einige industrielle Anwendungen ergeben, sowie Planungen für die nächste Generation von Pilotanlagen zur Produktion von Biomasse, Biokraftstoffen oder anderen Basischemikalien (Fischedick *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2016). Ein Problem, welches oft die Wirtschaftlichkeit solcher Anlagen mindert, ist die konstante Umwälzung der Algensuspension um eine ausreichende Lichtzufuhr zu gewährleisten und ein Biofouling zu vermeiden (Reis und Da Silva, 2016).

Eine weitere Möglichkeit zur biotechnologischen Nutzung stellen nicht-photosynthetisch aktive, aber dennoch autotrophe Bakterien und Archaeen dar. Sie nutzen die Energie aus der Oxidation chemischer Verbindungen für die Reduktion von CO₂. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer chemoautotrophen Lebensweise (Fuchs *et al.*, 2017). In den meisten Fällen sind es anorganische Verbindungen, die ihnen als Energie- und Elektronenquelle dienen, wie Fe²⁺, HS⁻, NH₄⁺, S⁰ oder H₂ (Amils, 2011). Besonders die biotechnologische Nutzung H₂-oxidierender (hydrogenotropher) Mikroorganismen rückte in den letzten Jahren ins Interesse der wissenschaftlichen Forschung, denn besonders wenn die Produktion von nachhaltig produziertem Wasserstoff ökonomisch sinnvoll wird, würden sich hier eine Reihe von Anwendungen für Mikroorganismen als Biokatalysatoren bieten (Kumar *et al.*, 2018; Thakur *et al.*, 2018). Erste Anlagen setzen dabei auf die Gasfermentation, insbesondere von Synthesegas (Takors *et al.*, 2018). Die Firma Lanzatech Inc. nutzt beispielsweise das acetogene Bakterium *Clostridium autoethanogenum* für die Produktion von Ethanol oder 2,3-Butandiol aus Abfall-Gasströmen eines Stahlwerks (Takors *et al.*, 2018).

1.3.1. CO₂-Fixierungswege in der Biotechnologie

Bei der biologischen CO₂-Fixierung gibt es einige Unterschiede in der Art wie Organismen CO₂ assimilieren. Es sind bis heute sechs biologische Stoffwechselwege bekannt, die Organismen zur CO₂ Fixierung befähigen, jedoch wird davon ausgegangen, dass noch weitere, bislang unbekannte Varianten oder auch neue Wege dafür existieren (Claassens *et al.*, 2016; Mall *et al.*, 2018). An dieser Stelle soll nun auf die zwei Wege eingegangen werden, die in der biotechnologischen Anwendung am weitesten verbreitet sind: Der Calvin-Zyklus und der Wood-Ljungdahl-Weg (Abb. 2). Die weiteren CO₂-Fixierungswege sind in biotechnologisch genutzten Mikroorganismen bisher kaum in Erscheinung getreten (Claassens *et al.*, 2016). Auch synthetische Wege, welche die Schwächen der bisher bekannten Fixierungsarten verbessern, indem sie beispielsweise Enzyme aus verschiedenen Wegen kombinieren und damit eine effizientere Arbeitsweise der CO₂-Fixierung ermöglichen, sind Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung (Bar-Even *et al.*, 2010; Schwander *et al.*, 2016; Claassens, 2017; Liang *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019).

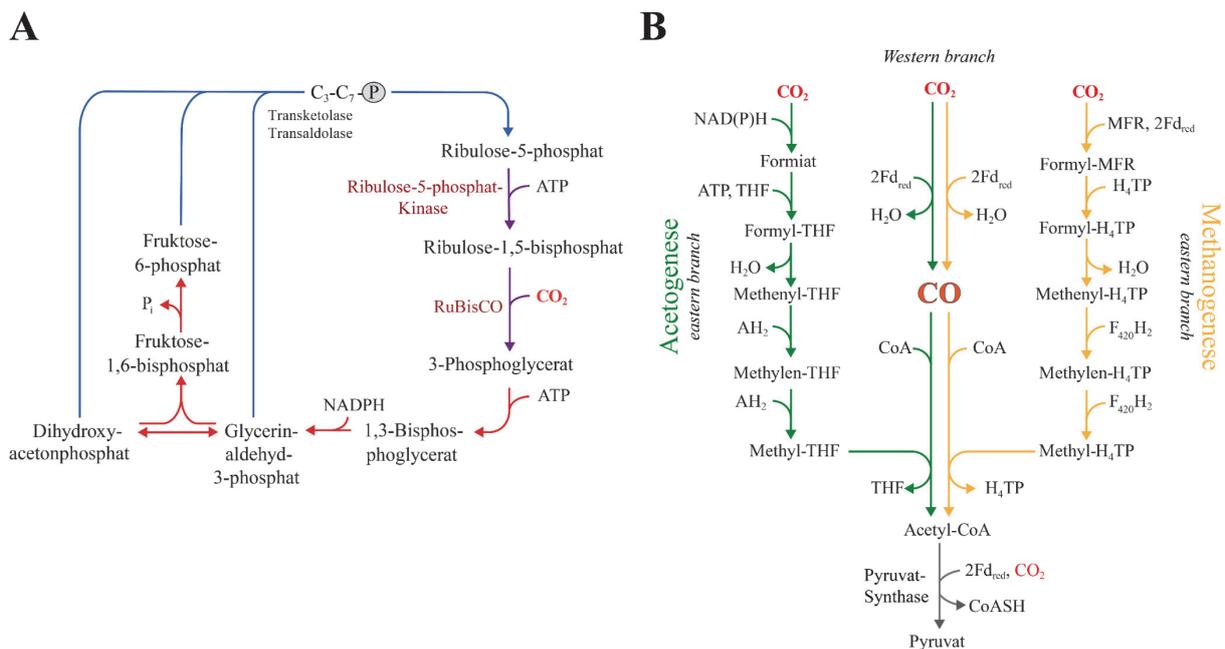


Abb. 2: Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus (A) und des Wood-Ljungdahl-Wegs (B). In der Darstellung (A) des Calvin-Zyklus sind die beiden Schlüsselreaktionen durch die Ribulose-5-Phosphat-Kinase und die RuBisCO in Lila, die Schritte, die Teil der Gluconeogenese sind, in Rot und Teile des Pentose-Phosphat-Weg in Blau dargestellt. Die Schritte in blau werden von der Transketolase und der Transaldolase katalysiert. In (B) sind die Schritte der Acetogenese in Grün und die der Methanogenese in Gelb dargestellt. Verändert nach (Bar-Even *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2017; Reiner, 2019). THF – Tetrahydrofolat; AH₂ – reduzierter Elektronendonator; F_{d,red} – reduziertes Ferredoxin; MFR – Methanofuran; H₄TP – Tetrahydromethanopterin oder Tetrahydrosarcinopterin.

Calvin-Benson-Bassham-Zyklus

Der Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (kurz: Calvin-Zyklus) ist der quantitativ wichtigste CO₂ Fixierungsweg auf der Erde. Über 90 % des anorganischen Kohlenstoffs wird durch das Schlüsselenzym, die RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) fixiert (Berg, 2011; Erb und Zarzycki, 2018). Der Calvin-Zyklus kommt in allen grünen Pflanzen, Cyanobakterien, phototrophen Purpurbakterien und den meisten aeroben oder fakultativ anaeroben, autotrophen Bakterien vor (Berg *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2017).

Der Zyklus ist in drei Schritte eingeteilt: Im ersten Schritt katalysiert die RuBisCO die elektrophile Addition von CO₂ an Ribulose-1,5-Bisphosphat (Ru-1,5-BP) (siehe Abb. 2A) (Berg, 2011; Berg *et al.*, 2013). Das dabei entstehende, instabile Endiolat-Zwischenprodukt hydrolysiert anschließend zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (3-PG). Der zweite Schritt besteht aus der Aktivierung und Reduktion von 3-PG zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) unter ATP- und NADPH-Verbrauch. Daraus können in der Gluconeogenese Hexosemonophosphate aufgebaut werden. Im dritten Teil des Calvin-Zyklus wird mit Ru-1,5-BP das Akzeptormolekül der RuBisCO wieder regeneriert. Dafür wird Fruktose-6-Phosphat zusammen mit GAP und dessen Isomer Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) im reduktiven Teil des Pentose-Phosphat-Weges umgesetzt (Berg *et al.*, 2013). Diese Zuckerumwandlungsreaktion wird insbesondere von den beiden Enzymen Transaldolase und Transketolase katalysiert. Schlussendlich entsteht über verschiedene C₃-C₇-Phosphat Intermediate Ribulose-5-Phosphat. Dieses wird durch das zweite Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus, die Ribulose-5-phosphat-Kinase zu Ru-1,5-BP phosphoryliert (Fuchs *et al.*, 2017).

Ihrer Benennung entsprechend, hat die RuBisCO jedoch eine entscheidende Schwachstelle: ihre Oxygenase-Nebenaktivität. Das durch die Reaktion mit O₂ entstehende 2-Phosphoglykolat ist toxisch für Zellen, da es essentielle Stoffwechsellzyme, wie die Phosphofruktokinase oder die Triosephosphat-Isomerase inhibiert. Bei der Rückführung von zwei 2-Phosphoglykolat-Molekülen in den Metabolismus, der sogenannten Photorespiration, geht ein C-Atom als CO₂ verloren und stellt damit einen beträchtlichen Kohlenstoffverlust für die Zelle dar (Berg *et al.*, 2013). Der Erfolg des Calvin-Zyklus ist wohl darauf zurückzuführen, dass seine Enzyme – trotz seiner Reaktion mit Sauerstoff –, im Gegensatz zu anderen CO₂-Fixierungswegen, sehr robust gegenüber molekularem Sauerstoff sind. Außerdem erlaubt seine strikte Trennung vom zentralen Metabolismus eine effektivere Regulation (Berg, 2011). Diese beiden Eigenschaften, zusammen mit der Tatsache, dass es sich bei dem Produkt des Calvin-Zyklus mit 3-PG um

einen C₃-Körper handelt, machen den Calvin-Zyklus auch für biotechnologische Prozesse interessant.

Reduktiver Acetyl-CoA-Weg

Im Gegensatz zum Calvin-Zyklus kommt der Reduktive Acetyl-CoA-Weg (oder Wood-Ljungdahl-Weg) nur in strikt anaeroben Mikroorganismen vor. Dazu gehören methanogene Archaea und acetogene Bacteria, einige sulfat- und eisenreduzierende, sowie ammoniumoxidierende Bacteria (Berg, 2011; Fuchs *et al.*, 2017). Besonders bei methanogenen und acetogenen Mikroorganismen gilt dieser Weg als ein „Leben am thermodynamischen Limit“, da die Energieausbeute relativ gering ist (Schuchmann und Müller, 2014; Prakash *et al.*, 2019). Dies kann nur durch die hohe Umsatzrate dieser Organismen kompensiert werden. Daraus folgen auch die relativ hohen CO₂-Konzentrationen, die sie zur Energiegewinnung benötigen. In diesem Weg wird die Reduktion von zwei Molekülen CO₂ zusätzlich an die Energiekonservierung in Form eines elektrochemischen Gradienten gekoppelt, weswegen es auch als CO₂-Atmung bezeichnet wird (Berg, 2011).

Der Wood-Ljungdahl Weg kann in zwei Zweige gegliedert werden (*eastern* und *western branch*), in denen jeweils ein Molekül CO₂ reduziert wird (siehe Abb. 2B) (Saini *et al.*, 2011). Im *eastern branch* (auch *methyl branch*, „Methyl-Zweig“) von acetogenen Bacteria, wird eines davon unter ATP-Verbrauch an Tetrahydrofolat (THF) gebunden und mithilfe von NAD(P)H und reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}) zu einer Methylgruppe reduziert. Der Unterschied zu methanogenen Archaea besteht darin, dass hier das CO₂-Molekül unter der Zuhilfenahme von Fd_{red} an den Cofaktor Methanofuran (MFR) gebunden und anschließend an Tetrahydromethanopterin oder Tetrahydrosarcinopterin weitergegeben wird (Berg, 2011). Währenddessen wird im *western branch* (auch *carbonyl branch*, „Carbonyl-Zweig“) das zweite CO₂ Molekül, gebunden an das Nickelatom einer CO-Dehydrogenase, zu Kohlenstoffmonoxid (CO) reduziert. Diese CO Dehydrogenase befindet sich in einem Komplex mit einer Acetyl-CoA Synthase, welche die Methylgruppe des *eastern branch* zusammen mit der CO-Gruppe und Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA kondensiert (Berg *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2017). Diese CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase ist das Schlüsselenzym des Wood-Ljungdahl-Wegs. Um Biomasse aufzubauen wird Acetyl-CoA mithilfe der Pyruvat-Synthase zu Pyruvat umgesetzt (Berg, 2011). Für die Energiegewinnung unterscheiden sich die beiden CO₂-Atmungen zwar, beruhen jedoch in beiden Fällen in gewissem Maße auf der Oxidation von H₂ (Hydrogenotrophie). Sowohl in der Acetogenese, als auch in der Methanogenese haben sich unterschiedliche Subtypen zur Energiegewinnung ausgebildet, die auf die jeweiligen

ökologischen Gegebenheiten stark angepasst sind. Das Elektronenpaar von H_2 wird meist in einer elektronenbifurkierenden Reaktion energetisch „disproportioniert“, in ein Elektron mit einem höheren und eines mit einem niedrigeren Potential. Das resultierende Elektron mit einem niedrigeren Potential wird – stand heute – dazu genutzt um Ferredoxin (Fd) oder Flavodoxin (Fld) zu reduzieren (Fd_{red}/Fld_{red}), das zweite – energieärmere – um eine Reihe verschiedener Moleküle zu reduzieren, wie $NAD(P)^+$, Pyruvat, das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB oder Ubiquinon (Buckel und Thauer, 2018). Somit können in der Elektronenbifurkation energiereichere Reduktionsäquivalente (Fd_{red}) aus einer Ausgangsverbindung (H_2) mit energieärmeren Elektronen hergestellt werden. Die Reduktionsmittel Fd_{red} oder Fld_{red} können nun dazu genutzt werden, das elektrochemische Membranpotential zu erhöhen – und damit ATP aufzubauen –, oder stark endergone zelluläre Reaktionen zu katalysieren. Die meisten Acetogenen beruhen dabei auf der Nutzung einer elektronenbifurkierenden Hydrogenase die Fd_{red} und $NAD(P)H$ herstellt (Schuchmann und Müller, 2014). Beide Komponenten werden anschließend sowohl für die CO_2 Reduktion, als auch für die ATP-Synthese genutzt. Außerdem kann zur weiteren ATP-Gewinnung das gebildete Acetyl-CoA in einer Substratstufenphosphorylierungsreaktion zu Acetat und ATP gespalten werden (Berg, 2011). Bei der CO_2 Reduktion in Methanogenen wird innerhalb des Methyl-Zweigs die Methyl-Gruppe von CH_3-H_4MPT auf Coenzym M (HS-CoM) übertragen und anschließend reduktiv demethyliert. Dies erfolgt mit Coenzym B (HS-CoB), wobei Methan (CH_4) und das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB entsteht (Ferry, 2010). Um die beiden Coenzyme wieder zu regenerieren wird CoM-S-S-CoB in einer elektronenbifurkierenden Reaktion als „energieärmer“ Elektronenakzeptor verwendet. Diese Reaktion wird durch den HdrABC Komplex katalysiert, der ebenfalls Elektronen von H_2 (oder Formiat) nutzt, um reduziertes Ferredoxin herzustellen (Ferry, 2010; Buckel und Thauer, 2018).

Mit dem Wood-Ljungdahl Weg ist es den meisten Organismen außerdem möglich weitere C_1 -Körper zu assimilieren, wie beispielsweise CO, Formiat, Formaldehyd oder andere Methyl-Gruppen-tragende organische Verbindungen (Berg, 2011). In biotechnologischen Verfahren, speziell zur Umsetzung des oben genannten Syngas ($H_2/CO/CO_2$), haben sich acetogene Bakterien als besonders vielversprechend erwiesen. Sie besitzen verschiedene Vorteile wie ihre hohen Umsatzraten von CO oder – je nach Emissionsquelle – CO_2 und oft eine genetische Zugänglichkeit (Takors *et al.*, 2018). Jedoch sind diese Organismen nicht ausnahmslos nutzbar mit konventionellen CO_2 -Emissionsquellen, da viele davon sehr stark mit CO_2 angereichert sind (>95 %) und H_2 als Energiequelle nicht immer zur Verfügung steht, bzw. nachhaltig hergestellt noch relativ teuer ist (Takors *et al.*, 2018). Außerdem sind viele Abgase mit

Sauerstoff kontaminiert, welches den Einsatz der strikt anaeroben acetogenen Bakterien nicht möglich macht (Takors *et al.*, 2018).

1.4. Bioelektrochemische Nutzung von CO₂

Die bisher beschriebenen Energiequellen für die biotechnologische Nutzung von CO₂ sind Lichtenergie (Photoautotrophie) und chemische Energie (Chemoautotrophie) wie H₂ und CO. Doch im Jahr 2009 konnten erste Hinweise erbracht werden, dass ebenfalls elektrische Energie als Energie- und Elektronenquelle für die mikrobiologische Reduktion von CO₂ nutzbar ist (Cheng *et al.*, 2009). Ein Jahr später wurde der Begriff der „mikrobiellen Elektrosynthese“ (MES) geprägt, als Nevin und Kollegen zeigen konnten, dass der acetogene Organismus *Sporomusa ovata* mit einer Graphit-Kathode als alleinige Energie- und Elektronenquelle in der Lage ist Acetat zu produzieren. Kohlenstoffquelle war hier CO₂ (Nevin *et al.*, 2010). Definiert wurde die MES als „die Reduktion von Kohlenstoffdioxid zu höherwertigen Kohlenstoff-Verbindungen (engl. *multicarbon compounds*) mit Elektronen, die von einer Elektrode als Elektronendonator bereit gestellt werden“ (Rabaey und Rozendal, 2010; Nevin *et al.*, 2011).

1.4.1. Bioelektrochemische Systeme

Die mikrobielle Elektrosynthese wird als eine Unterart der bioelektrochemischen Systeme (BES) geführt, in denen biologische Einheiten als Katalysatoren genutzt werden. Dazu zählen enzym-katalysierte Systeme, aber auch DNA oder ganze Zellen können als solche Biokatalysatoren eingesetzt werden (Schröder *et al.*, 2015). Die direkte oder indirekte elektrochemische Interaktion von Mikroorganismen mit einer Elektrode wird dabei auch unter dem Begriff der mikrobiellen Elektrochemie zusammengefasst. Jedoch zählen dazu nur sogenannte primäre mikrobielle Elektrochemische Systeme (METs), da hier eine direkte Kopplung der mikrobiellen und der elektrochemischen Vorgänge besteht. Im Gegensatz dazu stehen eher indirekte Prozesse bei sekundären METs, beispielsweise die elektrochemische Kontrolle mikrobieller Wachstumsparameter wie der O₂/H₂ Partialdruck oder der pH-Wert. Auch sehr hohe oder niedrige Potentialbereiche sind ein Indiz für eine sekundäres MET. Bei primären METs liegen die angelegten Potentiale meist in einem physiologisch relevanten Bereich, da hier ein extrazellulärer Elektronentransport (EET) in Form einer Reduktion oder Oxidation der Elektroden vorliegt (Schröder *et al.*, 2015).

Die Interaktion der Mikroorganismen mit dem elektrischen Leiter beruht hierbei entweder auf kapazitiven oder faradayschen Effekten. Kapazitive Interaktionen entstehen vor allem durch

die Anhaftung der Mikroorganismen an die Elektrodenoberfläche, wodurch die Kapazität der Elektrode weitgehend herabgesetzt wird (Schröder *et al.*, 2015). Dieser Effekt ist jedoch unabhängig von Stoffwechselfvorgängen innerhalb des Mikroorganismus. Faradaysche Interaktionen sind speziell Oxidations- und Reduktionsreaktionen die Mikroorganismen mit den Elektroden eingehen (Schröder *et al.*, 2015). Diese involvieren in den meisten Fällen extrazelluläre Elektronentransfer-Reaktionen. Für Biofilme von *Geobacter sulfurreducens* konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sie pseudo-kapazitive Eigenschaften haben, deren Auslöser die *c*-Typ Cytochrome von *G. sulfurreducens* sind. Diese Cytochrom-basierten Biofilme funktionieren wie ein Superkondensator und sind daher elektrochemisch von Interesse (Malvankar *et al.*, 2012; Caizán-Juanarena *et al.*, 2019).

Die wohl am besten beschriebene bioelektrochemische Technologie ist die sogenannte mikrobielle Brennstoffzelle (engl. *microbial fuel cell*, MFC). Sie besteht meist aus einem Zweikammersystem. Im Anodenkompartiment findet eine Oxidation organischer Kohlenstoffverbindungen durch Mikroorganismen statt (Abb. 3A). Die im Stoffwechsel anfallenden Elektronen werden anschließend auf die Anode übertragen, die als terminaler Elektronenakzeptor einer anaeroben Atmung dient (Logan, 2009). Sie gelangen über einen Widerstand oder einen Verbraucher an die – im Kathodenkompartiment befindliche – Kathode (Logan *et al.*, 2006; Logan und Rabaey, 2012). Dieser Elektronenfluss kann als Stromfluss gemessen und auch genutzt werden. An der Kathode reagieren die Elektronen dann beispielsweise mit Sauerstoff und Protonen zu Wasser. Der Ladungsausgleich zwischen Anoden- und Kathodenkompartiment kann über eine Kationenaustauschmembran oder eine Salzbrücke erreicht werden (Logan *et al.*, 2006). Im Anodenkompartiment müssen jedoch stets anoxische Bedingungen herrschen, da Sauerstoff durch sein hohes Redoxpotential mit der Anode als Elektronenakzeptor konkurrieren würde (Ucar *et al.*, 2017). Nach dem ersten Beweis für die Funktionsweise einer MFC im Jahr 1911, sind die Anwendungsgebiete für MFCs inzwischen sehr divers (Potter, 1911). Großes Potential wird dieser Technologie in der Abreinigung von kommunalen oder industriellen Abwasserströmen mit einer gleichzeitigen Stromproduktion zugesprochen. Außerdem können sie in der Bioremediation, als Biosensor oder in mikrobiellen Entsalzungsanlagen eingesetzt werden (Cao *et al.*, 2009; Golitsch *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015; Simonte *et al.*, 2017; Corbella *et al.*, 2019). Auch in mikrobiellen Elektrolysezellen (engl. *microbial electrolysis cell*, MEC) wird eine Bioanode eingesetzt, wobei das kathodische Potential durch eine externe Spannungsquelle erniedrigt wird, um an der Kathode die abiotische Produktion von H₂ oder Wasserstoffperoxid zu katalysieren (Lu und Ren, 2016). Auch dieser Technologie wird ein großes Potential zugesprochen, sodass sie immer

mehr in den wissenschaftlichen Fokus rückt (Call und Logan, 2008; Aiken *et al.*, 2019; Karthikeyan *et al.*, 2019).

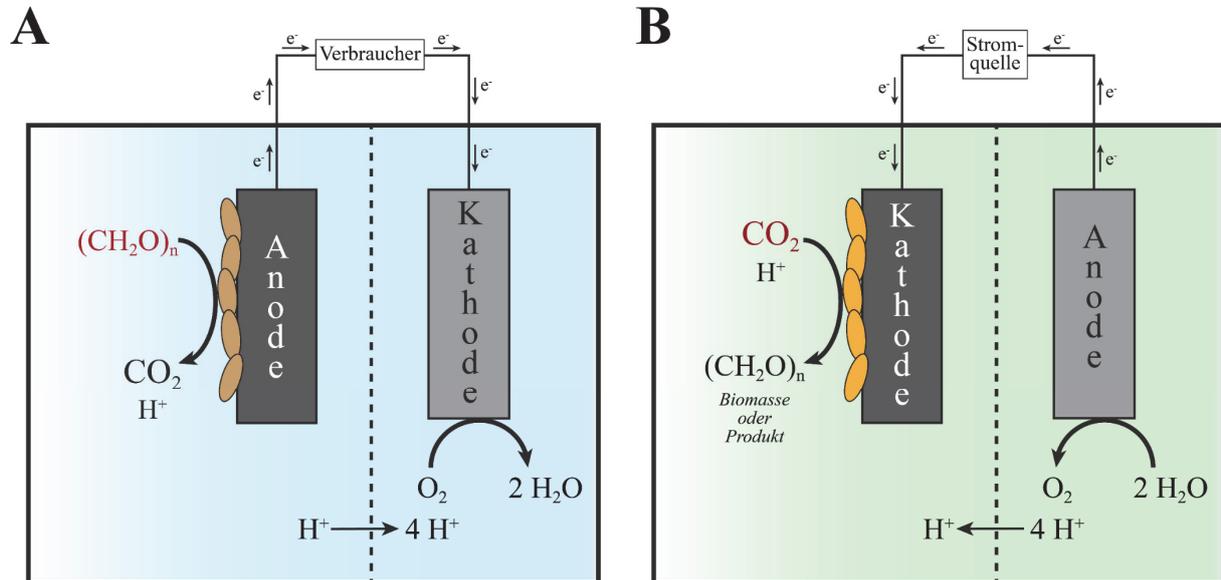


Abb. 3: Schematische Darstellung der (A) mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC) und der (B) mikrobiellen Elektrosynthesezelle (MES). Die ablaufenden Redoxreaktionen sind exemplarisch dargestellt.

1.4.2. Mikrobielle Elektrosynthese

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Technologien ist die MES ein Prozess, bei dem eine Biokathode im Fokus steht, um die Produktion höherwertiger Kohlenstoffverbindungen aus CO_2 und elektrischen Strom zu katalysieren (Abb. 3B). Die MES bietet daher für die Industrie eine Möglichkeit, elektrische Energie in chemische Energie umzuwandeln und damit lagerbar bzw. vielseitiger nutzbar zu machen. Speziell bei der nachhaltigen Stromproduktion mit Wind- und Sonnenenergie fallen hohe Stromüberschüsse an, die eine Entwicklung neuer Energiespeichertechnologien antreiben, da diese heutzutage eine große Herausforderungen darstellen (Jürgensen *et al.*, 2014; Götz *et al.*, 2016). Obwohl die mikrobielle Elektrosynthese bisher noch eine der am wenigsten ausgereiftesten METs ist, werden ihr gesellschaftliche und ökologische Auswirkungen, sowie ein industrielles Potential vorausgesagt (Bajracharya, Vanbroekhoven, *et al.*, 2017; PrévotEAU *et al.*, 2020). Damit hätte die mikrobielle Elektrosynthese die Möglichkeit die besagte Energiespeicherung mit der Reduktion von CO_2 Emissionen zu vereinen, in Kombination mit den – in Abschnitt 1.2 beschriebenen – Vorteilen von Biokatalysatoren. Außerdem kann die MES in bestehende Systeme integriert werden um

die Ausbeuten und die Reinheit der Produkte zu verbessern oder die Oxidation im Anodenkompartiment und die damit anfallenden Elektronen biotisch oder abiotisch an einer Biokathode zu nutzen. Mögliche anodische Oxidationsreaktionen der MES können daher biotisch sein, wie z.B. bei Syngas-Fermentationen, Biogas-Anlagen, Abgasströmen aus Geothermie-Kraftwerken oder mikrobiellen Entsalzungsanlagen, aber auch die abiotische Elektrolyse von Wasser oder toxischer Verunreinigungen wie Sulfid sind möglich (Tremblay und Zhang, 2015; Zhang und Tremblay, 2019).

Die Mikroorganismen, die in diesen Anwendungen genutzt werden, müssen in der Lage sein, Elektronen von einer Kathode aufzunehmen und physiologisch zu nutzen, um CO₂ zu reduzieren und daraus Biomasse bzw. das gewünschte Produkt herzustellen. Solche Organismen werden auch als „elektrotroph“ oder – wenn die CO₂-fixierende Eigenschaft mit einbezogen wird – „elektroautotroph“ bezeichnet (Tremblay und Zhang, 2015; Karthikeyan *et al.*, 2019; Logan *et al.*, 2019). Dass bakterielle Biofilme auf Graphitkathoden elektroaktive Eigenschaften besitzen, konnte schon früher in MFCs mit Meerwasser gezeigt werden, als Biokathoden die Stromdichte ansteigen ließen (Hasvold *et al.*, 1997). Seither haben sich zwei Typen mikrobieller Katalysatoren für MES etabliert: Gemischte Konsortien und Reinkulturen (Tremblay und Zhang, 2015). Die verwendeten Konsortien stammen dabei meist aus Sediment- oder Abwasser-Proben. In der Anwendung besitzen sie den Vorteil, dass sie keine sterilen Bedingungen benötigen und sehr robust gegenüber leichten Änderungen der Kultivierungsbedingungen sind. Jedoch haben Studien gezeigt, dass die Produktion eines einzigen Produkts schwierig sein kann (Zaybak *et al.*, 2013). Einen interessanten Aspekt stellen Konsortien in der die Isolation neuartiger elektroautotropher Reinkulturen dar (Zaybak *et al.*, 2013; Reiner *et al.*, 2020). Die ersten Reinkulturen befassten sich besonders mit den elektrotropen Eigenschaften von *Geobacter metallireducens*, bei dem eine Kathodengekoppelte Nitrat-Reduktion nachgewiesen werden konnte (Gregory *et al.*, 2004). Seither konnten bei Mikroorganismen aus vielen phylogenetischen Gruppen elektrotrophe Eigenschaften nachgewiesen werden: die Nitrat-Reduktion durch *Cupriavidus necator*, Sulfat-reduzierende *Desulfopila*- und *Desulfovibrio*-Stämme, H₂-Produktion durch *Desulfovibrio paquesi*, und andere O₂-reduzierende Organismen wie *Klebsiella pneumoniae* (Bergel *et al.*, 2005; Cordas *et al.*, 2008; Aulenta *et al.*, 2012; Beese-Vasbender, Nayak, *et al.*, 2015; Debuy *et al.*, 2015; Logan *et al.*, 2019). Sehr auffällig ist jedoch die große Anzahl acetogener Bakterien der Gattungen *Sporomusa* und *Clostridium* oder aber methanogener Archaea wie *Methanococcus maripaludis* (Cheng *et al.*, 2009; Nevin *et al.*, 2010, 2011; Bajracharya *et al.*, 2015; Deutzmann *et al.*, 2015; Siegert *et al.*, 2015; Aryal *et al.*, 2017). An

den elektroautotrophen Eigenschaften dieser beiden Gruppen wird momentan besonders intensiv geforscht, da sie bisher die vielversprechendsten Biokatalysatoren darstellen und daraus resultierend von großem Interesse für eine biotechnologische Anwendung sind (Bajracharya, Srikanth, *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019). Acetogene und Methanogene nutzen den Wood-Ljungdahl-Weg zur CO₂ Fixierung. Die Produktion von Methan (engl. *electromethanogenesis*) ist jedoch aufgrund kompetitiveren und kostengünstigeren Verfahren wie Biogasanlagen nur selten wirtschaftlich. Das primäre Endprodukt der Acetogenese, Acetat, stellt zwar einen wichtigen Ausgangsstoff für weitere chemischen Synthesen dar, jedoch ist der anabole Kohlenstoff-Metabolismus acetogener Organismen so mit der CO₂-Reduktion verknüpft, dass eine Weiterentwicklung des Produktspektrums hin zu aufwändigeren und langkettigen Verbindungen nur schwer zu bewerkstelligen ist. Außerdem ist der Wood-Ljungdahl-Weg sensitiv gegenüber Sauerstoff, was die Verwendung von Industrieabgasen – die oft Sauerstoff beinhalten – erst nach einer Abreinigung des Sauerstoffs möglich macht. Vor kurzem konnte ein weiterer elektroautotropher Mikroorganismus isoliert und charakterisiert werden: das Knallgasbakterium *Kyrpidia spormannii* EA-1 (Reiner, Jung, *et al.*, 2018). Dieser Organismus nutzt den Calvin-Zyklus zur Fixierung von CO₂ und ist in der Lage Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu nutzen. Er kann somit zwei Nachteile der oben beschriebenen acetogenen und methanogenen Organismen ausgleichen. Außerdem ist er natürlicherweise dazu in der Lage Polyhydroxybutyrat (PHB) als intrazellulären Speicherstoff zu bilden (Reiner, Jung, *et al.*, 2018). PHB wurde schon in früheren Arbeiten als ein vielversprechendes Produkt biotechnologischer Synthesen beschrieben (Dietrich *et al.*, 2017).

Die Art und Weise wie elektroautotrophe Organismen Kathoden als Elektronendonoren nutzen und die dort anfallenden Elektronen für ihren Metabolismus zugänglich machen, bleibt bisher noch weitestgehend unbekannt. Auch die Mikrobelektroden-Interaktion mit der Bildung kathodischer Biofilme und deren Beschaffenheit konnte bisher kaum geklärt werden. Dies liegt vor allem an der geringen Anzahl an Studien die sich mit diesen Themen befassen, womöglich aufgrund des hohen Grades an Interdisziplinarität, die solche Themen mit sich bringen.

Mikrobielle Elektronenaufnahme

Der Austausch von Elektronen zwischen Mikroorganismen und Elektroden ist das Kernmerkmal einer jeden MET und verbindet damit die mikrobiell und elektrochemisch ablaufenden Prozesse (Bajracharya, Srikanth, *et al.*, 2017). Manche Organismen sind dabei in der Lage die Oxidation organischer Verbindungen mit der Reduktion extrazellulärer,

unlöslicher Stoffe wie Metallverbindungen oder eben einer Anode zu koppeln. Diese werden auch als exoelektrogene Organismen bezeichnet und werden meist in MFCs eingesetzt. Elektrotrophen Organismen ist es hingegen möglich Elektronen einer Kathode aufzunehmen und sie für die Generierung metabolischer Redoxäquivalente wie NAD(P)H oder Fd_{red} zu nutzen, um sie anschließend auf einen zur Verfügung stehenden Elektronenakzeptor zu übertragen (Rosenbaum und Franks, 2014). Jedoch ist diese Art und Weise wie die Mechanismen der Elektronenaufnahme von statten gehen noch weitestgehend ungeklärt.

Das derzeit detaillierteste Verständnis über EETs konnte man bisher im Bereich des Elektronentransports aus der Zelle heraus auf eine Anode sammeln. Dieser Prozess dient damit oft auch als Vorbild für die Elektronenaufnahme. Besonders zu erwähnen sind Studien zu den Modellorganismen der dissimilatorischen Reduktion extrazellulärer, unlöslicher Metallverbindungen: *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* (Richter *et al.*, 2012; Prokhorova *et al.*, 2017; Simonte *et al.*, 2017). Diese Organismen sind in der Lage, Elektronen direkt auf eine Anode zu übertragen. Dieser direkte EET wird als ein Mechanismus definiert, bei dem es keine Notwendigkeit für die Diffusion einer mobilen Komponente für den Elektronentransport in oder aus der Zelle heraus gibt (Rabaey und Rozendal, 2010). Der Elektronentransport in *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* baut auf ein Netzwerk von redoxaktiven Proteinen, sogenannten *c*-Typ Cytochromen, auf. Diese formen eine erweiterte Elektronentransportkette die Elektronen aus dem Chinonpool der inneren Membran durch das Periplasma und über die äußere Membran auf terminale Reduktasen auf der Zelloberfläche transportiert (Shi *et al.*, 2007; Kato, 2015; Logan *et al.*, 2019). Für *G. sulfurreducens* und bedingt auch für *S. oneidensis* konnte außerdem vor kurzem die Beteiligung von Pili oder auch *Nanowires* als Elektronen-leitende Zellfortsätze beschrieben werden (El-Naggar *et al.*, 2010; Malvankar und Lovley, 2014; Wang *et al.*, 2019). Neben den direkten EET-Wegen können exoelektrogene Organismen auch indirekte Strategien des EET verwenden. Dabei produzieren und/oder nutzen sie sogenannte Elektronen-*shuttles* (engl. für Mediator), bei denen es sich um lösliche und redoxaktive Substanzen, die den Elektronentransport zwischen der Zelle und der Anode bewerkstelligen handelt (Rabaey und Rozendal, 2010). Es wird dabei zwischen endogen und exogen produzierten Molekülen unterschieden. Diese Mediatoren umfassen Stoffe wie Huminsäuren und DNA, aber auch Sekundärmetabolite wie Phenazine und Flavine oder Primärmetabolite wie Schwefel-Spezies und H_2 (Schröder *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2004; Straub und Schink, 2004; Rabaey *et al.*, 2005; Von Canstein *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2009).

Obwohl bis heute – im Gegensatz zum EET auf eine Anode – nur limitierte Informationen über den Mechanismus des Elektronenimports von Biokathoden verfügbar sind, konnten schon

mehrere Annahmen und Theorien dazu aufgestellt werden, auf die im Folgenden eingegangen werden soll (Kracke *et al.*, 2015; Choi und Sang, 2016; Philips, 2020). Die Diversität elektrotropher Mikroorganismen scheint zudem noch größer zu sein, als die der exoelektrogenen, da eine Reihe möglicher Elektronenakzeptoren von Sauerstoff bis Protonen oder CO₂ zur Verfügung stehen können (Philips *et al.*, 2016). Es ist daher wahrscheinlich, dass sich auch die dazugehörigen Aufnahmemechanismen stark unterscheiden. Oft scheinen sich auch die Effekte mehrerer Mechanismen in einem Organismus zu überlagern (Philips *et al.*, 2016; Logan *et al.*, 2019; Philips, 2020).

Elektronenaufnahmemechanismen

Ähnlich zu Bioanoden kann auch bei Biokathoden von zwei möglichen Mechanismen ausgegangen werden: der direkte Elektronentransport oder der indirekte – meist mediatorvermittelte – Elektronentransport.

Für die bereits genannten Modellorganismen des EET, *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis*, wird oft auch ein direkter Elektronenimport von einer Kathode postuliert (Abb. 4A) (Philips *et al.*, 2016; Logan *et al.*, 2019). Im Falle von *S. oneidensis* scheint die *c*-Typ Cytochrom-basierte Elektronentransportkette des Mtr-Wegs (**M**etallreduktions-Weg; engl: *metal reducing pathway*), die für den EET zuständig ist, im Falle einer Erniedrigung des Elektrodenpotentials und der Zugabe von Fumarat als Elektronenakzeptor reversibel zu sein (Ross *et al.*, 2011; Okamoto *et al.*, 2014). Eine Bildung von Redoxäquivalenten konnte zusätzlich nachgewiesen werden (Rowe *et al.*, 2018). Die Reversibilität des Elektronenflusses innerhalb des *S. oneidensis* Biofilms scheint vor allem auf der Änderung der Redoxaktivität des Flavin-Mediators der äußeren Membran-Cytochrome zu beruhen (Okamoto *et al.*, 2014). Für *Geobacter* spp. konnte ebenfalls ein experimenteller Nachweis zur Elektronenaufnahme bei gleichzeitiger Fumarat-Reduktion erbracht werden. Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht gänzlich geklärt (Gregory *et al.*, 2004; Strycharz *et al.*, 2008; Philips *et al.*, 2016). Vor kurzem konnte der schwefeloxidierende und als elektrotroph charakterisierte Organismus *Thioclava elektrotropha* EI0x9 isoliert werden, für welchen in ersten Untersuchungen ein direkter Elektronenaufnahme-Mechanismus postuliert wird (Chang *et al.*, 2018). Jedoch beruht dies vor allem auf elektrochemischen und genomischen Analysen (Karbelkar *et al.*, 2019). Genaue mikrobiell-mechanistische Untersuchungen stehen hier noch aus. Auch die Fe(II)-oxidierenden chemolithoautotrophen *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Mariprofundus ferrooxydans* sind zu elektrotrophem Wachstum befähigt (Carbajosa *et al.*, 2010; Summers *et al.*, 2013).

A. ferrooxidans besitzt dabei eine Cytochrom/Rusticyanin-abhängige Elektronentransportkette für den direkten Elektronenimport von unlöslichen Fe(II)-Verbindungen, welche wichtig für den Elektronenimport zu sein scheint (Liu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Sydow *et al.*, 2014). Die Beteiligung dieses Wegs am Elektronenimport konnte jedoch bisher noch nicht belegt werden (Philips *et al.*, 2016).

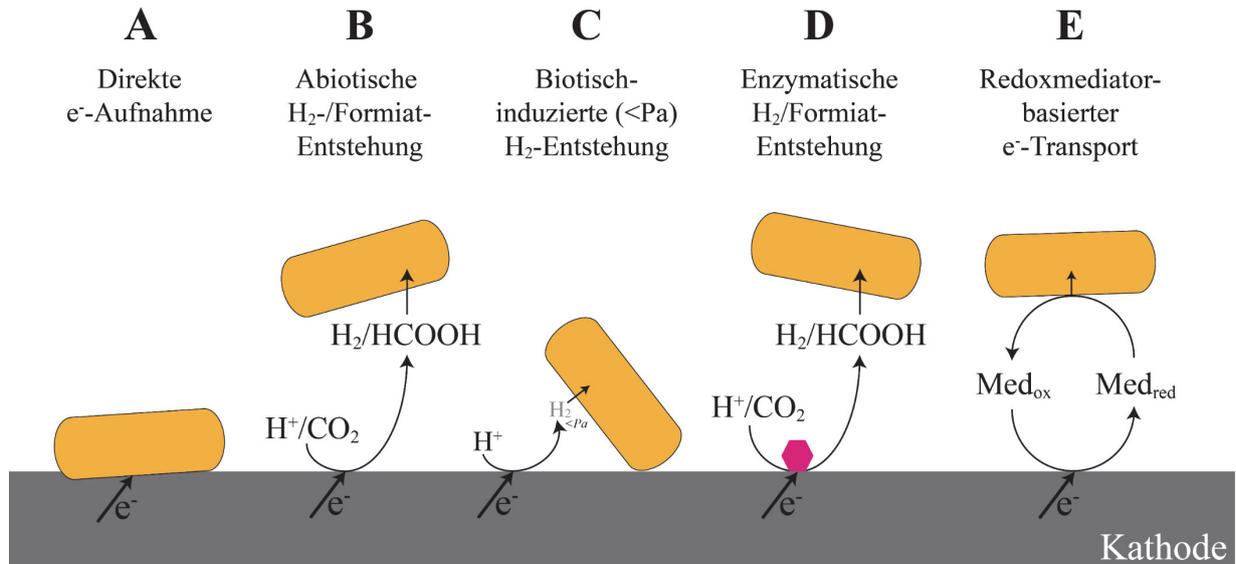


Abb. 4: Übersicht über potentielle Elektronenaufnahme-Mechanismen von einer Kathode in die Zelle. Bei der (A) direkten Elektronenaufnahme ist kein Mediator notwendig. (B)–(D) beruhen auf der Entstehung von H_2 oder Formiat, entweder gänzlich abiotisch (B) oder Enzym-katalysiert (D). Bei der (C) biotisch-induzierten H_2 -Entstehung führt die biotische Oxidation von abiotisch entstandenem Wasserstoff durch den niedrigeren Partialdruck (Pa) zu einer vermehrten H_2 -Entstehung. Der (E) Redoxmediator-basierte Transport kann auf einer Reihe verschiedener redox-aktiver Substanzen beruhen. Nach Tremblay *et al.*, 2017; Lienemann *et al.*, 2018 und Philips, 2020.

Für manche acetogene und sulfatreduzierende Bakterien und methanogene Archaea wird ebenfalls ein direkter Elektronentransport postuliert, welcher jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (Beese-Vasbender, Grote, *et al.*, 2015; Beese-Vasbender, Nayak, *et al.*, 2015; Rowe *et al.*, 2019). Manche Vertreter dieser Organismengruppen können auch Fe(0) als Elektronendonator nutzen (mikrobielle Korrosion) und scheinen ähnliche Elektronenaufnahme-mechanismen zu benutzen wie bei der Aufnahme von einer Kathode (Venzlaff *et al.*, 2013; Kato, 2015; Philips *et al.*, 2019). Der Nachweis der direkten Aufnahme wird jedoch meistens durch die Bildung von H_2 an der Kathode gestört, der von den meist hydrogenotrophen Kandidaten als Elektronendonator verwendet werden kann (Abb. 4B). Oft wird ein Potential über dem der Wasserstoffentstehung ($E^0 = -0,414$ V; pH 7, 1 atm H_2) oder die Abwesenheit messbarer H_2 -Konzentrationen in abiotischen Kontrollen als Beweis der

direkten Aufnahme angegeben (Philips *et al.*, 2016). Es konnte dazu jedoch gezeigt werden, dass es mehrere abiotische und biotisch-induzierte Effekte gibt, die eine Wasserstoffentstehung begünstigen. Die H₂-Entstehungsrate beruht besonders auf zwei Variablen: (I) dem Entstehungspotential (engl. *onset potential*), das einen thermodynamischen Effekt darstellt, und (II) der Austauschstromdichte (engl. *exchange current density*), einem kinetischen Effekt (Philips, 2020).

Das Entstehungspotential (I) wird oft mit der Nernst-Gleichung beschrieben. Hier wird klar, dass die Kultivierungsbedingungen einen wichtigen Punkt darstellen. Speziell der pH-Wert bzw. die H⁺-Konzentration als Edukt der H₂ Synthese haben einen wichtigen Einfluss. Laut der Nernst-Gleichung erhöht schon ein pH von 5,5 – der optimale pH-Wert für manche Acetogene – das Redoxpotential auf -0,325 V (1 atm H₂), bzw. ein noch niedrigerer pH-Wert von 3,5 – für *K. spormannii* – auf -0,235 V (1 atm H₂, 60 °C) (Liew *et al.*, 2016; Philips, 2020; Reiner *et al.*, 2020). Weiterhin ist eine H₂-Entstehung bei höheren Potentialen möglich, je niedriger der H₂-Partialdruck an der Kathodenoberfläche ist (Abb. 4C). Von besonderer Bedeutung ist hier der H₂-Partialdruck-Grenzwert bei denen die jeweiligen Organismen noch zu Wachstum befähigt sind und welchen sie auf der Kathode aufrechterhalten. Je nach H₂-Verbrauchseigenschaften differieren diese Werte innerhalb der Gruppe der Acetogenen zwischen 1,4*10⁻⁴ und 1,1*10⁻² atm bei einem theoretischen Minimum von 3*10⁻⁵ (Berechnungen anhand von bekannten ATP-Bildungsraten) (Lee und Zinder, 1988; Philips, 2020). Ferner wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass besonders Organismen die durch ihre hohe H₂-Affinität einen niedrigen H₂-Partialdruck aufrechterhalten können eine höhere H₂-Produktionsrate erreichen. Dies erlaubt es ihnen die Kathode effizienter zu nutzen (Philips, 2020). Die Austauschstromdichte (II) bezieht sich dabei invers auf das Überpotential der Reaktion (Bard und Faulkner, 2001). Das Überpotential ist eine Art Aktivierungsenergie für Reaktionen, die zwar thermodynamisch ablaufen sollten, aber durch kinetische Effekte gehemmt werden. Dieses Überpotential kann besonders durch die Verwendung reaktiver Kathodenmaterialien erreicht werden. Eine solche Oberflächenaktivierung durch verschiedene chemische Modifikationen konnte bereits durchgeführt werden (Kracke *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019). Ein weiterer biologischer Effekt zur Verringerung des Überpotentials konnte darin gefunden werden, dass Zell-freier Überstand von Bakterien durch extrazelluläre Enzyme wie Hydrogenasen aber auch Formiat-Dehydrogenasen oder andere Bestandteile als Katalysator für die Produktion von H₂ oder Formiat wirken (Abb. 4D) (Lohner *et al.*, 2014; Deutzmann *et al.*, 2015; Lienemann *et al.*, 2018; Philips *et al.*, 2019; Tremblay *et al.*, 2019).

Um einen direkten Elektronentransport zu beweisen, müsste also mehr auf die biologischen Effekte der Entstehung von Elektronenshuttles wie H_2 eingegangen werden. Abhilfe könnten Hydrogenase-Mutanten schaffen, die auch für die Aufklärung des Elektronentransports in *G. sulfurreducens* und *M. maripaludis* eine wichtige Rolle spielten. Diese Mutanten stehen für die meisten elektrotrophen Organismen jedoch nicht zur Verfügung (Gregory *et al.*, 2004; Lohner *et al.*, 2014).

Die Nutzung weiterer Redoxmediatoren, neben H_2 und Formiat, ist ebenfalls möglich, steht jedoch momentan nicht im wissenschaftlichen Fokus. Ein Grund dafür ist oftmals die Unkenntnis über die komplexen Redoxsysteme die an der Oberfläche einer solchen Kathode vonstattengehen. Weitere potentielle exogene Elektronenshuttles sind Ammonium, Sulfid oder Fe(II) (Lovley und Nevin, 2013). Weiterhin möglich ist außerdem die Exkretion biogener Shuttle wie Phenazine und Riboflavin (Analog zur Anodenatmung), oder aber die Nutzung freigesetzter Verbindungen nach dem Zelltod, wie Vitamin B12 (Rosenbaum *et al.*, 2011).

Kathodische Biofilme

Um die Vorgänge der mikrobiellen Elektrosynthese besser zu verstehen, ist es notwendig die direkte Mikroben-Elektroden Interaktion zu charakterisieren, um Limitationen zu erkennen und weiter zu optimieren. Daher muss, neben den vorliegenden elektrochemischen Wechselwirkungen, auch das Wachstum des Biokatalysators charakterisiert werden. Da die Elektronenaufnahme in der MES – bis auf Systeme mit löslichen Mediatoren – gewöhnlicherweise an der Elektrodenoberfläche entsteht, wachsen die meisten elektrotrophen Organismen in Form eines Biofilms.

Biofilme sind definiert als Aggregate von Organismen, die auf einer Oberfläche oder aneinander haften können (Flemming *et al.*, 2016). In den meisten Fällen sind die Organismen eingebettet in eine selbst synthetisierte Matrix, hauptsächlich bestehend aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), wie z.B. Polysaccharide, Proteine, Fette oder extrazelluläre DNA (eDNA) (Flemming und Wingender, 2010; Vert *et al.*, 2012). Die Bildung dieser Matrix und deren Zusammensetzung ist ein dynamischer Prozess, welcher abhängig von Bedingungen inner- und außerhalb des Biofilms ist, wie der Nährstoffverfügbarkeit, Scherbeanspruchung, Konkurrenz oder Fressfeinden (Flemming *et al.*, 2016). Diese Matrix macht Biofilme auch interessant für biotechnologische Anwendungen, da der Biofilm dadurch in hohem Maße tolerant gegenüber toxischen Substanzen oder Produkten wird. Außerdem sind Multispezies-Biofilme sehr robust in ihrer Zusammensetzung. Da Biofilme selbsterhaltende

Systeme und langzeit-stabile Katalysatoren darstellen, sind sie interessant für die biochemische Katalyse. Ihre native Immobilisierung macht es außerdem möglich sie in kontinuierlichen Systemen zu verwenden, was die Prozesskosten deutlich senken kann (Halan *et al.*, 2012). Multispezies-Biofilme werden heutzutage hauptsächlich als Biofilter zur Wasseraufbereitung oder in der Wasserindustrie eingesetzt, um Abwässer aufzureinigen. Inzwischen werden immer mehr Prozesse entwickelt, die sogenannte produktive Biofilme in der mikrobiellen Katalyse verwenden. Diese Biofilme sollen aus Abfallströmen (gasförmig oder flüssig) oder günstigen Ausgangssubstraten ökonomisch interessante Produkte herstellen (Halan *et al.*, 2012). Diese können dabei von kurzkettingen Plattformchemikalien wie Acetat, Acetoin oder Butandiol bis hin zu langkettigen Polymeren wie Polyhydroxyalkanoaten reichen.

In bioelektrochemischen Systemen ist besonders das Biofilmwachstum in MFCs durch die beiden Organismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* Gegenstand der Forschung. Hier konnten einige Weiterentwicklungen, wie die Verbesserung der Biofilmwachstumsraten oder der Zusammensetzung der EPS, positive Effekte auf die katalytischen Eigenschaften der jeweiligen Produktionsstämme gemacht werden (Leang *et al.*, 2013; Arinda *et al.*, 2019; Edel *et al.*, 2019). Beispielsweise konnte durch die Zugabe von *carbon nanotubes* die EPS durch leitende Materialien erweitert werden, was eine verbesserte Reduktionsleistung der Mikroorganismen zur Folge hatte. *G. sulfurreducens*, der als ein sehr guter Biofilmbildner gilt, ist in der Lage anodische Biofilme bis ca. 40 µm Höhe zu bilden (Jourdin *et al.*, 2014; Salimijazi *et al.*, 2019). Um die Elektronen über solch eine weite Strecke auf die Anode zu transportieren wird eine Beteiligung der leitfähigen Pili von *G. sulfurreducens* postuliert (Reguera *et al.*, 2006).

Zum jetzigen Zeitpunkt, sind Studien zur Charakterisierung kathodischer Biofilme, speziell von produktiven Biofilmen einer Reinkultur, noch sehr selten und keinesfalls divers. Oft werden kathodische Biofilme von MECs verwendet, jedoch werden hier fast ausschließlich Mischkulturen eingesetzt. Vor allem aber weisen die meisten MECs einen unterschiedlichen Aufbau auf und werden mit unterschiedlichen Bedingungen betrieben, was generelle Aussagen erschwert. Da *G. sulfurreducens* in der Lage ist, auch kathodische Biofilme zu bilden, wurden hier die aufschlussreichsten Arbeiten durchgeführt, die speziell Biofilme beleuchteten. Dazu gehörten beispielsweise der Elektronentransport innerhalb des Biofilms, die Bestimmung der metabolischen Aktivität, aber auch die Verwendung verschiedener Kathodenmaterialien und deren Beschaffenheiten (Pons *et al.*, 2011; Ueki *et al.*, 2018; Salimijazi *et al.*, 2019). Außerdem wurden schon verschiedene Techniken zur Biofilmüberwachung verwendet, wozu hauptsächlich die Konfokalmikroskopie und die optische Kohärenztomographie (engl.: *optical*

coherence tomography, OCT) gehören (Molenaar *et al.*, 2018; Ueki *et al.*, 2018). Damit war es möglich, sowohl das Biofilmvolumen und auch maximale Biofilmdicken leichter zu bestimmen. Oft können sonst nur Schätzungen zur Biofilmbeschaffenheit anhand von Fluoreszenzmikroskopie oder Elektronenmikroskopie gemacht werden (Salimijazi *et al.*, 2019).

Wissenschaftliche Arbeiten an anodischen und kathodischen Biofilmen haben bisher gezeigt, dass die Anwendung des Wissens über die Biofilmbildung, dessen Wachstum und Erhalt einen positiven Effekt auf die Anwendung von Biofilmen in bioelektrochemischen Prozessen haben kann (Pons *et al.*, 2011; Choi und Sang, 2016). Auch die Verwendung von katalytisch aktiven oder nicht aktiven Oberflächenmodifikationen der Kathoden wurde schon als positiv für die Leitfähigkeit des Biofilms und damit für die Biofilmbildung und dessen Produktionsraten beschrieben (Chen *et al.*, 2016). Weiterhin kann auch der Wechsel von einem *fed-batch*-System auf ein kontinuierliches System Verbesserungen in der Nährstoffversorgung des Biofilms bedeuten und den Prozess dadurch effektiver machen (Jourdin *et al.*, 2018). Aus diesem Grund sollte auch weiterhin, neben den elektrochemischen Eigenschaften des kathodischen Biokatalysators, ein Fokus auf dessen Biofilmeigenschaften gesetzt werden, um auch hier die Anwendung produktiver Biofilme in der Biotechnologie weiter voranzutreiben.

1.5. *Kyrpidia spormannii*

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismus, *Kyrpidia spormannii* EA-1, wurde 2015 in unserer Arbeitsgruppe aus einer elektroautotrophen Anreicherungskultur isoliert und anschließend charakterisiert (Reiner, Jung, *et al.*, 2018). Außerdem konnte sein Genom vollständig sequenziert werden (Reiner, Lapp, *et al.*, 2018). Es handelt sich bei diesem Organismus um ein Gram-positives, obligat aerob wachsendes Knallgasbakterium, welches thermoacidophil bei einem pH von 3,5 und 55 °C wächst. Es ist außerdem in der Lage autotroph zu wachsen und nutzt dazu den Calvin-Zyklus (Reiner, Jung, *et al.*, 2018).

Vor kurzem konnte dieses Knallgasbakterium als ein neuartiger elektroautotropher Mikroorganismus beschrieben werden (Reiner *et al.*, 2020). Dies konnte durch zahlreiche Analysen gestützt werden. Zum einen zeigte eine inokulierte Elektrosynthesezelle einen ca. 5-fach höheren Stromverbrauch im Vergleich zu einer abiotischen Kontrolle. Zum anderen konnte durch die Zugabe des Atmungsketteninhibitors CCCP (einem Protonophor) und dem Absinken des Stromverbrauchs gezeigt werden, dass es sich um einen biotisch-katalysierten Effekt handelt (Reiner, 2019). Außerdem zeigte eine vergleichende Transkriptomanalyse ein distinktes Expressionsprofil unter elektroautotrophen Wachstumsbedingungen im Vergleich zu

heterotrophem und lithoautotrophem Wachstum (Reiner *et al.*, 2020). Im Rahmen dieser Transkriptomanalyse konnte zudem eine hohe Expression für potentielle Gene der Biofilm- bzw. EPS-Ausbildung, des Hydrogenase-Operons und für die Gene des Calvin-Zyklus nachgewiesen werden. Die Aktivität des Calvin-Zyklus und damit die autotrophe Lebensweise konnte darüber hinaus durch ^{13}C -Markierungsexperimente nachgewiesen werden. Die hohe Expression der Hydrogenase-Untereinheiten unter elektrotrophen Bedingungen gibt dabei Anlass zu der Vermutung, dass *K. spormannii* einen Hydrogenase-vermittelten Elektronentransport verwendet. Ob dies ein singulärer Mechanismus ist oder ob andere Mechanismen zusätzlich dazu beitragen ist bisher nicht bekannt. Weiterer Hinweise, die jedoch auf einen Wasserstoff-abhängigen Elektronenimport hindeuten, sind durch die verwendeten Wachstumsbedingungen gegeben, da das Entstehungspotential für H_2 bei pH 3,5 und 60 °C auf -231 mV vs. SHE (1 atm H_2) steigt, und durch einen niedrigeren H_2 -Partialdruck die Wasserstoffproduktion noch zusätzlich steigen könnte (Reiner, 2019; Reiner *et al.*, 2020).

Außerdem wurde die Biofilmmakkumulation auf einer Graphit-Kathode mit einem angelegten Potential von -500 mV vs. SHE gezeigt, wobei eine Live/Dead-Färbung des Biofilms seine metabolische Aktivität zeigte. Dies war vor allem durch die Entwicklung bedruckbarer bioelektrochemischer Fließzellen möglich, die es einerseits erlaubten die gasförmigen Substrate CO_2 und O_2 in höheren Konzentrationen unter den herrschenden Bedingungen zu lösen, aber auch den Biofilm kontinuierlich mit Nährstoffen zu versorgen. Das Konzept des Durchflusssystemes konnte schon von Jourdin und Kollegen als positiver Einfluss für Biofilmsysteme beschrieben werden (Jourdin *et al.*, 2018). Außerdem ist es durch das spezielle Design möglich, den Biofilm nicht-invasiv und *in-situ* mithilfe des OCTs zu beschreiben. Durch die Kultivierung von *Kyrpidia spormannii* EA-1 in den Fließzellen konnten mittlere Biofilmhöhen von ca. 80 μm nach 10 Tagen erreicht werden (Reiner *et al.*, 2020). Diese Biofilmdicke übertrifft die bisher charakterisierten kathodischen Biofilme deutlich (Salimijazi *et al.*, 2019). Die metabolischen Eigenschaften, sowie das starke Biofilmwachstum machen eine weitere Charakterisierung von *K. spormannii* als Biokatalysator in einem zukünftigen mikrobiellen Elektrosyntheseprozess sehr interessant (Abb. 5). Hinzu kommt, dass *K. spormannii* ein natürlicher Produzent von Polyhydroxybutyrat ist, ein biotechnologisch interessantes Produkt, das als biobasiertes Polymer für die Herstellung von Bioplastik dienen kann.

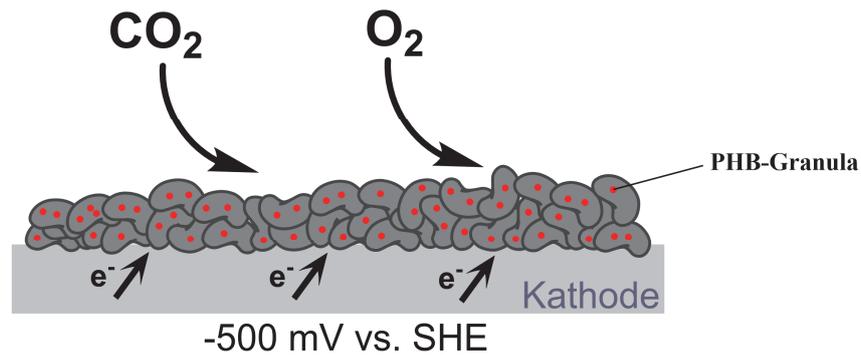


Abb. 5: Schematische Darstellung des angestrebten biotechnologischen mikrobiellen Elektrosynthese-Prozess von *Kyrpidia spormannii*.

1.6. Die Biogenese von PHB und seine Anwendung

Da der weltweite Bedarf an Plastik immer weiter ansteigt, die globalen fossilen Rohstoffquellen aber limitiert sind und sich ein globales ökologisches Bewusstsein im Hinblick auf die Verschmutzung mit Plastikabfällen immer weiter aufbaut, wird die Produktion von Bioplastik immer weiter vorangetrieben. Gesetze der EU, die das Verbot einiger Einmal-Gegenstände aus herkömmlichem Plastik ab 2021 vorsieht, stärken weiter deren Markt. Es ist dabei jedoch zu beachten, dass der Begriff Bioplastik ein Überbegriff für Polymere ist, die entweder biologisch abbaubar sind, auf nachhaltig produzierter Biomasse basieren (biobasiert) oder beide Eigenschaften vereinen. Die nachhaltige Produktion von umweltverträglichem bzw. wiederverwertbarem Plastik wird außerdem als ein wichtiges Ziel hin zu einem zirkulären Kohlenstoffkreislauf (siehe 1.1) gesehen (Brandon und Criddle, 2019). Zu den bekanntesten biobasierten und auch biologisch abbaubaren Bioplastiken gehören Polylaktat (PLA), Polyhydroxyalkanoate (PHA) und Cellulose-basierte Polymere, wie Cellophan. Obwohl PHAs momentan noch einen kleineren Anteil an produziertem Bioplastik haben, wird ihnen durch sehr gute Stoffeigenschaften ein großes Wachstum ihres Marktes bis 2024 vorausgesagt (Brandon und Criddle, 2019; Skoczinski *et al.*, 2020). Da die mikrobielle Synthese von Polyhydroxybutyrat (PHB) schon seit langem bekannt ist und seine Biogenese schon in vielen Organismen nachgewiesen und erforscht wurde, stellt es momentan das „Modell-PHA“ dar. Die Familie der PHAs stellt eine Gruppe von Polyestern dar, die sich in der Anzahl an Kohlenstoffatomen in ihren jeweiligen Monomeren unterscheiden. Das Homopolymer PHB (auch P(3HB)) ist dabei aus 3-Hydroxypropionat Monomeren aufgebaut. Neben PHB sind weitere Derivate wie das Copolymer Poly-(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV)

von industriellem Interesse (Spencer *et al.*, 2017; Rajan *et al.*, 2018). PHB ähnelt in seinen Eigenschaften dem synthetischen Polypropylen, ist jedoch – auch im Vergleich zu vielen anderen Bioplastiken – das momentan einzig bekannte, welches auch als kompostierbar gilt. Besonders vielversprechend ist seine Anwendung in der Lebensmittelverpackungsindustrie oder durch seine biokompatiblen Eigenschaften in medizinischen Anwendungen wie in der Gewebe- und Implantat-Entwicklung (Rajan *et al.*, 2018). Der größte Nachteil von PHB sind momentan noch seine brüchigen Eigenschaften und sein schmaler thermischer Verarbeitungsbereich. Durch chemische Modifikationen, weitere Zusätze oder die Verwendung von Polymerblends mit anderen Biopolymeren kann dieser Punkt jedoch stark verbessert werden (Brandon und Criddle, 2019).

In der Physiologie von Mikroorganismen stellt PHB einen intrazellulären Kohlenstoff- und Energiespeicher dar. Es erfüllt dabei zusätzlich die Rolle eines Redoxregulators (Dawes, 1988). Die Bildung von PHB geschieht besonders dann, wenn der Kohlenstoff- und Energiehaushalt der Zelle zwar gedeckt ist, jedoch wichtige Nährstoffe wie Stickstoff, Phosphor, Schwefel oder ein Elektronenakzeptor fehlen um Wachstum bzw. Zellteilung zu ermöglichen. Ausgangspunkt der Synthese von PHB ist Acetyl-CoA: Zwei dieser Moleküle werden durch die β -Ketothiolase (PhaA) zu Acetoacetyl-CoA kondensiert (Abb. 6). Die Acetoacetyl-CoA Reduktase (PhaB) reduziert dieses unter NADPH-Verbrauch zum PHB-Monomer 3-Hydroxybutyrat. reduziert dieses unter NADPH-Verbrauch zum PHB-Monomer 3-Hydroxybutyrat.

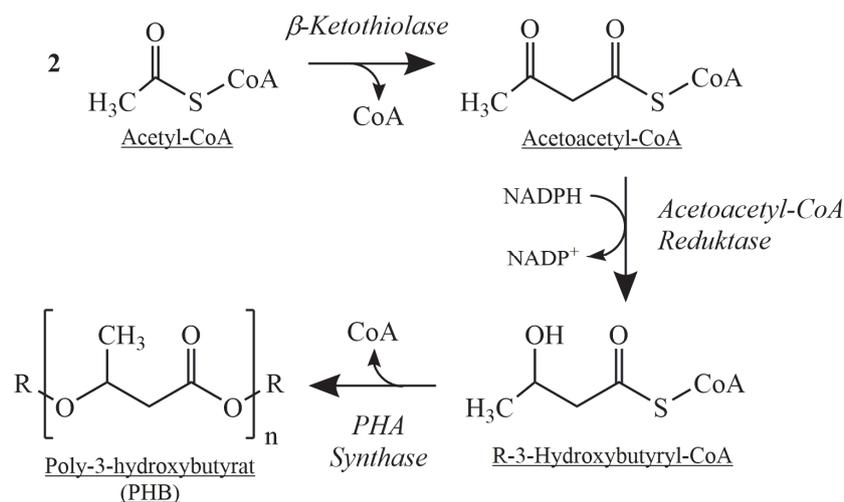


Abb. 6: Darstellung der enzymatischen Schritte zur Produktion von Poly-3-hydroxybutyrat (PHB). Die Zwischenprodukte der Synthese, sowie die relevanten Enzyme und deren Cofaktoren sind abgebildet.

Ob Acetyl-CoA den reduktiven Weg hin zum PHB nimmt oder im Citrat-Zyklus oxidiert wird, beruht besonders auf dem Redoxzustand der Zelle. Bei einem hohen NADH/NAD⁺ Verhältnis (wie z.B. bei der Abwesenheit eines Elektronenakzeptors) wird unter anderem das initiale Enzym des Citratzyklus, die Citrat-Synthase, inhibiert. Der Verbrauch von Reduktionsäquivalenten in der PHB-Synthese erlaubt es dabei dem Citratzyklus als zentralen Stoffwechselweg wieder in höheren Raten zu operieren. Die PHB-Synthese entzieht dem System sozusagen überschüssige Reduktionsenergie, um den Redoxzustand der Zelle in Balance zu halten und das Fortlaufen der dadurch regulierten Stoffwechselwege zu gewährleisten (Dawes, 1988; Tyo *et al.*, 2010).

Die Veresterung der 3-Hydroxybutyrat Monomere zum Polymer PHB wird durch das Schlüsselenzym der PHB Biosynthese, die PHA-Synthase, katalysiert (Abb. 6). Die PHA-Synthase (PhaC) kann in vier Klassen eingeteilt werden, die sich vor allem in ihrer Substratspezifität und ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung unterscheiden (Pötter und Steinbüchel, 2005). Enzyme der Klasse I bestehen aus einem katalytisch aktiven PhaC Monomer, von welchem in Klasse II zwei dieser Monomere ein aktives Dimer bilden. Die Klassen III und IV bestehen aus den Heterodimeren PhaC-PhaE bzw. PhaC-PhaR (Liebergesell *et al.*, 1994; McCool und Cannon, 2001). Die Klassen I, III und IV bevorzugen kurzkettige Monomere (engl. *short-chain-length*, scl; C3-C5), Klasse II hingegen mittellange Monomere (engl. *medium-chain-length*, mcl; C6-C14). Typische Vertreter der einzelnen Klassen sind Mikroorganismen wie *Cupriavidus necator* (Klasse I), *Pseudomonas eleovorans* (II), *Allochromatium vinosum* (III) und *Bacillus megaterium* (IV) (Pötter und Steinbüchel, 2005).

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von PHB bildet es cytoplasmatische Inklusionskörper, sogenannte Granula, die unter bestimmten Bedingungen bis zu 90 % der Zelltrockenmasse ausmachen können (Jendrossek und Pfeiffer, 2014). Unter normalen Wachstumsbedingungen bilden die meisten Organismen jedoch nur 1-15 % PHB in der Zelltrockenmasse (Alves *et al.*, 2017). Die lange vorherrschende Annahme, dass sie von einer membranähnlichen Phospholipidschicht umgeben sind, konnte vor kurzem widerlegt werden (Bresan *et al.*, 2016). Es wurde gezeigt, dass PHB-Granula *in-vivo* von einer Reihe verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Funktionen umgeben sind. Aufgrund der Komplexität dieser Hüllproteine werden PHB-Granula, als Organellen-ähnliche Struktur, auch als Carbonosomen bezeichnet (Jendrossek, 2009). Die Zusammensetzung der Proteinhülle scheint in seiner Zusammensetzung und Komplexität zwischen PHB-akkumulierenden Mikroorganismen zu variieren. In allen Spezies konnten jedoch PHA-Synthasen, die – für den PHB-Abbau verantwortlichen – PHA-Depolymerasen und sogenannte Phasine identifiziert

werden. Phasine bilden aufgrund ihrer amphiphilen Struktur eine Interphase um die hydrophoben Granula. Sie sind die abundantesten PHA-assoziierten Proteine (engl.: *PHA granule-associated proteins*, PGAPs) und spielen eine wichtige Rolle in der PHA Biogenese (Mezzina und Pettinari, 2016). Weitere PGAPs sind außerdem verschiedene Regulatorproteine, wie PhaR, oder solche die für die subzelluläre Lokalisation von Bedeutung sind, wie PhaM (Sznajder *et al.*, 2015).

Phylogenetisch ist die PHA Synthese weit verbreitet, sowohl in Archaea, als auch in Gram-positiven und Gram-negativen Bacteria (Rodriguez-Valera und Lillo, 1992; Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2017). Die Wahl des Organismus für eine biotechnologische Produktion von PHAs kann daher vor allem den gegebenen Prozessbedingungen, wie dem Substrat oder den Wachstumsbedingungen angepasst werden. Biotechnologische Verwendung finden heutzutage vor allem *Cupriavidus necator*, *Azotobacter vinelandii* und *Alcaligenes latus*, aber auch rekombinante *E. coli* und *C. necator* Stämme, sowie phototrophe Organismen wie *Rhodospseudomonas palustris* und *Synechocystis* sp. (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Mozejko-Ciesielska und Kiewisz, 2016; Troschl *et al.*, 2017). Momentan sind die größten limitierenden Faktoren für eine kommerzielle Nutzung von PHB, die Herstellungskosten und seine nachgeschaltete Prozessierung (Brandon und Criddle, 2019). Neben der Steigerung der Produktionsraten werden daher momentan aus Abfall gewonnene Rohstoffe wie Glycerol, Lignocellulose, verschiedene Fettsäuren oder Gase wie H₂, CO₂ und CH₄ als Substrate getestet (Rodriguez-Perez *et al.*, 2018).

Zusammenfassend gilt PHB aufgrund seiner Energiedichte, seiner Umweltverträglichkeit und seiner nicht-Flüchtigkeit als ein vielversprechendes Produkt der mikrobiellen Elektrosynthese mit seinen, je nach Quelle, günstigen Ausgangsrohstoffen CO₂ und elektrischem Strom. Die Verwendung von *Kyrpidia spormannii*, einem nativen PHB-Produzenten, als Biokatalysator in solch einem Prozess kann eine aussichtsreiche Alternative zu bisherigen Produkten etablierterer mikrobieller Elektrosynthesen sein. Auf dem Weg zu einer Anwendung dieses Prozesses müssen jedoch noch einige Fortschritte gemacht werden, besonders im Hinblick auf die elektroautotrophen Wachstumseigenschaften von *K. spormannii*, aber auch auf dessen PHB-Biogenese.

1.7. Ziele der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit war es *Kyrpidia spormannii* als Biokatalysator eines mikrobiellen Elektrosyntheseprozesses weiter zu entwickeln. Dafür sollte in einem ersten Schritt das elektroautotrophe Wachstum als kathodischer Biofilm verbessert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde der Ansatz einer ungerichteten Mutagenese verfolgt. Diese bestand aus zwei Teilen: Zum einen aus einem iterativen Langzeit-Kultivierungsansatz, der durch spontan-auf tretende vorteilhafte Mutationen in der Kultur eine Anpassung auf die Wachstumsbedingungen hervorrufen sollte. Zudem wurde die Kultur zudem zwischen jeder einzelnen Kultivierung mit UV-Licht bestrahlt um diese natürliche Mutationsrate weiter zu steigern. Neben der reinen Verbesserung der Wachstumseigenschaften, sollte eine nachfolgende genetische Analyse der adaptierten Population durchgeführt werden um Gene bzw. Varianten zu identifizieren, die vorteilhaft für das Wachstum als kathodischer Biofilm unter elektroautotrophen Bedingungen sind. Diese Variationen sollen anschließend analysiert werden um durch sie ein tieferes Verständnis über die zugrundeliegenden Mechanismen des elektroautotrophen Wachstums von *K. spormannii* zu erlangen.

In einem zweiten Schritt sollte die PHB-Biogenese weiter untersucht werden. Dafür sollten die wichtigsten Gene die für die PHB-Biogenese notwendig sind identifiziert und anschließend durch die heterologe Expression in *E. coli* auf ihre Funktionalität untersucht werden. Schlussendlich sollte versucht werden ein genetisches System für *Kyrpidia spormannii* zu entwickeln. Dieses sollte zusammen mit den zuvor gesammelten Erkenntnissen dazu genutzt werden, um einerseits die elektroautotrophen Wachstumseigenschaften durch gezielte Mutationen des Wildtyps zu verbessern, aber auch um die PHB-Produktion durch gezielte genetische Veränderung der PHB-Synthesegene zu verbessern. Weiterhin ließe sich hiermit das Produktspektrum von *K. spormannii* noch erheblich erweitern.

II. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anderweitig erwähnt, wurden alle Chemikalien in dieser Arbeit von den Firmen Sigma-Aldrich (München, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und Promega (Mannheim, DE) bezogen. Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs (Frankfurt am Main, DE) erworben.

2.2. Mikroorganismen und Plasmide

2.2.1. Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Die Stammbezeichnung und der relevante Genotyp beziehen sich auf die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften.

Stammbezeichnung	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>Kyrpidia spormannii</i> – Stämme		
<i>Kyrpidia spormannii</i> EA-1 WT	WT	(Reiner, Jung, <i>et al.</i> , 2018)
<i>Kyrpidia spormannii</i> EA-1 EAD	Elektroautotroph-adaptierter Stamm	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> – Stämme		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)	NEB (Frankfurt a.M., DE)
<i>E. coli</i> HST04	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) [Φ 80 <i>dlacZAM15</i>], <i>rpsL</i> (<i>str</i>), <i>thi</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i>	Takara Bio Inc. (Otsu, Japan)

2.2.2. Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Relevanter Genotyp	Referenz
pBAD202	<i>kanR</i> , araBAD, pUC ori	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pACBSR	<i>chlR</i> , p15A ori	(Herring <i>et al.</i> , 2003)
pT7Blue	<i>ampR</i> , T7 Promotor,	Novagen
pASK-IBA43plus	<i>ampR</i> , tet-Promotor	IBA Lifesciences, (Göttingen, DE)
pASK-IBA43plus_ <i>his-MurA2_{WT}</i>	<i>his-murA2</i> (WT)	Diese Arbeit
pASK-IBA43plus_ <i>his-MurA2_{Mut}</i>	<i>his-murA2_{Mut}</i> (I233N)	Diese Arbeit
pBAD202_ <i>phaA</i>	<i>phaA_{Ksp}</i>	Diese Arbeit
pBAD202_ <i>phaA_phaQPRBC</i>	<i>phaA_{Ksp}</i> (CVV65_16015) <i>phaQPRBC_{Ksp}</i> (CVV65_08480- 08500)	Diese Arbeit
pMET-MS	<i>chlR</i> , p15A ori, araBAD, CVV65_14585 (M.KspEA1I), CVV65_14595 (S.KspEA1I)	Diese Arbeit
pT7Blue_P _{Met} - <i>YFP_{Ksp}</i>	pT7blue mit <i>FFTS-YFP_{Ksp}</i> mit P _{Met}	Diese Arbeit
pT7Blue_P _{Nat} - <i>TK101_{Ksp}</i>	pT7blue mit <i>TK101_{Ksp}</i> mit P _{Nat}	Diese Arbeit
pT7Blue_P _{Met} - <i>TK101_{Ksp}</i>	pT7blue mit <i>TK101_{Ksp}</i> mit P _{Met}	Diese Arbeit
pG1AE	<i>ampR</i> , pBST1 replicon	Addgene
pG2AE	<i>ampR</i> , pUB110 replicon	Addgene
pNW33N	<i>chlR</i> (pC194), pBC1 replicon	Addgene
pG1A_P _{Nat} - <i>TK101_{Ksp}</i>	<i>ampR</i> , pBST1 replicon, <i>TK101_{Ksp}</i> mit P _{Nat}	Diese Arbeit
pG1A_P _{Met} - <i>TK101_{Ksp}</i>	<i>ampR</i> , pBST1 replicon, <i>TK101_{Ksp}</i> mit P _{Met}	Diese Arbeit
pG2A_P _{Nat} - <i>TK101_{Ksp}</i>	<i>ampR</i> , pUB110 replicon, <i>TK101_{Ksp}</i> mit P _{Nat}	Diese Arbeit
pG2A_P _{Met} - <i>TK101_{Ksp}</i>	<i>ampR</i> , pUB110 replicon, <i>TK101_{Ksp}</i> mit P _{Met}	Diese Arbeit

pNW33N_P _{Nat} -TK101 _{Ksp}	<i>chlR</i> (pC194), pBC1 replicon, TK101 _{Ksp} mit P _{Nat}	Diese Arbeit
pNW33N_P _{Met} -TK101 _{Ksp}	<i>chlR</i> (pC194), pBC1 replicon, TK101 _{Ksp} mit P _{Met}	Diese Arbeit

2.3. Kultivierungen

2.3.1. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung, der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme wurden standardmäßig in LB-Medium (Tab. 3) bei einer Temperatur von 37 °C in einem Schüttelinkubator (180 rpm) durchgeführt. Für die Herstellung von LB-Agar wurde dem LB-Medium 2 % Agar-Agar zugesetzt. Falls nötig, wurden dem Medium außerdem folgende Antibiotika als Selektionsmarker hinzugefügt: Ampicillin (Arbeitskonzentration: 100 µg ml⁻¹), Kanamycin (50 µg ml⁻¹) oder Chloramphenicol (30 µg ml⁻¹). Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* mit dem Ziel der späteren Proteinreinigung wurde 2xYT-Medium verwendet (Tab. 4). Die Kultivierung zur PHB-Produktion wurde in TB_{Gluk}-Medium durchgeführt (Tab. 5).

Tab. 3: Zusammensetzung des *Lysogeny-Broth* Mediums (LB, nach Lennox). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Substanz	Menge
Trypton	10 g l ⁻¹
Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
NaCl	5 g l ⁻¹

Tab. 4: Zusammensetzung des 2xYT-Mediums. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Substanz	Menge
Trypton	16 g l ⁻¹
Hefeextrakt	10 g l ⁻¹
NaCl	5 g l ⁻¹

Tab. 5: Zusammensetzung des TB_{Gluk}-Mediums. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Substanz	Menge
Trypton	24 g l ⁻¹
Hefeextrakt	12 g l ⁻¹
Glycerol	8 ml l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	9,4 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,2 g l ⁻¹
Glukose	2 % (w/v)

2.3.2. Heterotrophe Kultivierung von *K. spormannii*

Für die heterotrophe Kultivierung von *K. spormannii* wurde das Vollmedium RR2A (Tab. 6; modifiziert nach Reasoner und Geldreich, 1985) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 60 °C ohne Schütteln. Für Agarplatten der jeweiligen Medien wurde 1,5 % Agar-Agar zugesetzt.

Tab. 6: Zusammensetzung des RR2A Mediums. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6 eingestellt.

Substanz	Menge
Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
Pepton	1 g l ⁻¹
Natriumpyruvat	1 g l ⁻¹
Caseinhydrolysat	0,5 g l ⁻¹
Lösliche Stärke	0,5 g l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,1 g l ⁻¹
MOPS Puffer	10 mM

2.3.3. Litho-autotrophe Kultivierung von *K. spormannii*

Die Kultivierung von *K. spormannii* mit den anorganischen Elektronendonoren H₂ oder elementarer Schwefel (S⁰) erfolgte in Laborglasflaschen (Schott, Mainz). Als Kulturmedium diente ES-Medium (Tab. 7) mit ca. 20 % (v/v) des Flaschenvolumens. Die Flaschen wurden mit Gummistopfen verschlossen, durch zyklischen Vakuumziehen bzw. Begasen mit N₂ anaerobisiert und autoklaviert. Die Inokulation erfolgte mit 1 % einer Vorkultur. Die Kultivierung erfolgte bei 60 °C. Für hydrogenotrophe Wachstumsbedingungen wurde die Gasphase zu Beginn der Kultivierung mit H₂/CO₂/O₂ (80:15:5 % v/v) ausgetauscht (1 bar

Überdruck) und ca. alle 5 Tage erneuert. Für die Kultivierung mit elementarem Schwefel (S^0) als Elektronendonator wurde dem Medium nach dem Autoklavieren $1 \text{ g l}^{-1} S^0$ zugesetzt und eine Gasphase von CO_2/O_2 (95:5 % v/v) verwendet. S^0 wurde durch Tyndallisieren sterilisiert, also an drei aneinander folgenden Tagen für 3 h auf 100 °C erhitzt. Die Probenentnahme für pH-, OD_{600} - und chromatographische Analysen erfolgte steril durch eine Kanüle.

Tab. 7: Zusammensetzung des ES Mediums. Der pH-Wert betrug 3,5.

Substanz	Menge
NH_4Cl	$0,53 \text{ g l}^{-1}$
$NaCl$	$0,15 \text{ g l}^{-1}$
KH_2PO_4	$0,04 \text{ g l}^{-1}$
$CaCl_2$ (0,1 M)	1 ml l^{-1}
$MgSO_4$ (1 M)	$0,12 \text{ ml l}^{-1}$
Wolfe's mineral elixir (Tab. 8)	1 ml l^{-1}

Tab. 8: Zusammensetzung des Wolfe's mineral elixirs. Der pH wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf 1 eingestellt.

Substanz	Menge
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	30 g l^{-1}
$MnSO_4 \times H_2O$	5 g l^{-1}
$NaCl$	10 g l^{-1}
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	1 g l^{-1}
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	$1,8 \text{ g l}^{-1}$
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	1 g l^{-1}
$ZnSO_4 \times H_2O$	$1,8 \text{ g l}^{-1}$
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	$0,1 \text{ g l}^{-1}$
$KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$	$0,18 \text{ g l}^{-1}$
H_3BO_3	$0,1 \text{ g l}^{-1}$
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	$0,1 \text{ g l}^{-1}$
$(NH_4)_2Ni(SO_4)_2 \times 6 H_2O$	$2,8 \text{ g l}^{-1}$
$Na_2WO_4 \times 2 H_2O$	$0,1 \text{ g l}^{-1}$
Na_2SeO_4	$0,1 \text{ g l}^{-1}$

2.3.4. Stammerhaltung

Zur dauerhaften Konservierung der hergestellten Bakterienstämme, wurden Kryokulturen hergestellt. Dafür wurde 1 ml einer Kultur mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4. Bioelektrochemische Biofilmkultivierung

Der Aufbau der Fließzellperipherie für das elektroautotrophe Biofilmwachstum von *K. spormannii* wurden von Max Hackbarth (Engler-Bunte-Institut, Karlsruher Institut für Technologie) entwickelt (Hackbarth *et al.*, 2020). Daher soll hier nur kurz auf den Aufbau und die generelle Funktionsweise der Fließzellen eingegangen werden.

2.4.1. Aufbau der Fließzellen und der Peripherie

Die Fließzellen zur Kultivierung des kathodischen Biofilms wurden aus Polyether-Ether-Keton sowie einer transparenten Polycarbonat-Scheibe gefertigt (Abb. 7). Ein Graphitblock (100 mm x 20 mm; MR40, Müller und Rössner, Troisdorf-Bergheim, DE) wurde im Boden der Fließzelle als Kathode verwendet. Als Anoden dienten sechs Iridium-Tantal beschichtete Titan-Plättchen (Platinode[®] - MMO Anode 177, umicore, Schwäbisch Gmünd, DE), die sich im Fließkanal oberhalb der Kathode befanden. Diese Elektroden wurden von außen mit Titan-Schrauben konnektiert. Die Peripherie innerhalb derer die Fließzellen betrieben wurden, besteht aus rostfreiem Edelstahl (316Ti). Durch den doppelwandigen Medienkessel konnten zum einen die Temperatur über eine externe Wasserbadheizung geregelt, zum anderen der pH-Wert gemessen werden. Dafür wurde eine Orbisint CPS11D-7BA21 pH- und Temperaturelektrode von Endress+Hauser Messtechnik GmbH+Co. KG (Weil am Rhein, DE) verwendet. Außerdem konnte am Medienkessel die Begasung des Mediums durchgeführt werden, wobei ein Magnetrührer für einen besseren Stoffübergang der Gase ins Medium sorgte. Eine Magnetzahnradpumpe von Cole-Parmer (Ismatec Reglo-Z Digital, Wertheim, DE), ausgestattet mit einem Saugschuh-Pumpenkopf (Ismatec Z-1830, Cole-Parmer, Wertheim, DE) beförderte das mit den gasförmigen Substraten angereicherte Medium zur Fließzelle. Die SE23I-Elektrode von Sensortechnik Meinsberg (Waldheim, DE) diente als Referenzelektrode. Das System ist – bis auf die Referenzelektrode – vollständig autoklavierbar, womit die Sterilität vor jedem Versuch gewährleistet werden konnte. Die Referenzelektrode wurde vor dem Einsetzen mit UV-Licht sterilisiert. Ein großer Vorteil bei der Benutzung dieser Peripherie war die

Möglichkeit die Biofilm-Akkumulation nicht-invasiv und *in-situ* durch OCT-Aufnahmen zu visualisieren.

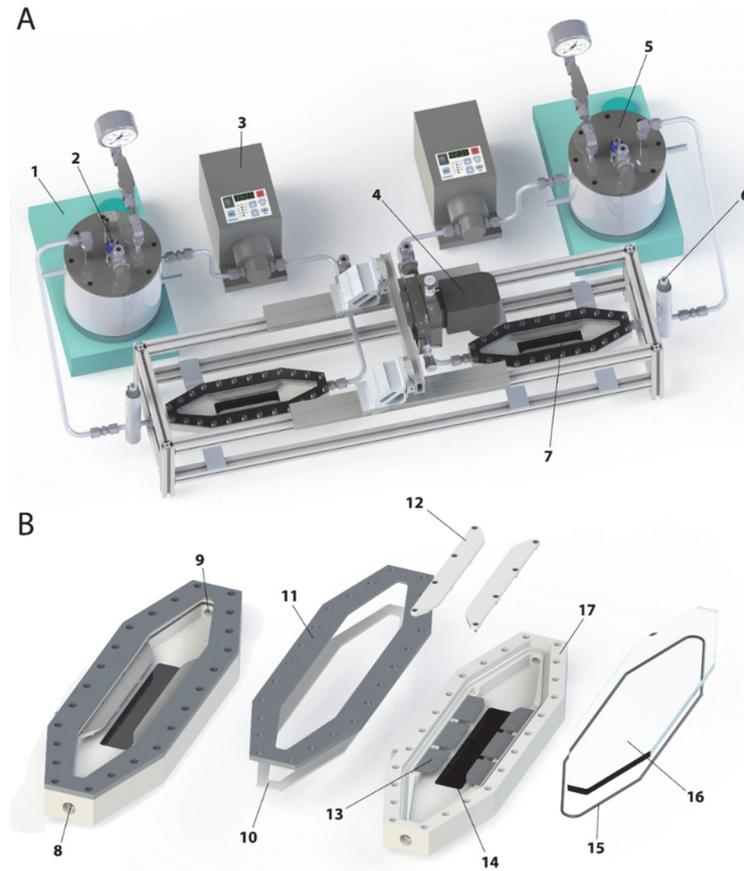


Abb. 7: Darstellung des Aufbaus der Fließzellenperipherie (A) und Explosionszeichnung der Fließzellen (B). 1 – Magnetrührer; 2 – pH-Elektrode; 3 - Magnetzahnradpumpe; 4 – OCT-Sonde; 5 – Doppelwandiger Edelstahlkessel; 6 – Referenzelektrode; 7 – Fließzelle; 8 – Zufluss; 9 - Abfluss; 10 -- Abstandshalter; 11 - Abdeckung; 12 – Anodenhalterung; 13 – Anodensegment; 14 - Kathode; 15 – O-Ring; 16 – Polycarbonat-Abdeckung; 17 – Gehäuse. Aus Hackbarth *et al.*, 2020.

2.4.2. Fließzellen-Kultivierung

Die Kultivierung von *K. spormannii* in den Fließzellen erfolgte in ES-Medium (Tab. 7). Als Vorkultur diente eine in RR2A Medium (Tab. 6) gewachsene Vorkultur, die zwei Mal mit ES-Medium gewaschen wurde. Das System wurde anschließend mit 850 ml Medium mit einer OD_{600} von 0,1 steril befüllt. Die Fließzellen wurden bei einer Temperatur von 60 °C über einen Zeitraum von 10 bzw. 28 Tagen betrieben. Zu Beginn der Kultivierung wurde die Gasphase zu CO_2/O_2 (99,5:0,5 % v/v) durch eine ca. 5-minütige Begasung getauscht und ein Überdruck von 1,5 bar angelegt. Um anfangs die Menge an gelöstem Substrat zu erhöhen, wurde bei offenen Einlass-Ventil noch für weitere 10 min begast. Im Laufe des Experiments wurde alle 2 Tage die Gasphase bei konstantem Überdruck getauscht (für ca. 5 min) und erneut für weitere 10 min begast, bevor die Ventile wieder geschlossen wurden. Die Flussrate der Pumpe wurde auf

100 ml min⁻¹ eingestellt. Um eine für die Zellen möglichst schonende initiale Polarisierung der Elektroden zu erreichen wurde eine lineare Voltammetrie (engl. für *linear sweep voltammetry*, LSV) von 0 bis -500 mV gegen eine Standard Wasserstoff Elektrode (engl.: vs. *standard hydrogen electrode*, vs. SHE) mit einer Schrittgröße von 1 mV verwendet. Direkt im Anschluss wurde in einer Chronoamperometrie (CA) ein Potential für den restlichen Verlauf des Experiments von -500 mV vs. SHE gehalten. Als Potentiostat kam der Interface 1010E von Gamry Instruments (Warmister, USA) zum Einsatz, über den auch der kathodische Stromverbrauch aufgezeichnet wurde. Sowohl für das LSV-, als auch für das CA-Experiment wurde außerdem die iR Kompensations-Methode *current interrupt* (CI; engl. für Strom-Unterbrechung) verwendet um etwaige Widerstandsschwankungen während des Versuchs auszugleichen und damit ein gleichbleibendes Potential zu gewährleisten.

2.5. UV-unterstützte elektroautotrophe Adaption

Um *K. spormannii* auf das elektroautotrophe Biofilmwachstum zu adaptieren wurde eine Langzeitkultivierung in den Fließzellen (siehe 2.4) durchgeführt. Um die Anpassung durch das Auftreten von zufälligen Mutationen weiter zu verbessern wurden die Zellen zusätzlich mit UV-Licht bestrahlt.

Zu Beginn des Experiments wurde *K. spormannii* WT für insgesamt 28 Tage in den Fließzellen als kathodischer Biofilm kultiviert (siehe 2.4.2). Anschließend wurde der gewachsene Biofilm entnommen und ein Teil für die Kultivierung einer heterotrophen Kultur in RR2A verwendet. Mit einem weiteren Teil des Biofilms und mit der ausgebauten Kathode wurden phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt (siehe 2.6.1). Die heterotrophe Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ von ~0,5 zentrifugiert, zwei Mal in ES Medium gewaschen, und diente anschließend als Inokulum für eine weitere 28-tägige Wachstumsphase in den Fließzellen. Vorher wurde die Zellsuspension jedoch einer UV-C ($\lambda_{254 \text{ nm}}$) - Strahlung ausgesetzt, indem diese in eine Petrischale gegeben und 15 cm unter die UV-Lampe VL-4LC von Vilber Lourmant (Collégien, FR) platziert wurde. Die Bestrahlung der Zellen wurde 3 s unter leichtem Schwenken der Petrischale bei geöffnetem Deckel durchgeführt. Diese Prozedur (Biofilmkultivierung – Heterotrophes Wachstum – UV-C Bestrahlung – Biofilmkultivierung) wurde noch zwei weitere Male auf die gleiche Weise verfolgt. Während der Kultivierung nach einer UV-Licht Bestrahlung wurde das Fenster der Fließzelle für mindestens 7 Tage mit Alufolie abgedeckt um eine mögliche Photoreaktivierung zu vermeiden. Schließlich wurde der adaptierte Stamm in einem Vergleichslauf mit dem Wildtyp verglichen. Speziell wurden hierbei

der Stromverbrauch, sowie das Biofilmwachstum der beiden Stämme miteinander verglichen. Zweiteres wurde mithilfe der optischen Kohärenztomographie (siehe 2.6.2) ermittelt. Dafür wurde mindestens täglich der Biofilm an je drei verschiedenen Positionen der Kathoden untersucht.

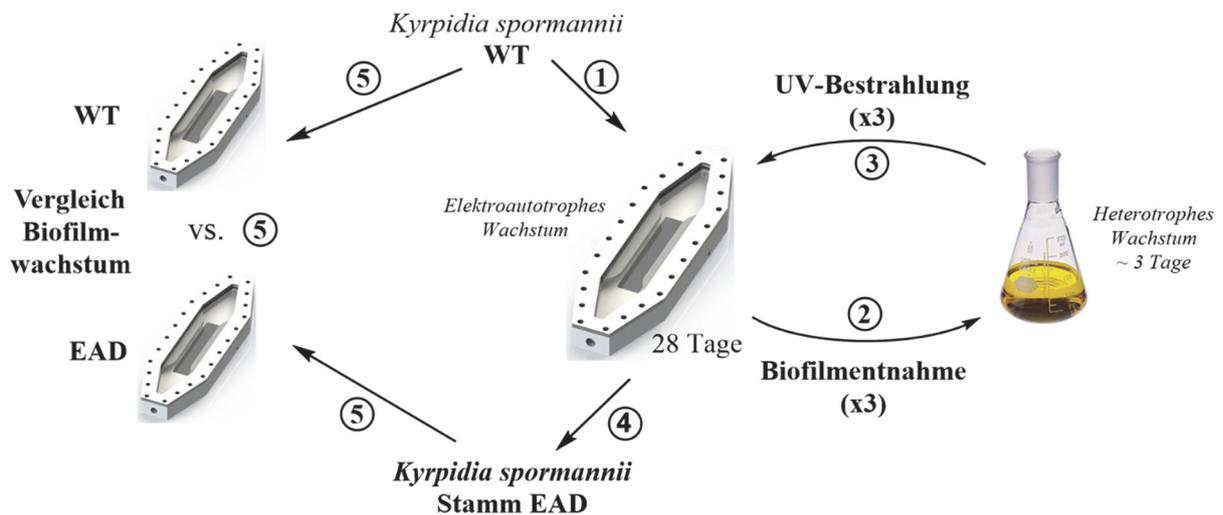


Abb. 8: Schema der UV-unterstützte elektroautotrophe Kultivierung. 1) Kultivierung von *K. spormannii* in der Fließzelle. 2) Biofilmentnahme und heterotrophe Kultivierung. 3) UV-Bestrahlung des Inokulums der erneuten Kultivierung in der Fließzelle. 4) Entnahme des elektroautotroph-adaptierten Stamms. 5) Vergleich des elektroautotrophen Biofilmwachstums des Wildtyps und des adaptierten Stamms.

2.6. Bildgebende Methoden

2.6.1. Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie ist ein Verfahren der Lichtmikroskopie, speziell zur Darstellung farbloser Strukturen. Man nutzt dabei die unterschiedlichen Brechungsindices komplexer Strukturen, wie z.B. Mikroorganismen. Die geringen Phasenänderungen beim Durchdringen dieser Objekte durch das Licht wird in der Phasenkontrastmikroskopie in einen Helligkeitsunterschied umgewandelt und kann somit sichtbar gemacht werden. Die Fluoreszenzmikroskopie, als ein weiteres Verfahren der Lichtmikroskopie, beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenz. Dabei wird ein Elektron eines sogenannten Fluorophors durch Licht einer spezifischen Wellenlänge von einem energetischen Grundzustand auf ein höheres Energieniveau angeregt (Absorption). Diese Wellenlänge wird durch den benutzten Anregungsfilter festgelegt. Fällt das Elektron wieder auf den Grundzustand zurück wird die freiwerdende Energie in Form von Photonen frei (Emission). Da diese generell energieärmer sind als die Anregungsphotonen, ist das Emissionslicht immer langwelliger (Stokes-

Verschiebung). Um speziell nur das Emissionslicht und nicht das Anregungslicht wahrzunehmen wird ein passender Emissionslichtfilter verwendet.

Für beide lichtmikroskopische Methoden wurde das Mikroskop DM5500B von Leica (Wetzlar, DE) verwendet, ausgestattet mit der Leica Kamera DFC360FX. Als Objektive dienten ein 100x Objektiv mit Öl Immersion (HCX PL FLUOTAR 100.0x1.30 OIL), das 63x Dip-In Objektiv APO L63/090W mit Wasserimmersion oder ein 10x Objektiv HCX PL FLUOTAR 10.0x0.30 DRY. Bilder wurden mit der Leica Software LAS-AF erstellt.

2.6.1.1. Nilrot Färbung

Nilrot ist ein fluoreszierender Phenoxazin-Farbstoff der an hydrophobe Strukturen bindet. In dieser Arbeit wurde Nilrot sowohl zur generellen Anfärbung der Zellmembran, als auch zur spezifischen Anfärbung intrazellulärer Polyhydroxybutyrat- (PHB-) Granula verwendet. Es weist dabei ein Absorptionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum bei 605 nm auf. Die verwendeten Filter für die Fluoreszenzmikroskopie wurden darauf angepasst. Als Arbeitskonzentration zur Anfärbung von Zellen wurde eine Nilrot-Konzentration von $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ verwendet, bei der Anfärbung des Biofilms auf Graphitkathoden hingegen $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Die Stammlösung war eine $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Lösung in DMSO. Die Zellen wurden zur Färbung mit dem Farbstoff versetzt und für 5-10 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (*K. spormannii*) bzw. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (*E. coli*) inkubiert bevor sie mikroskopiert wurden.

2.6.1.2. DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur unspezifischen Färbung von DNA. Es dient hierbei meist als Gegenfärbung spezifischerer Farbstoffe. In dieser Arbeit wurde DAPI in einer Konzentration von $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ verwendet. Die Proben wurden 5-10 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend mikroskopiert.

2.6.1.3. Live/Dead Färbung

Zur Bestimmung der Viabilität von Zellen wurde das *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* verwendet (Thermo Fisher, Waltham, USA). Diese Färbung basiert auf der unterschiedlichen Membrangängigkeit zweier DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe. Während Farbstoff SYTO 9 membrangängig ist und sowohl lebende als auch tote Zellen anfärbt, kann der Farbstoff Propidiumiodid die Zellmembran intakter Zellen nicht durchdringen. Lediglich tote Zellen mit eingeschränkter Membranintegrität werden hier angefärbt. Die Färbung wurde sowohl für Biofilm-Flocken als auch mit Teilen der Graphitkathode nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.2. Optische Kohärenztomographie – Prinzip und Auswertung

Die optische Kohärenztomographie (*optical coherence tomography*, kurz: OCT) ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, das es ermöglicht dreidimensionale Scans von Strukturen zu erzeugen, indem deren Oberfläche mit Licht „abgerastert“ wird (Wagner und Horn, 2017). Seit einiger Zeit werden OCT-Aufnahmen außerdem zur Visualisierung von Biofilmen verwendet (Halan *et al.*, 2012; Molenaar *et al.*, 2018). Es handelt sich um ein interferometrisches Verfahren bei dem das Licht einer Lichtquelle von der zu beobachtenden Probe reflektiert und gestreut wird und anschließend mit dem Licht eines Referenzarms interferiert (Wagner und Horn, 2017). Diese Interferenz wird von einem Detektor aufgezeichnet und analysiert um eine dreidimensionale Darstellung der Proben zu erhalten. Da das Licht auch – je nach Oberflächenbeschaffenheit – in der Lage ist in die Probe einzudringen, kann an jedem abgetasteten Punkt ein Tiefenprofil erstellt werden (A-Scan; Z-Richtung). Erfolgt die Aufnahme eines solchen Tiefenprofils nun anhand einer festgelegten Achse bekommt man eine 2D-Ansicht des Biofilmes (B-Scan; in XZ-Richtung). Viele solcher zweidimensionalen „Zeilen“, konsekutiv hintereinander ergeben schlussendlich eine 3D-Aufnahme des Biofilmes (C-Scan, XYZ-Richtung) (Wagner und Horn, 2017). Die OCT-Aufnahmen dieser Arbeit wurden mit einem Ganymede II - LSM04 OCT-Gerät von Thorlabs (Dachau, DE) am Engler-Bunte-Institut (KIT), wie in Hackbarth *et al.*, 2020 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung der generierten OCT-Daten erfolgte, falls nicht anderweitig erwähnt, nach Hackbarth *et al.*, 2020.

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Sicherung synthetisierter DNA-Sequenzen

Extern synthetisierte DNA-Fragmente wurden mittels des *Novagen Perfectly Blunt Cloning Kits* (Merck Millipore, Darmstadt, DE) in dem beiliegenden linearisierten pT7-Vektor gesichert. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.2. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmiden erfolgte mit Hilfe des *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit* (Promega, Mannheim, DE). Nach der Elution wurde die DNA-Konzentration durch das NanoDrop 2000 Spektrophotometer von Thermo Fisher (Waltham, USA) gemessen.

2.7.3. DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von distinkten DNA-Sequenzen wird standardmäßig die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz: PCR) verwendet. Dafür werden Oligonukleotide genutzt, die komplementär an den Grenzen des zu amplifizierenden DNA-Bereichs binden. Diese dienen daraufhin als Ansatzpunkt der DNA-Polymerase. In Tab. 9 sind die in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide (auch Primer genannt) aufgeführt. Bei der Anwendung der PCR wurden zwei Fälle unterschieden:

Für präparative PCR wurde eine HiFi-Polymerase von PCRBiosystems (London, GB) verwendet. Diese zeichnet sich vor allem durch ihre 3'-5'-*proofreading*-Aktivität und die daraus resultierende geringere Fehlerrate aus. Für diese Art der PCR wurde, falls nicht anderweitig erwähnt, ein 50 µl Ansatz gewählt (siehe Tab. 10). Daneben wurden analytische PCRs mithilfe des MangoMix™ von Bionline (Luckenwalde, DE) durchgeführt. Dieser beinhaltet die verhältnismäßig fehleranfällige Taq-Polymerase und wurde daher vor allem für Plasmid- bzw. Konstrukt-Kontrollen verwendet. Als Template dienten hierbei entweder isolierte DNA oder eine Bakterien-Kolonie (Kolonie-PCR). Dabei wurde mit einer Pipettenspitze direkt ein Teil einer Bakterienkolonie von einer Agar-Platte in den PCR Ansatz überführt. Für analytische PCRs wurde standardmäßig ein 15 µl Ansatz verwendet (siehe Tab. 11). Das im Thermocycler angewendete Temperaturprotokoll ist in Tab. 12 dargestellt. Um einen Basenaustausch an einer bestimmten Stelle eines Gens einzuführen (*site directed mutagenesis*) wurden in der PCR *forward* und *reverse* Primer gewählt, welche den Basenaustausch in ihrer Sequenz trugen. Das Gen wurde somit in zwei Teilen amplifiziert und anschließend fusioniert.

PCR-Produkte wurden entweder mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.7.5) oder direkt mithilfe des *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kits* (Promega, Mannheim, DE) aufgereinigt. Die aufgereinigten DNA-Produkte wurden in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Ansonsten wurden alle Schritte nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tab. 9: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Herstellung der einzelnen Plasmide.

Nr.	Name	Sequenz (5' – 3')
<i>Primer für pASK-IBA43plus_his-murA2_{WT}/his-murA2_{Mut}</i>		
1	murA2_iba43EcoRI-OL.FOR	CATCACGGGGCCGGAGACCGCGGTCCC GAATTGGCG ACCATTCTCGTG
2	murA2_iba43PstI-OL.REV	TCCAAGCGCTGAGACCATGGTCCCCCTGCATCACTCC ACCCGCTTGATC
3	Iba43_murA2T698A-OL.FOR	TCGGTTGCGGGGGGTGGAGCACACGGTCAACCCCGA TCGAATCGAAGC
4	Iba43_murA2T698A-OL.REV	AAAAGGTGCCGGCTTCGATTCGATCGGGGTTGACCGT GTGCTCCACC
<i>Primer für pBAD202_phaA_phaQPRBC</i>		
5	phaA_pBADOLI.FOR	TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGGTG GACGTAGTGATTACTTCAG
6	phaA_pBADOLI.REV	TCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTCA CCGGACGTTTTCCAC
7	phaQPRBC_FOR.OLI	AGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGAGTGGAC GGAGGCTTGGTC
8	phaQPRBC_REV.OLI	TCTGCGTTCTGATTTAATCTGTATCAGGCTGAAAATC ACATTGCGTCGTGTGC
<i>Primer für pMET-MS</i>		
9	M.Ksp_pBADNcoI.FOR	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ACCATGGAGAACGGCCAACCTGAC
10	M.Ksp_RBS-SSU.REV	TCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTATTATT CACCTCCAATAATTCCTTG
11	S.Ksp_RBS-MSU.FOR	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGACGG AAAATTATATGTCTCGAATG
12	S.Ksp_pBADPmeI.REV	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCG TTTTCATATTTCAACTTCCTCCTCCGC
13	CmR-p15A_BspHI.FOR	TTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG CTGCACCTGCCATTCATCCGC
14	CmR-p15A_GibNSsiI.REV	CAGAAATCCCTGCTTCGTCCATTTGACAGGCACATTAT GCAACCGATGGGGAAGATCGGG
<i>Primer für pT7Blue_P_{Met}-TK101_{Ksp}</i>		
15	pT7.FOR	AGAGATCAAATCGGATCCCCGG

16	pT7 without MtRNA-Prom.REV	AACTAGCTGCAGCACATCATCC
17	kanR TK101_pT7Gibs.REV	TGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCGATTTGATC TCTTTATCAAAACGGGATCCTCTTAGACAC
18	MtRNA-Prom+kanR TK101_pT7Gibs.FOR	AGGATCTACTAGTCATATGGATGATGTGCTGCAGCTA GTTACTACCATAACAGTCAACCCAG
19	MtRNA-Prom_ kanR TK101 OL.REV	CGATCCGCATATCGCACCTCCTGGGAATCC
20	kanR TK101_MtRNA-Prom-OL.FOR	GAGGTGCGATATGCGGATCGTGAATGGTC
Primer für pG1A/pG2A/pNW33N_P_{Nat}/P_{Met}-TK101_{Ksp}		
21	TK101MetProm_pG1APm eIGibs.FOR	CCACGCCTCCTAAAACGCGATATACGCCGATTATGAG TTTGTTACTACCATAACAGTCAACCCAG
22	TK101NatProm_pG1APme IGibs.FOR	CCACGCCTCCTAAAACGCGATATACGCCGATTATGAG TTTTTGGTTTAAACGAAGATTAGATGCTATAATTG
23	TK101MetProm_pG2APm eIGibs.FOR	ACGGGCCAGTTTGTGAAGATTAGATGCTATAATTGG TTTGTTACTACCATAACAGTCAACCCAG
24	TK101NatProm_pG2APme IGibs.FOR	ACGGGCCAGTTTGTGAAGATTAGATGCTATAATTGG TTTTTGGTTTAAACGAAGATTAGATGCTATAATTG
25	TK101_pGXABgIIIGibs.R EV	AGAAAGCTTGAATTCCCGGGATCCGGATCCGATATCT GCATTATCAAAACGGGATCCTCTTAGACAC
26	TK101MetProm_pNWHin dIIIGibs.FOR	CAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG CCAGTTACTACCATAACAGTCAACCCAG
27	TK101NatProm_pNWEco RIGibs.FOR	CAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG CCATTGGTTTAAACGAAGATTAGATGCTATAATTG
28	TK101_pNWEcoRIGibs.R EV	GATTCGTTTTACTTTCCCGTTCTCTCTGATTGTGAAAT TGTTATCAAAACGGGATCCTCTTAGACAC

Tab. 10: Zusammensetzung eines präparativen PCR-Ansatzes. Standardmäßig wurde ein 50 µl Ansatz verwendet.

Komponente	Menge
5x PCRBIO HiFi Puffer	10 µl
Forward Primer (10 µM)	2 µl
Reverse Primer (10 µM)	2 µl
HiFi Polymerase	0,5 µl
Template DNA	<100 ng cDNA oder <500 ng gDNA
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Tab. 11: Zusammensetzung eines analytischen PCR-Ansatzes. Es wurde standardmäßig ein 15 µl Ansatz verwendet.

Komponente	Menge
MangoMix™ (2x)	7,5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,6 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,6 µl
Template	<100 ng cDNA oder Bakterien-Kolonie
ddH ₂ O	auf 15 µl auffüllen

Tab. 12: Zyklisches Temperaturprotokoll der analytischen und präparativen PCR. Dabei wurden die Schritte 2-4 im Thermocycler 29-30 mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Dauer bei analytischer PCR	Dauer bei präparativer PCR
1 – Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	2 min
2 – Denaturierung	95 °C	30 s	15 s
3 – Primer Anlagerung	50-70 °C	30 s	15 s
4 – Elongation	72 °C	30 s kb ⁻¹	30 s kb ⁻¹
5 – Finale Elongation	72 °C	10 min	10 min
6 – Ende	4 °C	∞	∞

2.7.4. Restriktion

Für eine sequenzspezifische Restriktion innerhalb einer DNA-Sequenz wurden Restriktionsenzyme (bezogen von New England Biolabs, Schwalbach, DE) verwendet. In Tab. 13 ist ein Standard-Restriktionsansatz gezeigt, wobei sich, je nach Restriktionsenzym, der verwendete Puffer unterscheiden konnte. Der Ansatz wurde für 1 h nach Herstellerangaben inkubiert.

Tab. 13: Zusammensetzung eines 50 µl-Restriktionsansatzes.

Komponente	Menge
10x Puffer	10 µl
Plasmid	2 µg
Restriktionsenzym(e)	je 1 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

2.7.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit verwendet um sowohl PCR-Produkte, als auch Restriktionsreaktionen zu analysieren. Hierbei wird die negative Ladung der DNA-Moleküle genutzt, die innerhalb eines Spannungsfeldes zur Kathodenseite migrieren. Erfolgt diese Migration durch ein Agarose-Gel wird die DNA ihrer Molekülmasse – praktisch also der Länge nach – entsprechend aufgetrennt. Hierfür wurde 1 % (w/v) Agarose in Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (Tab. 14) durch Aufkochen gelöst und mit dem DNA-Farbstoff Midori Green (Nippon Genetics, Düren, DE) versetzt. Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V. Als Größenmarker diente der GeneRuler 1 kb von Thermo Fisher (Waltham, USA). Nach der Auftrennung wurden die Gele entweder unter dem Blaulicht-Tisch FastGene B/G LED Transilluminator (Nippon Genetics, Düren, DE) überprüft und einzelne Banden ausgeschnitten oder mit Hilfe des Gel Doc XR System (Bio-Rad, München, DE) visualisiert.

Die Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mittels des *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kits* (Promega, Mannheim, DE). Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in 40 µl ddH₂O aufgenommen. Ansonsten wurden alle Schritte nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Elution wurde die DNA-Konzentration durch das NanoDrop 2000 Spektrophotometer von Thermo Fisher (Waltham, USA) gemessen.

Tab. 14: Zusammensetzung des TAE-Puffers. Der pH wurde mit Hilfe von Essigsäure auf 8,0 eingestellt.

Substanz	Menge
Tris	4,85 g l ⁻¹
EDTA	0,37 g l ⁻¹

2.7.6. Isothermale *in-vitro* Ligation

Die isothermale *in-vitro* Ligation nach Gibson ist eine Methode um DNA-Fragmente in einer Rekombinationsreaktion zusammenzufügen (Gibson *et al.*, 2009). Angefügte homologe Bereiche dieser Fragmente werden über eine 5'-Exonuklease zu Einzelstrangüberhängen abgebaut. Die homologen Bereiche binden nun aneinander und werden anschließend durch eine DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang vervollständigt und das DNA-Rückgrat von einer DNA-Ligase wieder ligiert. In Tab. 15 sind die Bestandteile des Reaktionsansatzes gezeigt. Es wurden 15 µl dieses Ansatzes mit 5 µl DNA-Lösung mit 10 – 100 ng äquimolarer Menge der

jeweiligen DNA-Fragmente versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei 50 °C inkubiert und anschließend für eine Transformation in *E. coli* genutzt (siehe 2.7.8.1).

Tab. 15: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die isothermale *in-vitro* Ligation.

Komponente	Menge
Reaktionspuffer (5x) (Tab. 16)	80 µl
Phusion DNA-Polymerase (2 U µl ⁻¹)	5 µl
Taq DNA-Ligase (40 U µl ⁻¹)	40 µl
T5 Exonuklease (0,1 U µl ⁻¹)	16 µl
ddH ₂ O	239 µl

Tab. 16: Zusammensetzung des 5x-Reaktionspuffers für die isothermale *in-vitro* Ligation.

Substanz	Menge
TRIS (pH 7,5)	500 mM
MgCl ₂	50 mM
dNTPs	1 mM
DTT	50 mM
NAD	5 mM
PEG-8000	25 % (w/v)
ddH ₂ O	250 µl

2.7.7. DNA-Methylierung und Dot-Blot Test

Um eine *in vivo* DNA-Methylierung durchzuführen wurde der Methylierungsstamm mit dem Methylierungsplasmid pMET-MS und dem zu methylierenden Transformationsplasmid in LB-Medium kultiviert. Die Kultur wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,01 inokuliert, das Methylierungsplasmid mit 0,2 mM Arabinose induziert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide isoliert und aufgereinigt (siehe 2.7.2).

Für den Dot-Blot Test wurden die aufgereinigten Plasmid-Lösungen für 3 min bei 95 °C erhitzt und sofort für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden je 2 µl der Plasmid-Lösungen auf eine Nitrocellulose-Membran gegeben und 15 min bei RT getrocknet. Um die DNA auf der Membran zu fixieren (das sogenannte *crosslinking*) wurde sie mit einem UV Stratalinker 1800 von Stratagene für 30 s mit UV-Licht (120.000 mJ) bestrahlt. Die Membran wurde anschließend

für 10 min mit TBST-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween20) gewaschen und 1 h mit 3 % BSA (bovines Serumalbumin) (in TBST; Blockier-Lösung) blockiert. Nun wurde die α -m6A-Antikörper-Lösung zur Membran gegeben (1:1000 Verdünnung in Blockier-Lösung) und für 1 h inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 3 x 5 min und 1 x 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit einem sekundären α -rabbit-IgG-AP Antikörper behandelt (1:7500 in 3 % Milchpulver (in TBST)). Schlussendlich wurde die Membran 4 x 5 min mit TBST und 5 x 2 min mit ddH₂O gewaschen und mit dem AP Conjugate Substrate Kit von BioRad (München, DE) nach Herstellerangaben entwickelt.

2.7.8. Transformationen

2.7.8.1. Elektroporation

Um Bakterienstämme mit Plasmid-DNA zu transformieren müssen die Zellen zunächst vorbereitet werden. Im Falle der Elektroporation wurden elektrokompente Zellen hergestellt, indem alle Salze des Flüssigmediums durch mehrmaliges Waschen mit salzarmem Medium entfernt wurden. Im Folgenden sind die beiden verwendeten Methoden beschrieben, wie *E. coli* und *K. spormannii* für die Elektroporation vorbereitet und transformiert wurden.

Für die Elektroporation von *E. coli* BL21 (DE3) wurde dieser in LB-Medium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 auf Eis gekühlt. Von der Kultur wurde 1 ml entnommen, viermal mit eiskaltem ddH₂O gewaschen, in 100 μ l resuspendiert (Menge für einen Transformationsansatz) und die entsprechende zu transformierende DNA zugegeben. Im Falle der Transformation einer Plasmid-Lösung wurde 100 ng DNA zugesetzt. Wurde ein Ligationsansatz aus 2.7.6 verwendet, wurde dieser zuvor dialysiert. Dafür wurden 20 μ l des Ansatzes auf eine Millipore-Membran (Porengröße 0,25 μ m; Millipore, Darmstadt, DE) aufgetragen, welche zuvor auf ddH₂O in einer Petrischale gelegt wurde. Die Dialyse wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend 5-20 μ l den elektrokompenten Zellen zugesetzt. Die Zell-DNA-Suspensionen wurden nun in vorgekühlte Elektroporations-Küvetten pipettiert. Schlussendlich wurde mithilfe eines Micropulsers™ von BioRad (München, DE) die Elektroporation bei 1,8 kV durchgeführt, die Zellen in vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und für mindestens 1 h schüttelnd inkubiert. Danach wurden sie auf ein entsprechendes Selektionsmedium ausplattiert.

Um *Kyrpidia spormannii* mittels Elektroporation zu transformieren, wurden die Zellen in 100 ml RR2A-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert bevor sie für 10 min bei 4 °C und 6000 x g abzentrifugiert

wurden. Die Zellen wurden in 50 ml Elektroporationsmedium (0,5 M Mannitol, 0,5 M Sorbitol, 10 % (v/v) Glycerin) fünfmal gewaschen und anschließend in 1,5 ml Elektroporationsmedium resuspendiert. Ähnlich wie bei *E. coli* wurden auch hier 100 µl der nun kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA versetzt und in eine Elektroporations-Küvette pipettiert. Die Elektroporation wurden bei 2,1 kV durchgeführt und die Zellen in 1 ml 50 °C-warmem RR2A aufgenommen. Schlussendlich wurden die Zellen über Nacht bei 50 °C inkubiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

2.7.8.2. *Protoplasten Transformation*

Die PEG-induzierte Protoplasten Transformation wurde als eine weitere Methode verwendet um *K. spormannii* zu transformieren. Dabei wird die Zellmembran für die zu transformierende DNA mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) permeabilisiert. Für die Produktion von Protoplasten wurde *K. spormannii* in 100 ml RR2A Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert und für 10 min bei 6000 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 20 ml hypertonem SMMR Medium (2x SMM Puffer (Tab. 17), 2x RR2A (Tab. 6); 1:1 (v/v)) gewaschen und in 10 ml SMMR mit 10 mg ml⁻¹ Lysozym (>35.000 FIP U mg⁻¹) resuspendiert. Um die Zellwand abzubauen wurden die Zellen nun für 22 h bei 37 °C und 130 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Daraufhin wurden der Zellsuspension weitere 10 ml SMMR Medium hinzugefügt und für 10 min bei 5000 x g und RT zentrifugiert, dann wurde zweimal mit 20 ml SMMR gewaschen und abschließend in 2 ml SMMR resuspendiert. Diese Protoplasten-Suspension wurde nun auf Eis gestellt und direkt für die Transformation genutzt. Dafür wurden 100 µl der Protoplasten mit 5 µl Plasmid-Lösung (1,75 – 3 µg DNA) versetzt (bzw. mit ddH₂O für die Negativkontrolle) und 900 µl einer 30 % (w/v) PEG8000-Lösung (in SMMR) zugegeben. Um für eine bessere Aufnahme des PEG-DNA-Gemischs durch die Zellmembran zu sorgen wurde die Suspension für 3 min bei 50 °C und 500 rpm im Heizblock inkubiert. Nach der Transformation wurden 5 ml SMMR hinzugegeben um das PEG zu verdünnen und für 10 min bei 5000 g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml SMMR resuspendiert und bei 50 °C für 24 h inkubiert. Um das Wachstum der Zellen während der Regeneration zu verbessern, wurden die Zellen auf RR2A_{reg}-Agar (0,8 % (w/v) Agar-Agar) ausplattiert (Tab. 18). Nach 2 Tagen wurde zur Selektion Kanamycin auf der Platte ausplattiert um eine Konzentration von 5 µg ml⁻¹ in der Agar-Platte zu erhalten.

Tab. 17: Zusammensetzung von 2x SMM Puffer. Der pH wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt.

Substanz	Menge
Sucrose	1 M
Maleinsäure	40 mM
MgCl (x 6 H ₂ O)	40 mM

Tab. 18: Zusammensetzung von RR2A_{reg} Medium.

Substanz	Menge
RR2A-Medium	Siehe (Tab. 6)
CaCl ₂	2 mM
Sucrose	0,5 M

2.7.8.3. *Sepiolith-basierte Transformation*

Die Sepiolith-basierte Transformation wurde nach einer Methode von Ren und Kollegen durchgeführt (Ren *et al.*, 2017). Diese beruht auf einer chemisch-physikalischen Transformation mit einem Rubidiumchlorid-basierten chemischen Teil und einer physikalischen Sepiolith-basierten Methode. Die physikalische Transformation mit Sepiolith beruht auf dem sogenannten Yoshida-Effekt. Hierbei werden DNA-bindende Nanofasern durch Reibung in die Zelle „gerieben“ und transportieren dabei die Plasmid-DNA in die Zelle. In der hier verwendeten Methode wird durch Anwendung von Rubidiumchlorid die Zellhülle vorher zusätzlich destabilisiert.

Für diese Art der Transformation wurde *K. spormannii* zu Beginn in 20 ml RR2A bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 kultiviert und anschließend zentrifugiert. Die Zellen wurden dreimal in Sepiolith-Puffer (Tab. 19) gewaschen und in 1,5 ml resuspendiert. Das Sepiolith stammte hierfür von Kremer Pigmente GmbH & Co.KG (Aichstetten, DE). Die Zellsuspension wurde mit 1,5 – 3 µg Plasmid-Lösung versetzt und auf RR2A-Agarplatten mit 5 µg ml⁻¹ Kanamycin ausplattiert. Dafür wurde die Zell-DNA-Suspension mit einem Trigalski-Spatel unter leichtem Druck für ca. 10 s auf der Agarplatte ausplattiert, bis eine merkliche Reibung spürbar war und anschließend noch 30 s weiter ausplattiert.

Tab. 19: Zusammensetzung des Sepiolith-Puffers. Der pH wurde mit KOH auf 6,3 eingestellt.

Substanz	Menge
Glycerol	120 g l ⁻¹
MOPS	10,4 g l ⁻¹
RbCl	1,2 g l ⁻¹
CaCl ₂ x 2H ₂ O	14,6 g l ⁻¹
Sepiolith	0,1 g l ⁻¹

2.7.9. Isolation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA wurde das *Wizard Genomic DNA Purification* Kit (Promega, Mannheim, DE) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Elution wurde die DNA-Konzentration durch das NanoDrop 2000 Spektrophotometer von Thermo Fisher (Waltham, USA) gemessen.

2.7.10. Sequenzierungen

Sanger-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) durchgeführt. Es wurden entweder ganze Plasmide oder PCR-Fragmente mit einem gewünschten Sequenzierungs-Primer in den vorgegebenen Konzentrationen verwendet.

Illumina-Sequenzierung

Um die Varianz-Analyse des elektroautotroph adaptierten *Kyrpidia spormannii* durchzuführen wurde die isolierte genomische DNA von Stamm EAD isoliert (siehe 2.7.9) und mithilfe einer Illumina-Sequenzierung sequenziert. Diese gehört zu den *Next Generation Sequencing* Methoden und bietet mehrere Vorteile: zum einen können mehrere Millionen DNA-Stücke parallel sequenziert werden, wodurch die Kosten gegenüber herkömmlichen Methoden drastisch reduziert werden. Zum anderen hat diese Methode eine sehr geringe Fehlerrate.

Die Illumina-Sequenzierung in dieser Arbeit wurde bei IMG M Laboratories GmbH (Martinsried, DE) durchgeführt. Die isolierte genomische DNA wurde fragmentiert und die DNA Bibliothek mit dem *NEBNext® Ultra™ II FS DNA library preparation* Kit erstellt. Die eigentliche Sequenzierung wurde auf einer Illumina MiSeq Plattform mit einer 2 x 150 bp (PE150) Sequenzierung durchgeführt. Die erwartete Abdeckung belief sich auf 40 Millionen *reads* (engl. für sequenzierte DNA-Fragmente). Die Prozessierung der erhaltenen Daten wurde

mithilfe der Software CLC Genomics Workbench v. 12.0 von Qiagen (Aarhus, Dänemark) durchgeführt (siehe 2.10.4).

2.8. Proteinbiochemie

2.8.1. Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der Expressionsstamm BL21 (DE3) verwendet. Dieser wurde mit den entsprechenden Plasmiden in 2xYT Medium (für die Expression von MurA2) (Tab. 4) oder in TB_{Gluk}-Medium (PHB-Synthesegene) (Tab. 5) bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und die Proteinexpression mit 0,43 µM Anhydrotetracyclin (AHT) (MurA2) bzw. 0,43 µM AHT und 100 µM L-Arabinose (PHB-Synthesegene) induziert. Die Zellen wurden nun weitere 20 h bei 30 °C (MurA2) oder 37 °C (PHB-Synthesegene) und 180 rpm inkubiert. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der PHB-Granula wurden diese Zellen direkt weiterverwendet, ansonsten wurden die Zellen bei 6000 x g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.8.2. Präparation der Plasmafraktion

Das Zellpellet wurde in HEPES-Puffer (Tab. 20) resuspendiert (0,15 g Pellet ml⁻¹) und der Zellsuspension anschließend je eine Spatelspitze DNase (Appliechem, Darmstadt, DE) und Lysozym (Sigma-Aldrich, München, DE) zugesetzt. Die Zelllyse erfolgte in einer French Press Modell FA-079 von SLM Aminco (Urbana, USA) bei einem Druck von 1200 psi. Um die löslichen Bestandteile des Zelllysats zu präparieren wurden die unlösliche Zellbestandteile bei 206.000 x g für 45 min bei 4 °C in der Ultrazentrifuge L8-70M von Beckmann-Coulter (Brea, USA) abzentrifugiert. Der Überstand (Plasmafraktion) wurde weiterverwendet.

Tab. 20: Zusammensetzung des HEPES-Puffers. Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Menge
HEPES	20 mM
NaCl	250 mM

2.8.3. Hitzefällung

Um die Plasmafraktion von *E. coli* mit den heterolog exprimierten Proteinen aus *K. spormannii* weiter anzureichern wurde eine Hitzefällung durchgeführt. Diese beruhte auf der Tatsache, dass die hitzelablen Proteine des mesophilen Organismus *E. coli* bei erhöhter Temperatur denaturieren, während die hitzestabilen Proteine von *K. spormannii* gelöst bleiben und sich somit anreichern. Damit konnte das Risiko einer Verunreinigung nach der affinitätschromatographischen Reinigung des gewünschten Proteins verringert werden. Die Hitzefällung erfolgte nach einer modifizierten Methode von De Marco und Kollegen (De Marco *et al.*, 2004). Dafür wurde die Plasmafraktion mit PEG6000 (Endkonzentration 4,5 %) versetzt und für 30 min bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, über Nacht bei 4 °C gelagert und für die IMAC weiterverwendet (2.9.1).

2.8.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteingehalts von Proteingemischen wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Dabei bindet der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue in saurer Umgebung unspezifisch an die basischen Seitenketten von Aminosäuren. Als Standard wurde BSA (bovines Serumalbumin) in den Konzentrationen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg ml⁻¹ verwendet. Die zu messenden (verdünnten) Proben und Standards (je 20 µl) wurden mit Bradford-Reagenz versetzt (180 µl) (Tab. 21). Nach einer Inkubation für 5 min wurde die Absorption in einer Mikrotiterplatte bei 595 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration der gereinigten MurA-Varianten wurde durch den NanoDrop 2000 Spectrophotometers von Thermo Fisher (Waltham, USA) gemessen. Die Konzentration wurde unter der Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizients 10680 M⁻¹ cm⁻¹ und des Molekulargewichts von 46,8 kDa ermittelt. Der Extinktionskoeffizient wurde durch das ProtParam Tool ermittelt (Gill und von Hippel, 1989).

Tab. 21: Zusammensetzung der Bradford-Reagenz. Die Substanzen wurden in der Reihenfolge von unten nach oben zugesetzt und filtriert.

Substanz	Menge
Coomassie brilliant blue G250	100 ml
Ethanol 96 %	50 ml
Konz. Phosphorsäure	100 ml
ddH ₂ O	750 ml

2.8.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Dafür wurden die Proteinproben mit SDS-Ladepuffer versetzt (Tab. 22) und 5 min bei 90 °C erhitzt. Die Hitze und das β -Mercaptoethanol führen dabei zur Auflösung der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine, während SDS (Natrium-Dodecylsulfat) die Eigenladung der Proteine überdeckt und ihnen eine negative Nettoladung gibt. Dadurch können Proteine allein anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die verwendeten diskontinuierlichen SDS-Gele bestehen aus einem Sammelgel (4 % Acrylamid, pH 6,8) und einem Trenngel (12 % Acrylamid, pH 8,8) (Tab. 23). Im Sammelgel werden die Proteine zwischen einem Ladungsgradienten aus Cl-Ionen und Glycin-Zwitterionen in einem kleinen Bereich konzentriert (Isotachophorese). Die Änderung des pH-Werts im Trenngel resultiert in Glycin-Anionen, wodurch der Ladungsgradient aufgehoben wird und die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend durch das Trenngel wandern. Als Laufkammer diente eine Mini-PROTEAN® TetraCell von BioRad (München, DE) gefüllt mit SDS-Laufpuffer (Tab. 24). Während des Durchlaufens des Sammelgels wurde eine Spannung von 120 V angelegt, bzw. 150 V, sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten. Die Proteinbanden des Gels wurden unspezifisch mit Coomassie InstantBlue™ (Expedeon Ltd., Harston, UK) nach Herstellerangaben gefärbt.

Tab. 22: Zusammensetzung des 6x Ladepuffers für die SDS-PAGE.

Substanz	Menge
Glycerin	4,75 ml
2 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,75 ml
β -Mercaptoethanol	1,5 ml
0,5 % (w/v) Bromphenolblau	5 mg
SDS (20 % (w/v))	3 ml

Tab. 23: Zusammensetzung der diskontinuierlichen SDS-Gele. Die Angaben sind angegeben für 1 kleines Gel.

Substanz	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12%)
ddH ₂ O	2,19 ml	1,55 ml
Acrylamid-Lösung (30 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	412,5 µl	1,8 ml
2 M Tris-HCl	187,5 µl (pH 6,8)	1,125 ml (pH 8,8)
20 % SDS (w/v)	15 µl	22,5 µl
10 % APS (w/v)	15 µl	22,5 µl
TEMED	3,75 µl	4,5 µl

Tab. 24: Zusammensetzung von 1 l des SDS-Laufpuffers (10x). Der pH wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt.

Substanz	Menge
SDS	10 g
Glycin	144 g
Tris	30 g

2.8.6. Colorimetrischer MurA Aktivitätstest

Um die UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase-Aktivität der gereinigten MurA2-Varianten sowohl qualitativ, als auch quantitativ zu messen wurde ein modifizierter Enzymtest nach Li und Kollegen durchgeführt (Li *et al.*, 2012). Dabei wird das anorganische Phosphat (P_i) nachgewiesen, welches bei der Reaktion von UDP-Acetylglucosamin (UDAG) und Phosphoenolpyruvat (PEP) entsteht. Dieser Nachweis funktioniert indem freies Phosphat zusammen mit Molybdat einen Komplex bildet, der wiederum die Farbwechsel des Farbstoffs Malachitgrün von gelb zu grün/blau hervorruft (Lanzetta *et al.*, 1979). Der Reaktionsmix bestand aus einem 200 µl-Ansatz mit 50 mM HEPES Puffer (pH 7,5), 10 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM UDAG und jeweils 7,5 µg der gereinigten Proteine. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Protein. Vor dem Start der Reaktion durch die Zugabe von 1 mM PEP wurde der Reaktionsmix für 15 min in einem Heizblock bei 60 °C inkubiert. Die Reaktion lief ebenfalls bei 60 °C ab. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden jeweils 10 µl Probe entnommen und die Reaktion mit 490 µl der Färbelösung (Tab. 25) gestoppt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Als Standard einer P_i-Eichkurve diente NaH₂PO₄ in verschiedenen Konzentrationen. Die

Aktivitätsbestimmung erfolgte durch die 1. Ableitung eines polynomialen Fits (3. Ordnung, $R^2 > 0,96$) der auf die erhaltenen Daten angewendet wurde.

Tab. 25: Zusammensetzung der Färbelösung. Die einzelnen Komponenten wurden in 0,7 M HCl gelöst und durch ein Whatman-Paper filtriert. Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Substanz	Menge
Malachitgrün-oxalat	0,03 % (w/v)
Ammoniummolybdat	0,2 % (w/v)
Triton X-100	0,05 % (v/v)

2.9. Analytische Methoden

2.9.1. Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Zur spezifischen Reinigung von Proteinen wurde in dieser Arbeit die Immobilisierte Metallionen Affinitäts-Chromatographie (IMAC) genutzt. Dabei wird das zu reinigende Protein mit einem Affinitäts-Tag versehen, welcher spezifisch an bestimmte Metall-Ionen bindet. Der hier verwendete Polyhistidin-Tag (His₆-Tag) hat die Eigenschaft an immobilisierte Ni²⁺-Ionen zu binden. Anschließend wird die Bindung zwischen Ni²⁺ und dem His₆-Tag durch die kompetitive Bindung von Imidazol (einem Histidin-Strukturanalog) wieder gelöst. Die Reinigung wurde mit einer HisTrapTM HP-Säule von GE Healthcare (Freiburg, DE) an einer BioLogic DuoFlow von BioRad (München, DE) durchgeführt mit einer konstanten Pumpenrate von 1 ml min⁻¹. Zur Probenvorbereitung wurde die Zellplasmafraktion nach der Hitzefällung durch einen 0,2 µm Filter von VWR (Darmstadt, DE) filtriert und anschließend auf die Säule geladen, die mit 20 mM Imidazol in HEPES-Puffer equilibriert wurde. Der gleiche Puffer wurde nun zum Waschen der Säule verwendet (10 Säulenvolumen, SV). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit Elutionspuffer (Tab. 26) in variierender Imidazol-Konzentration. Zuletzt wurde die Säule mit 10 SV Elutionspuffer und 5 SV 20 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte bei 4 °C.

Tab. 26: Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Ni²⁺-IMAC. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Menge
HEPES	20 mM
NaCl	250 mM
Imidazol	500 mM

2.9.2. Polyhydroxybutyrat-Nachweis mittels HPLC

2.9.2.1. Lyophilisation von *E. coli*

Um einen quantitativen Nachweis des gebildeten PHBs in *E. coli* BL21 pBAD202_phaA_phaQPRBC zu erhalten, wurden die Zellen gefriergetrocknet (lyophilisiert) um später die ermittelte PHB-Menge auf die Zelltrockenmasse zu beziehen. Dafür wurde der Stamm, wie in 2.6.1 beschrieben, kultiviert, bei 6000 x g für 10 min 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet zweimal in PBS-Puffer (Tab. 27) gewaschen. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -40 °C und einem Unterdruck von 0,08 mbar für 40 h in der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LOC-19 von Christ (Osterode am Harz, DE) lyophilisiert.

Tab. 27: Zusammensetzung des PBS-Puffers (pH 7,4).

Substanz	Menge
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,76 mM

2.9.2.2. Extraktion und saure Hydrolyse von PHB

Für die Extraktion von PHB aus *E. coli* wurden in dieser Arbeit 100 mg der lyophilisierten Zellen in einer 12,5 % (w/v) NaClO-Lösung resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Im Gegensatz zum enthaltenen PHB werden durch NaClO die einzelnen Zellbestandteile durch Denaturierung und Hydrolyse zersetzt und gehen in Lösung. Anschließend wurde die Lösung mit 2,5 ml ddH₂O aufgefüllt und für weitere 24 h bei RT inkubiert. Das PHB bildete in dieser Zeit auf dem Boden des Reaktionsgefäßes einen weißen Niederschlag. Der Überstand wurde nun abgenommen und der Niederschlag zweimal mit ddH₂O und einmal mit Isopropanol gewaschen. Schlussendlich wurde der PHB-Niederschlag in 3 ml 60 °C-heißem Chloroform gelöst, in ein mit Chloroform gereinigtes Glasgefäß überführt und eingedampft. Vor dem quantitativen und qualitativen Nachweis von PHB musste das unlösliche Polymer PHB zunächst in sein lösliches Monomer Crotonsäure zersetzt werden. Dafür wurde das extrahierte PHB in konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und bei 100 °C für 1 h gekocht. Für den Nachweis der Crotonsäure mittels HPLC wurden die Proben auf eine H₂SO₄-Konzentration von 0,05 M mit ddH₂O verdünnt und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

2.9.2.3. Nachweis mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um die Konzentration des PHB-Monomers Crotonsäure in den Hydrolysaten zu bestimmen, wurde dessen Konzentration mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Die Eichgerade zur quantitativen Bestimmung wurde kommerziell erwerbliches P3HB von Sigma Aldrich (Steinheim, DE) erstellt, welches ebenfalls einer sauren Hydrolyse unterzogen wurde (P3HB-Mengen: 10 mg, 5 mg, 1 mg, 0,5 mg und 0,1 mg P3HB). Die Proben und die Standards wurden durch einen 0,2 µm PTFE-Filter von VWR (Darmstadt, DE) filtriert und je 150 µl in eine Mikrotiterplatte gegeben. Diese wurde durch ein PCR Plate Sealing Film (BioRad, München, DE) verschlossen. Für die Analyse wurde ein Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 SD HPLC System von Thermo Fisher (Waltham, USA) ausgestattet mit einer Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm) von Bio-Rad (München, DE) verwendet. Es wurden je 50 µl der Probe in das Gerät injiziert und bei einer Flussrate von 600 µl min⁻¹ und einer Temperatur von 60 °C analysiert. Als Laufmittel diente 5 mM H₂SO₄ in einer isokratischen Methode. Die Detektion des Monomers erfolgte bei einer Absorption von 210 nm mittels eines *diode array detectors* DAD-3000 (RS) von Thermo Fisher (Waltham, USA). Zur Auswertung des Chromatogramms wurde die Software Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon (Version 7.2 SR4) verwendet.

2.9.3. Ionenaustauschchromatographie (IC)

Die Ionenaustauschchromatographie (kurz: Ionenchromatographie, IC) wurde in dieser Arbeit verwendet um das Anion Sulfat (SO₄²⁻) zu analysieren und zu quantifizieren. Bei der Ionenchromatographie macht man sich die unterschiedliche Affinität der Ionen zu einer stationären Phase zunutze. Dadurch erreicht man eine Trennung der einzelnen Ionen einer Probe mit einer jeweils spezifischen Retentionszeit. Hier wurde der Ionenchromatograph Dionex ICS-1100 von Thermo Fisher (Waltham, USA) verwendet. Als stationäre Phase wurde die Anionenaustauschsäule Dionex™ IonPac™ AS9-HC (2 x 250 mm) verwendet, welcher die Vorsäule Dionex™ IonPac™ AG9-HC (2 x 50 mm) vorgeschaltet war (jeweils von Thermo Fisher (Waltham, USA)). Als Eluent wurde eine 0,9 mM Natriumcarbonatlösung eingesetzt. Um die Grundleitfähigkeit des Eluenten zu verringern, wurde ein Suppressor (AERS 500 (2 mm), Thermo Fisher, Waltham, USA) vor den eigentlichen Leitfähigkeitsdetektor DS6 Heated Conductivity Cell von Thermo Fisher (Waltham, USA) geschaltet. Der Suppressor wurde bei 12 mV betrieben. In der verwendeten Methode wurde eine Flussrate von 0,25 ml min⁻¹ und eine Temperatur von 30 °C verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben der Wachstumskurven mit einem 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter von VWR

(Radnor, USA) filtriert um Zellen und andere Partikel zu entfernen. Um eine Quantifizierung durchführen zu können, wurde eine Kalibriermessreihe mit Natriumsulfat erstellt. Mithilfe der Software Chromeleon 7 (Thermo Fisher, Waltham, USA) konnten anschließend die Analyten identifiziert und quantifiziert werden.

2.10. Bioinformatische Methoden

2.10.1. Allgemeine *in-silico* DNA-Arbeiten

Allgemeine *in-silico* DNA-Arbeiten wurden mithilfe der CLC Main Workbench v. 8.1 von Qiagen (Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Dies schließt besonders das Erstellen von Primern, *alignments* und Sekundärstruktur-Analysen ein. Für die Plasmidannotationen und die Erstellung der Plasmidkarten wurde der SnapGene Viewer v. 5.0.7 von GSL Biotech LLC (Chicago, USA) verwendet.

2.10.2. Codon-optimierung

Die Optimierung der tRNA-Codons für *K. spormannii* erfolgte mithilfe des Web-Tools OPTIMIZER (Puigbò *et al.*, 2007). Hier wurde die Methode „*guided random*“ zur Codon-Optimierung gewählt. Diese wählt die Codons der einzelnen Aminosäuren anhand ihres prozentualen Vorkommens in der DNA des jeweiligen Organismus aus. Die Wahrscheinlichkeiten der Codons von *K. spormannii* wurde den Genomsequenzierungs-Daten entnommen (Reiner, Lapp, *et al.*, 2018).

2.10.3. Restriktionsmodifikationssystem Analyse

Die Analyse des Restriktionsmodifikationssystem (R/M-System) von *K. spormannii* wurde von der REBASE-Datenbank durchgeführt (Roberts *et al.*, 2015). Diese erstellte aufgrund der in den PacBio-Sequenzierungsdaten aufgezeichneten DNA-Modifikationen von *K. spormannii* und Homologie-Daten zu bereits bekannten R/M-Systemen potentielle R/M-System-Gencluster und ordnet ihnen die jeweiligen Methylierungsmuster zu.

2.10.4. Genomische Variantendetektion

Die Detektion der genomischen Variationen in den Illumina Sequenzierungsdaten des elektroautotroph adaptierten *K. spormannii* Stamms EAD wurde mithilfe der CLC Genomics Workbench v. 12.0 von Qiagen (Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Falls nicht anderweitig erwähnt, wurden die Standard-Parameter der einzelnen Plugins verwendet. Zunächst wurden

die erhaltenen Rohdaten der Illumina-Sequenzierung (siehe 2.7.10) prozessiert. Dafür wurden die Sequenzierung benötigten Adaptersequenzen getrimmt und *reads* mit einer zu geringen Qualität entfernt ($p < 0,05$). Anschließend wurden die *reads* mit dem Referenzgenom von *K. spormannii* abgeglichen und anhand dieses *mappings* die Variantendetektion durchgeführt. Diese erfolgte mithilfe des *Low Frequency Variant Detection* Plugins mit einer *required significance* von 1 % und einer *minimum frequency* von 10 %.

2.10.5. BLAST- und Proteindomänen-Analysen

Sequenzhomologie-Analysen wurden mithilfe der BLAST-Analyse auf den Servern des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Rockville Pike, Bethesda MD, USA) anhand der *non-redundant protein sequences (nr)* Datenbank durchgeführt. Die Analyse konservierter Proteindomänen erfolgte ebenfalls auf den Servern von NCBI anhand der *conserved domain database (CDD)*. Diese schließt nicht nur NCBI-eigenen Proteindomänen-Datenbanken, sondern auch externe wie Pfam, SMART, COG, PRK oder TIGRFAM mit ein.

2.10.6. Proteinmodellierung und Darstellung

Die Vorhersage der 3D-Modelle von Proteinen wurde standardmäßig mit SWISS-MODEL anhand des *templates* mit dem höchsten GMQE-Wert (*global model quality estimation*) durchgeführt (Waterhouse *et al.*, 2018). Allein für die 3D-Modell-Vorhersage von PhaP_{K_{sp}} wurde RaptorX verwendet (Källberg *et al.*, 2012). Für beide Methoden wurden jeweils die Standardparameter verwendet. Die Darstellung der Proteinmodelle erfolgte mit PyMOL v. 2.3.2 von Schrodinger (New York, USA).

III. Ergebnisse

Die folgenden aufgeführten Ergebnisse sind in drei Teilabschnitte gegliedert. Im ersten Teil werden die Ergebnisse der Adaption von *Kyrpidia spormannii* an die elektroautotrophen Wachstumsbedingungen in den Fließzellen gezeigt. Dabei wird auf die phänotypischen Eigenschaften des adaptierten Stamms, in Form von makroskopischen, mikroskopischen und elektrochemischen Untersuchungen im Vergleich zu dem *K. spormannii* Wildtyp eingegangen. Der adaptierte Stamm wurde anschließend genotypischen Untersuchungen zur Aufklärung potentieller genomischer Variationen unterzogen. Im zweiten Teil werden sowohl die bioinformatischen Analysen der Gene bzw. Genprodukte des PHB-Synthese-Genclusters (*cluster*: engl. für Gruppe) von *K. spormannii*, als auch die Ergebnisse zu dessen heterologer Expression in *E. coli* gezeigt. Im dritten Teil sollen zudem die Ergebnisse zur Entwicklung eines genetischen Systems für *K. spormannii* aufgeführt werden.

3.1. Adaption von *Kyrpidia spormannii* an elektroautotrophe Wachstumsbedingungen

Um das kathodische Biofilmwachstum von *Kyrpidia spormannii* zu optimieren wurde ein iterativer Langzeitkultivierungsansatz verfolgt. Um die natürliche Mutationsrate zu steigern, wurde das Inokulum jedes Zyklus zusätzlich mit UV-Licht ($\lambda_{254\text{nm}}$) bestrahlt. Die Kultivierung erfolgte insgesamt für vier Mal vier Wochen in den beschriebenen Fließzellenperipherien. Eine beispielhafte fotografische Aufnahme des kathodischen Biofilms aus diesen Versuchen, ist in Abb. 9 dargestellt. Es war dabei möglich, die Bildung eines Biofilms mit bloßem Auge als grauen Schleier auf der schwarzen Kathode zu erkennen. Da das Ziel des Experiments in erster Linie die Verbesserung des Biofilmwachstums darstellte und dies durch den abschließenden Vergleich mit dem Wildtyp evaluiert werden sollte, wird an dieser Stelle auch auf eine Darstellung der Stromdichten der jeweiligen iterativen Durchgänge verzichtet. Ein weiterer Grund hierfür ist die Tatsache, dass die gemessenen Stromdichten als alleiniger Parameter, keine oder nur bedingt Aussagen über die zugrundeliegenden elektrochemischen Vorgänge liefern. Speziell in oxischen Systemen, kann die kathodische Reduktion von Sauerstoff einen starken Einfluss auf die gemessene Stromdichte haben, sodass dessen Evaluation, nur zusammen mit den ausgewerteten OCT-Aufnahmen der Vergleichs-Kultivierung, vorgenommen wurde.



Abb. 9: Fotografische Aufnahme des Biofilms von *Kyrpidia spormannii* nach 10 Tagen Inkubation. Der Biofilm ist als gräulicher Schleier auf der schwarzen Kathode zu erkennen. Die verwendete Graphitkathode ist 10 x 2 cm (L x B) groß. Die Fließrichtung des Mediums innerhalb der Fließzelle ist gekennzeichnet.

3.1.1. Kathodisches Biofilmwachstum von *K. spormannii* Stamm EAD

Nach Abschluss des letzten Kultivierungszyklus wurde der adaptierte Stamm (nachfolgend *Kyrpidia spormannii* Stamm EAD bzw. EAD bezeichnet) hinsichtlich des kathodischen Biofilmwachstums einem Vergleich gegenüber dem Wildtyp-Stamm unterzogen. Dafür wurden während der Kultivierung die erreichten Stromdichten aufgezeichnet, das Augenmerk lag jedoch speziell auf der Bestimmung des Biofilmwachstums beider Stämme. Um die Biofilm-Akkumulation zu quantifizieren wurden Aufnahmen mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) angefertigt. Die Aufnahmen wurden am Engler-Bunte-Institut des KITs in Karlsruhe angefertigt. Durch das transparente Polycarbonat-Sichtfenster der Fließzelle konnte das Biofilmvolumen und dessen Oberflächenbeschaffenheit *in situ* mittels OCT-Messungen bestimmt werden. Zu jedem Messzeitpunkt wurden 6,0 x 4,0 x 3,0 mm (B x L x H) große Bereiche an drei verschiedenen Messstellen der jeweiligen Kathode aufgenommen. Diese unterschieden sich in erster Linie in ihrer Überströmgeschwindigkeit und den konstruktionsbedingten Strömungseigenschaften (Hackbarth *et al.*, 2020). Eine Strömungssimulation der verwendeten Fließzellen, sowie eine Markierung der beobachteten Messstellen im vorderen (A; nach 8 mm), im mittleren (B; nach 48 mm) und im hinteren (C; nach 88 mm) Teil der Kathode sind in Abb. 10 dargestellt. Die Abbildung zeigt zusätzlich die korrespondierenden Überströmgeschwindigkeiten, 0,5 mm oberhalb der Kathode ($v_{0,5 \text{ mm}}$).

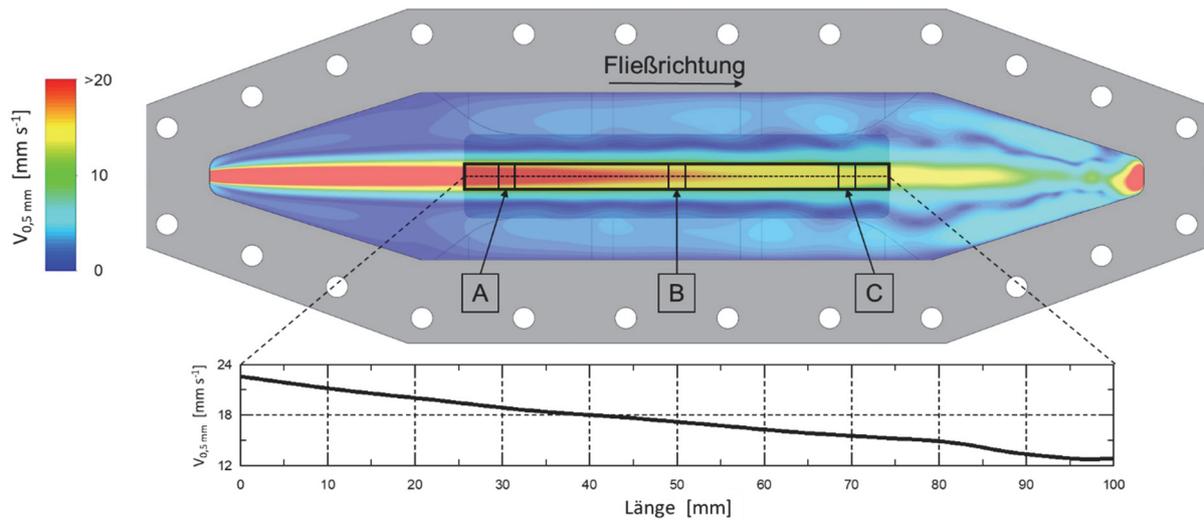


Abb. 10: Strömungssimulation der verwendeten Fließzellen. Die Strömungslinien zeigen die resultierende Strömungsgeschwindigkeit des Mediums bei einem Volumenstrom von 100 ml min^{-1} , $0,5 \text{ mm}$ oberhalb der Kathodenoberfläche ($v_{0,5 \text{ mm}}$). Zusätzlich ist $v_{0,5 \text{ mm}}$ über die Länge der Kathode in einem Diagramm dargestellt. Die Messstellen der OCT-Aufnahmen sind mit A, B und C gekennzeichnet. Aus Hackbarth *et al.*, 2020.

3.1.1.1. Biovolumen und Akkumulationsraten

Um den Biofilm zu charakterisieren wurde das Biovolumen BV anhand der Auswertung der einzelnen OCT-Messungen bestimmt. Es stellt eine Normalisierung des ermittelten Biofilmvolumens auf die beobachtete Fläche dar (Wagner und Horn, 2017). Die Auswertung des Biovolumens über den Kultivierungszeitraum von 10 Tagen für die jeweiligen Messstellen ist in Abb. 11A dargestellt. Die Graphen wurden anhand der analysierten Daten mit einem polynomialen Fit 5. Ordnung ($R^2 > 0,96$) erstellt (Bauer *et al.*, 2019; Hackbarth *et al.*, 2020). Für alle Messstellen konnte die Akkumulation von Biofilm beobachtet werden. Der Verlauf von BV kann für beide Biofilme grob in drei Phasen eingeteilt werden: Zu Beginn (EAD: Tag 0-3; WT: 0-5) steigt BV an, erreicht anschließend eine ca. dreitägige Plateauphase, bevor es erneut ansteigt (EAD: ab Tag 5; WT ab Tag 8). Zwischen den einzelnen Messstellen unterscheidet sich das maximal erreichte BV . Unabhängig des getesteten Stammes ist zu beobachten, dass das gemessene maximale BV höher ist, je weiter sich die Messstelle im hinteren Teil der Kathode befindet. Die Beobachtung konnte schon in früheren Experimenten gemacht werden (Hackbarth *et al.*, 2020). Ein Vergleich des maximalen BV zeigt, dass an Messstelle A und B zwischen den Stämmen nur ein kleiner Unterschied festgestellt werden kann. Beide Stämme erreichten ein maximales BV an den Stellen A und B von ca. $45 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ (A) bzw. $70 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ (B). Einzig an Stelle C konnte ein ca. 33 % größeres maximales BV bei Stamm EAD gemessen werden (136 bzw. $102 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$). Um einen besseren

Vergleich mit den später gezeigten Parametern zu ermöglichen, wurde zusätzlich das mittlere Biovolumen \overline{BV} des gesamten kathodischen Biofilms berechnet. Die Beobachtung, dass es möglich ist, \overline{BV} über den Mittelwert der hier verwendeten einzelnen Messstellen realitätstreu zu berechnen, konnte für den Biofilm von *K. spormannii* in diesen Fließzellen schon gezeigt werden (Hackbarth *et al.*, 2020). Bei der Betrachtung des Graphen von \overline{BV} ist der zeitliche Verlauf mit der Einteilung in drei Phasen (Akkumulation – Plateau – Akkumulation) ebenfalls zu erkennen (Abb. 11B). Das maximale \overline{BV} des kathodischen Biofilms von Stamm EAD betrug ca. $85 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$, und damit eine Steigerung von 18 % im Vergleich zum Wildtyp.

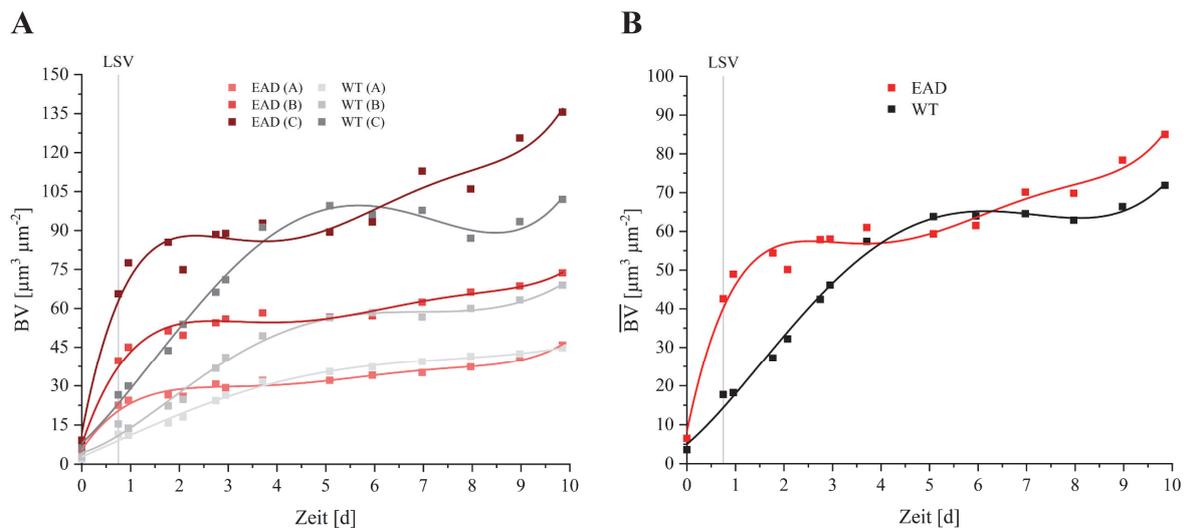


Abb. 11: Verlauf des ermittelten Biovolumens BV und des mittleren Biovolumens \overline{BV} von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. A, zeigt den Verlauf von BV für die einzelnen Messstellen der beiden Stämme, während B den Verlauf von \overline{BV} darstellt. Die Kurven stellen einen polynomialen Fit (5. Ordnung) dar ($R^2 > 0,96$). Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.

Ein weiterer Parameter welcher betrachtet wurde, ist die Biofilm Akkumulationsrate BV^* (Wagner und Horn, 2017). Diese wurde durch die erste Ableitung der Biovolumen-Polynome errechnet. Die erstellten Graphen des zeitlichen Verlaufs der Akkumulationsraten sind in Abb. 12A abgebildet. Es wird deutlich, dass sich der Verlauf von BV^* besonders in den ersten fünf Kultivierungstagen unterscheidet. Beim Wildtyp steigt BV^* zu Beginn der Kultivierung zwar an, erreicht das Maximum jedoch erst nach etwa 1,5 Tagen. Hingegen ist BV^* bei Stamm EAD gleich zu Beginn am höchsten und fällt dann bis Tag 3 ab. Damit kann für Stamm EAD das maximale BV^* noch während des LSVs, also der initialen Polarisierungsphase der Kathode erreicht werden. Auch ein weiteres Ansteigen von BV^* beider Stämme am Ende der Kultivierung (ab Tag 8) ist zu beobachten. Zudem unterscheidet sich der Wert des maximalen BV^* , von nun an als BV_{max}^* bezeichnet, zwischen den beiden Stämmen (Abb. 12B). Diese

betragen für Stamm EAD ca. 28, 55 und 97 $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ für die jeweiligen Messstellen A, B und C. Dies bedeutet eine 3,3-, 4,0- und 4,1-fache Steigerung von BV_{max}^* im Vergleich zum Wildtyp. Die maximale mittlere Biofilm Akkumulationsrate \overline{BV}_{max}^* von Stamm EAD betrug 59 $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$, eine ca. 4-fache Steigerung gegenüber des Wildtyps (Abb. 12B).

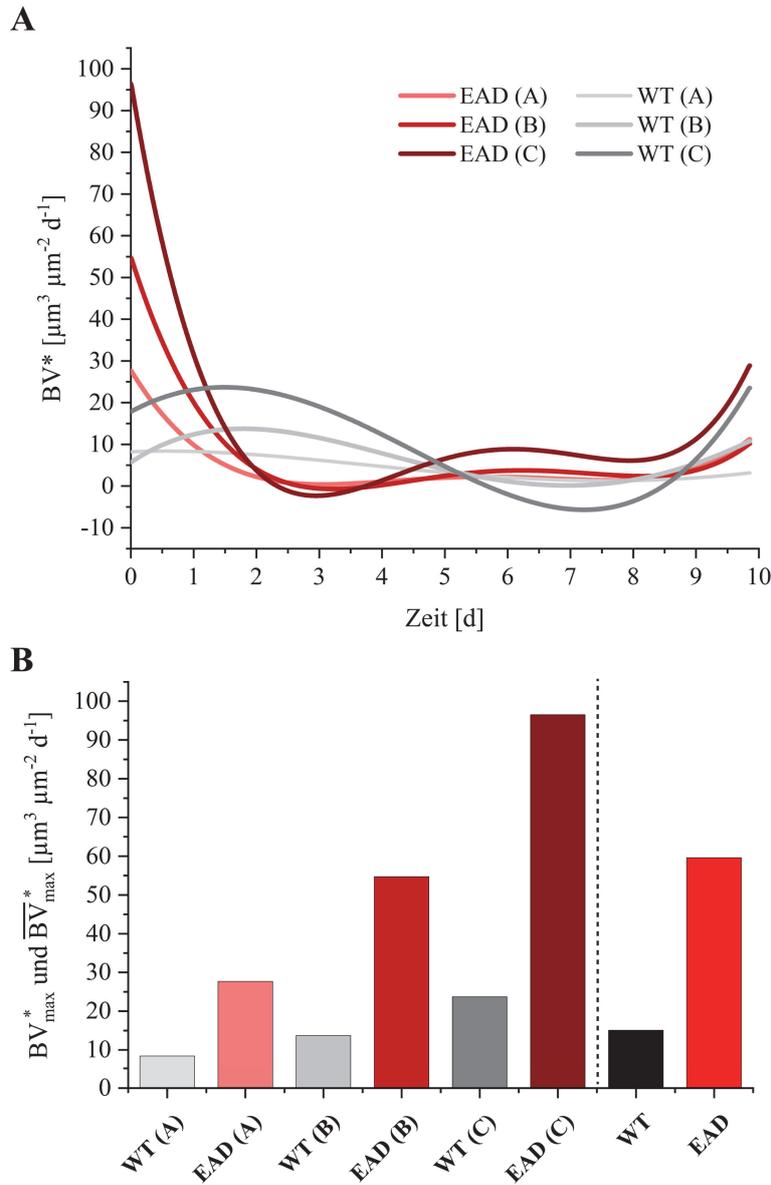


Abb. 12: Verlauf der ermittelten Biofilm Akkumulationsrate BV^* (A) und die maximalen Biofilm Akkumulationsraten BV_{max}^* bzw. \overline{BV}_{max}^* (B) von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. BV^* wurde mithilfe der 1. Ableitung der BV -Polynome ermittelt. BV_{max}^* bzw. \overline{BV}_{max}^* sind für die einzelnen Messstellen ABC, sowie für die gemittelten Biovolumen-Werte abgebildet.

3.1.1.2. Makroskopische Analysen des kathodischen Biofilms

Um die makroskopische Struktur des kathodischen Biofilms von *K. spormannii* zu visualisieren und diese zwischen den beiden Stämmen zu vergleichen, wurden Höhenprofile des Biofilms ausgehend von den OCT-Aufnahmen erstellt (Bauer *et al.*, 2019; Hackbarth *et al.*, 2020). Diese machen es möglich, die Veränderung der Biofilmdicke (engl.: *biofilm thickness*), sowie seiner Struktur im Verlauf des Experiments zu verfolgen. In Abb. 13 ist eine Auswahl der Höhenprofile der Messstellen A, B und C für beide Stämme an verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt. Zu Beginn des Experiments (Tag 0) befanden sich lediglich kleinere Partikel auf den Kathodenoberflächen. Im zeitlichen Verlauf des Experiments ist die Akkumulation von Biofilm für beide Stämme an den immer heller werdenden Bereichen der Höhenprofile zu erkennen.

Zur besseren Aufklärung der strukturellen Eigenschaften, sollte die Morphologie in Form des Parameters der sogenannten Oberflächen-Rauheit (engl.: *surface roughness*) miteinbezogen werden. Diese setzt die durchschnittliche Höhe des Biofilms innerhalb der beobachteten Fläche, in Bezug zur Standardabweichung der jeweiligen Höhe in jedem Punkt bzw. Pixel. Der so erhaltene Quotient dieser beiden Werte wird auch (Oberflächen-)Rauheits-Koeffizient R_a^* genannt (Wagner und Horn, 2017). Hier wird im speziellen auf den Durchschnittswert des Rauheits-Koeffizienten über die drei beobachteten Messstellen \bar{R}_a^* eingegangen. Generell kann eine stetige Abnahme der Rauheit beider Biofilme im zeitlichen Verlauf des Wachstums gezeigt werden (siehe Abb. 14; Verlauf von R_a^* der einzelnen Messstellen im Anhang, Abb. 50). Die umgekehrte Interpretation dieser Tatsache ist, dass die Biofilmoberflächen in diesem Zeitraum immer gleichmäßiger werden. Das höchste \bar{R}_a^* konnte zu Beginn des Experiments (Tag 0) gemessen werden. Ab diesem Zeitpunkt sinkt die Rauheit immer weiter, die Biofilme wuchsen also hin zu immer gleichmäßigeren Strukturen. Die Unterschiede zwischen den Biofilmen beider Stämme sind besonders gut zwischen Tag 1 und 3 zu erkennen. Während \bar{R}_a^* bei Stamm EAD etwa einen Wert von 0,5 annimmt, fällt dieser für den WT von etwa 1,5 auf 0,8. Dieser Abfall korreliert zeitlich mit den höchsten Biofilm Akkumulationsraten und dem Anstieg von *BV*. Im weiteren Verlauf nähern sich die Biofilme zwar in ihren Rauheiten an, der Biofilm von Stamm EAD bleibt jedoch bis zum Ende des Experiments gleichmäßiger.

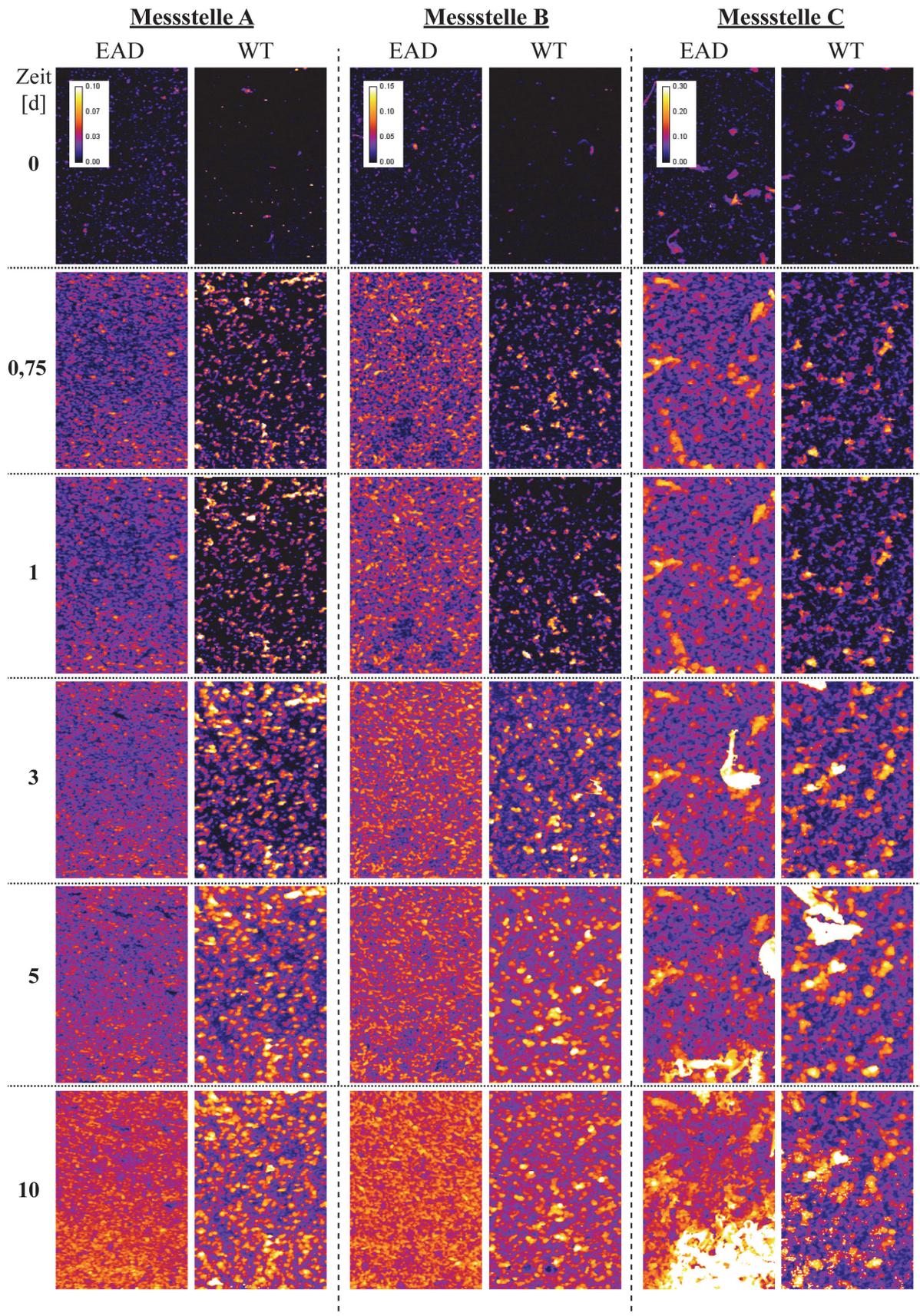


Abb. 13: Verlauf der Höhenprofile des Biofilms von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzell-Kultivierung. Gezeigt sind die Höhenprofile der Tage 0, 0,75, 1, 3, 5 und 10 für die jeweiligen Messstellen A, B, und C. Zu beachten sind die variierenden Legenden für die unterschiedlichen Messstellen, die in mm angegeben sind.

Der Verlauf von R_a^* für beide Stämme zeigt sich auch visuell in den Höhenprofilen. Der Wildtyp-Biofilm formt auf seiner Oberfläche unverkennbare „Turm“-artige Strukturen. Die Zwischenräume zwischen diesen Strukturen werden zwar im Laufe der Kultivierung geschlossen (Abnahme von R_a^*), bleiben jedoch in Teilen bis zum Schluss erhalten.

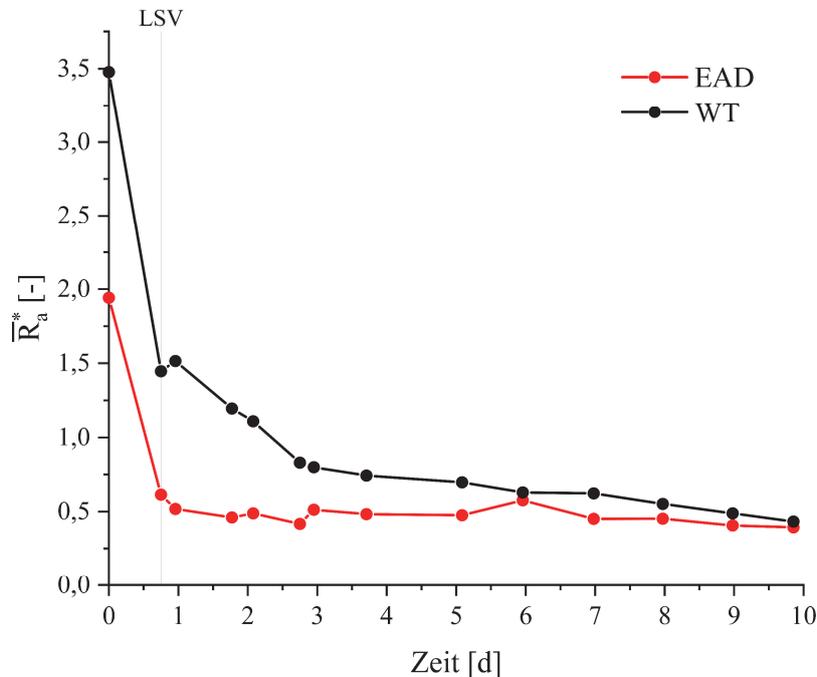
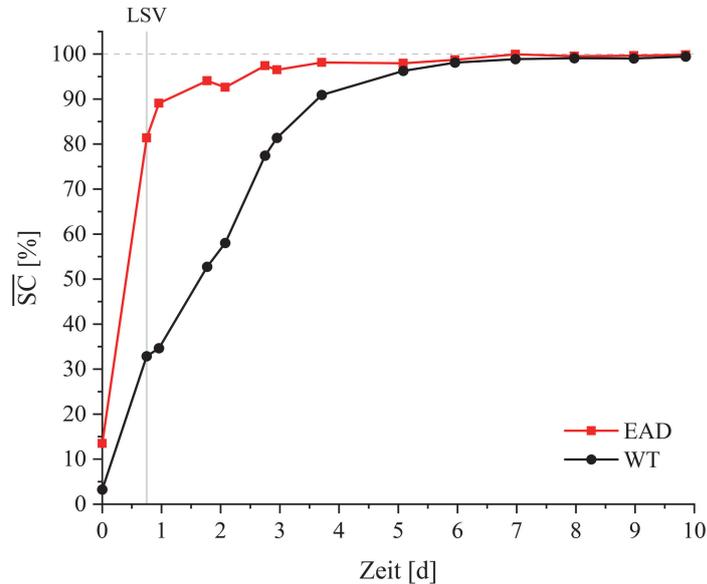


Abb. 14: Verlauf des Oberflächen-Rauheits-Koeffizient R_a^* des Biofilms von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. Die jeweiligen Werte der einzelnen Messstellen (ABC) wurden anhand der Auswertung der Höhenprofile ermittelt. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.

Ein weiterer Parameter der Biofilme, welcher in den Höhenprofilen zu erahnen ist und welcher auch im Zusammenhang mit dem Verlauf des Biovolumens steht, ist der Bedeckungsgrad der Kathodenoberfläche, die Substratbedeckung SC (engl.: *substratum coverage*) (Hackbarth *et al.*, 2020). In Abb. 15A ist die mittlere Substratbedeckung \overline{SC} der drei Messstellen beider Biofilme über der Zeit dargestellt (Graph jeder einzelne Messstelle befindet sich im Anhang, Abb. 50). Es ist für \overline{SC} deutlich zu erkennen, dass der Zeitpunkt, an dem der Biofilm des Wildtyps die Kathode vollständig bedeckt hat, später erreicht wird, als für Stamm EAD. So hat Stamm EAD bis zum Ende des LSVs die Kathode zu 80 % bedeckt. Der Zeitpunkt an dem die Kathode zu über 95 % bedeckt war (hier SC_{95} bzw. \overline{SC}_{95} genannt), erreichte Stamm EAD nach ca. 2,8 Tagen und hat diesen Punkt damit ungefähr doppelt so schnell erreicht wie der Wildtyp (Abb. 15B). Für die einzelnen Messstellen kann dieses Phänomen ebenfalls beobachtet werden: Der SC_{95} -Wert ist bei Stamm EAD an den einzelnen Messstellen ca. 2-3 mal früher erreicht als beim Wildtyp (Abb. 15B). Dabei ist auch zu beobachten, dass für beide Biofilme die Bedeckung der

Kathode im vorderen Bereich der Kathode länger dauert als im hinteren Bereich. Vergleicht man Abb. 15A mit dem Verlauf von \overline{BV} (Abb. 11B), fällt die starke Korrelation der beiden Kurven besonders in den ersten fünf Kultivierungstagen auf. Speziell in der initialen Bedeckungsphase des Biofilms scheint BV^* einen Maximalwert zu erreichen.

A



B

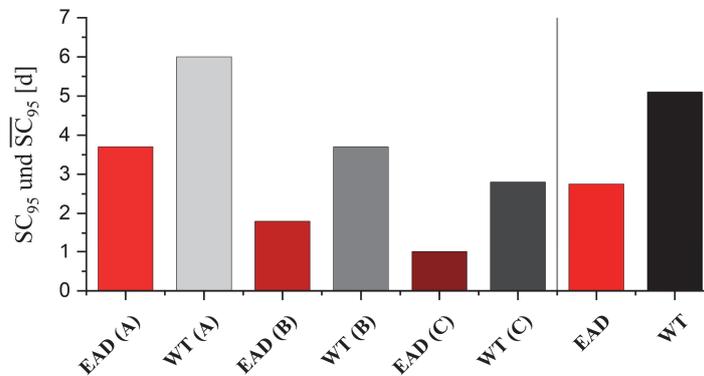


Abb. 15: Verlauf der mittleren Substratbedeckung \overline{SC} (A) und SC_{95} bzw. \overline{SC}_{95} (B) von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung. Die jeweiligen Werte der einzelnen Messstellen (ABC) wurden anhand der Auswertung der Höhenprofile ermittelt. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.

3.1.1.3. Elektrochemische Eigenschaften

Neben der Evaluation des kathodischen Biofilms in den Fließzellen wurden zusätzliche elektrochemische Daten in Form der Stromdichten aufgezeichnet. Mithilfe der Stromdichten können passive (kapazitive), aber auch aktive (faradaysche) Interaktionen des Biofilms mit der Kathode beschrieben werden. Es ist dabei zu beachten, dass die aufgenommenen Stromdichten, den Elektronenfluss der kompletten Kathode beschreiben und somit nicht einzelnen Stellen auf

der Kathode zugeordnet werden können. Die Stromdichte I_D wurde während der gesamten Kultivierungsdauer, also während des LSVs und der anschließenden Chronoamperometrie (CA), aufgezeichnet. Die Potentiale in diesen Phasen betragen 0 bis -500 mV vs. SHE (LSV, initiale 18 h) bzw. -500 mV vs. SHE während des folgenden CAs. Mit sinkendem Potential konnte während des LSVs für beide Systeme ein Anstieg von I_D festgestellt werden (Abb. 16). Bis zum Ende des LSVs wurde beim Wildtyp ein maximales I_D von ca. $24 \mu\text{A cm}^{-2}$ bzw. $17,5 \mu\text{A cm}^{-2}$ bei Stamm EAD gemessen. Mit dem Start des CAs fielen diese Werte innerhalb der darauffolgenden 6 h um ca. 40 % ab. Zwischen Tag 1 und 2,5-3 ist der größte Unterschied im Verlauf vom I_D beider Systeme zu beobachten. Während beim WT eine Steigerung bis auf eine maximale Stromdichte von ca. $27 \mu\text{A cm}^{-2}$ zu verzeichnen ist, fällt I_D bei Stamm EAD weiter bis auf ca. $9 \mu\text{A cm}^{-2}$ ab. Im System des Wildtyps ist außerdem nach seinem Maximum ein Absinken von I_D bis Tag 4 auf ca. $17 \mu\text{A cm}^{-2}$ bemerkbar. Im späteren Verlauf des Experiments steigen die Stromdichten beider Systeme zwischen Tag 4 und 10 erneut um ca. 26 % auf ca. $22 \mu\text{A cm}^{-2}$ (WT) bzw. $11,7 \mu\text{A cm}^{-2}$ (EAD) an. Die mittleren Stromdichten über den gesamten Zeitraum des Experiments betragen bei Stamm EAD $10,8 \mu\text{A cm}^{-2}$. Im Wildtyp-System war die mittlere Stromdichte mit $20,3 \mu\text{A cm}^{-2}$ etwa doppelt so hoch.

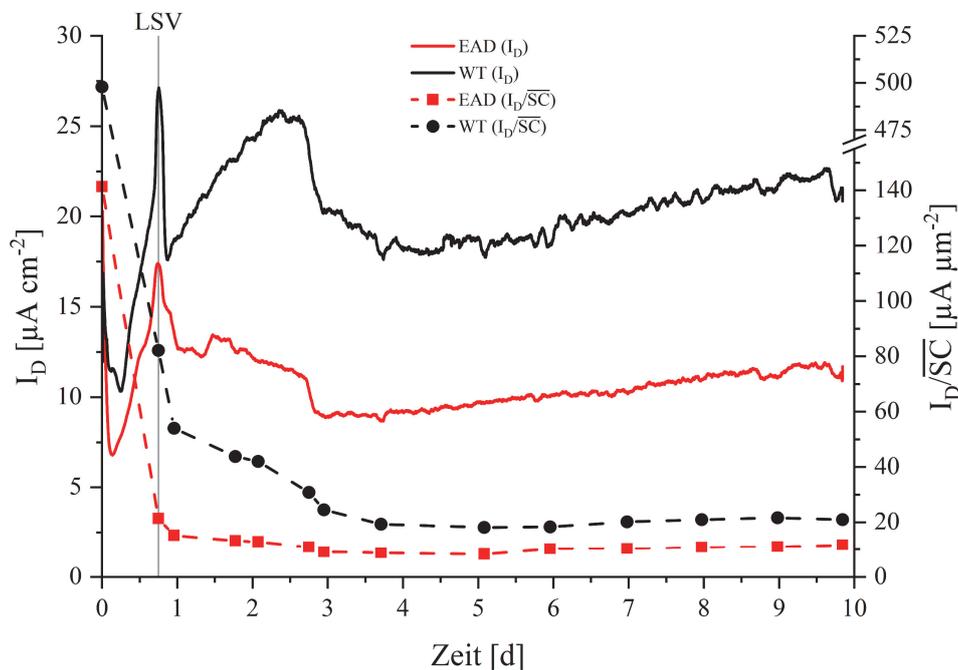


Abb. 16: Verlauf der Stromdichte I_D und I_D/\overline{SC} der Fließzellensysteme von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Kultivierung. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist ebenfalls angegeben.

Ein weiterer Parameter durch welchen die elektrochemische Interaktion von Mikroorganismen mit einer Kathode beschrieben werden kann ist die relative Stromdichte I_D zur Fläche, die von Biofilm bedeckt ist. Pons und Kollegen beschreiben dieses $I_{D,mikrobiell}$ als die „intrinsische mikrobielle Stromdichte“ (Pons *et al.*, 2011). Da die Stromdichte in diesem Experiment auf die gesamte Kathodenfläche bezogen ist, wurde für die Berechnung von $I_{D,mikrobiell}$, die mittlere Substratbedeckung \overline{SC} verwendet und wird hier als I_D/\overline{SC} bezeichnet. In Abb. 16 ist zu erkennen, dass diese während des LSVs und mit steigendem Bedeckungsgrad der Kathode stark abnimmt und beinahe gänzlich umgekehrt proportional zum Bedeckungsgrad verläuft (Abb. 15). Zudem gleicht sie dem Verlauf der Graphen des Rauheits-Koeffizienten (Abb. 14). Da Stamm EAD die Kathode schon nach einem Tag fast vollständig bedeckt hat ($\overline{SC} > 90\%$), nähert sich I_D/\overline{SC} ab diesem Zeitpunkt den Werten von I_D an. Beim Wildtyp hingegen flacht die Kurve langsamer ab, bis auch ab Tag 5 eine komplette Kathodenbedeckung erreicht ist.

3.1.1.4. Mikroskopische Analysen

Um einen genaueren Einblick in die Zusammensetzung des Biofilms und die Aktivität der Zellen zu bekommen, wurden zusätzliche fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Biofilms angefertigt. Da in den Aufnahmen kein morphologischer Unterschied zwischen dem Wildtyp und Stamm EAD zu erkennen war, sind nachfolgend nur Aufnahmen von Stamm EAD aufgeführt. Die Mikroskopie dieser Biofilmproben erfolgte nach Beendigung des Versuchs. Als Proben für diese Untersuchungen dienten zum einen entnommene Biofilm-Flocken aber auch die Graphitkathode selbst. Die Aufnahmen mit dem 10x Objektiv zeigten große, mit Nilrot gefärbte Zell-, bzw. Biofilmaggregate, die nach der Entnahme der Kathode noch immer als dichte Strukturen auf deren Oberfläche zu erkennen waren (Abb. 17A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die mit Nilrot färbbaren Strukturen des Biofilms auch mit DAPI gefärbt werden konnten (Abb. 17B). Da DAPI ein speziell in DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um Zellen innerhalb des Biofilms handelt.

Durch die Verwendung des 63x Objektivs konnten neben Teilen größerer Aggregate, auch Einzelzellen auf der Kathodenoberfläche identifiziert werden (Abb. 18A). In diesen Zellen konnten intrazelluläre PHB-Granula ausgemacht werden. Einige der Zellen scheinen außerdem endständige Sporen zu tragen. Die Live/Dead-Färbung der Kathodenoberfläche zeigte eine Mischung aus toten (roten) und lebendigen (grünen) Zellen innerhalb der großen Flocken, die

sich noch auf der Kathode befanden (Abb. 18B). Einzelne distinkte lebendige und tote Zellen konnten außerdem in den weniger dicht besiedelten Bereichen erkannt werden.

Da es nicht möglich war die Kathodenoberfläche mit dem 100x Objektiv zu untersuchen (aufgrund der fehlenden Möglichkeit einer Ölimmersion), wurden hier Bilder von entnommenen Biofilm-Flocken erstellt. Aufnahmen mit Nilrot und DAPI zeigten sowohl rot und blau gefärbte Einzelzellen, jedoch zusätzlich einen blauen „Schleier“ über Teilen dieser Flocken (Abb. 19A und B). Die Live/Dead-Färbung zeigte auch hier Bereiche in denen lebendige, aber auch tote Zellen vorzufinden waren (Abb. 19C und D).

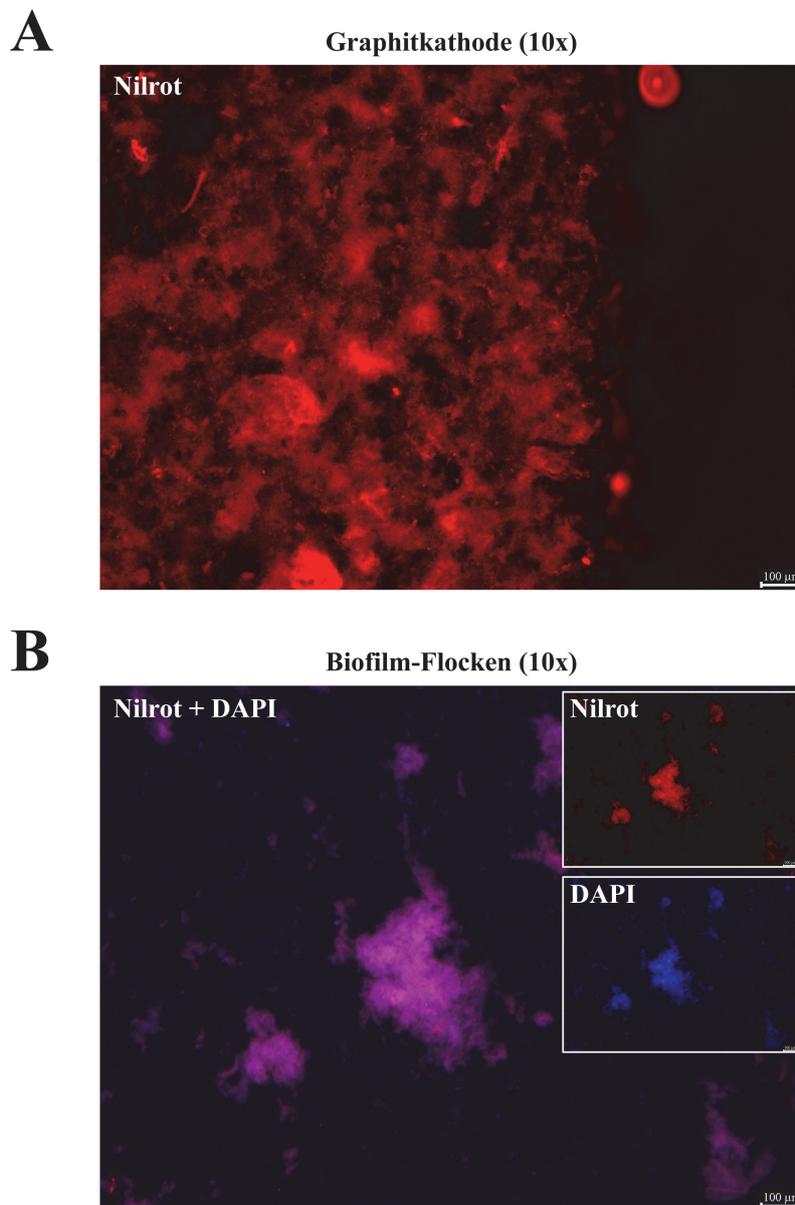
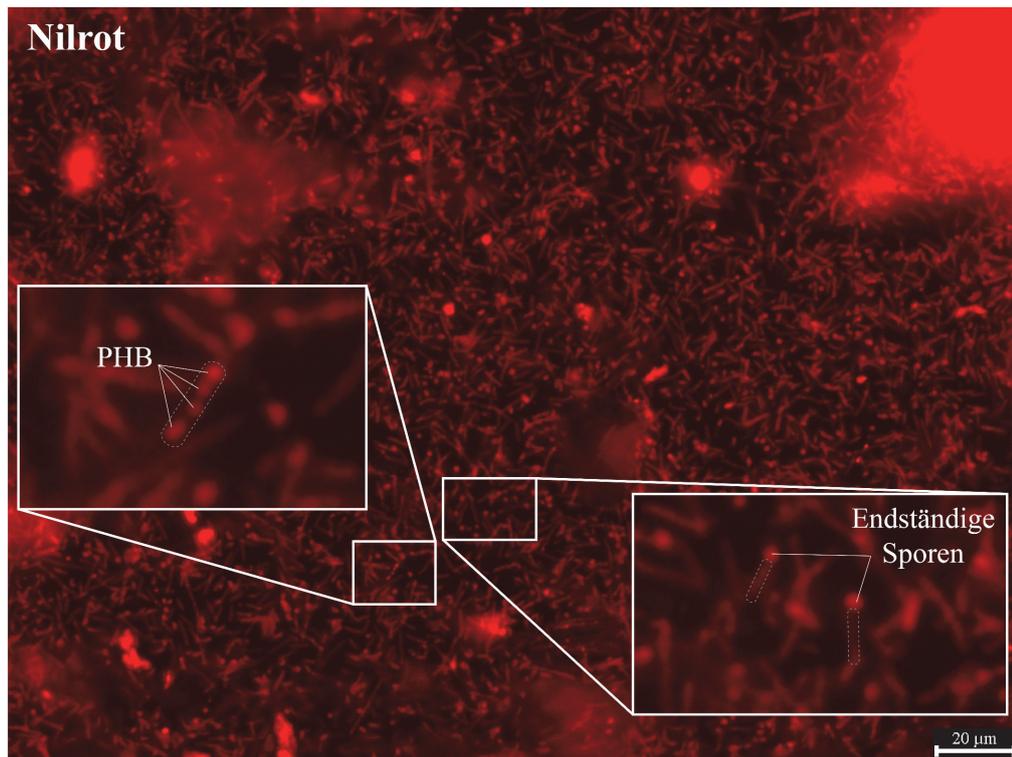


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Graphitkathode (A) und von Biofilm-Flocken (B) des Biofilms nach 10 Tagen (10x-Objektiv). A. Nilrot-Färbung der Kathode. B. Nilrot- und DAPI-Färbung von entnommenen Biofilm-Flocken. Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle sind klein, deren Überlagerung groß dargestellt.

A

Graphitkathode (63x)



B

Graphitkathode (63x)

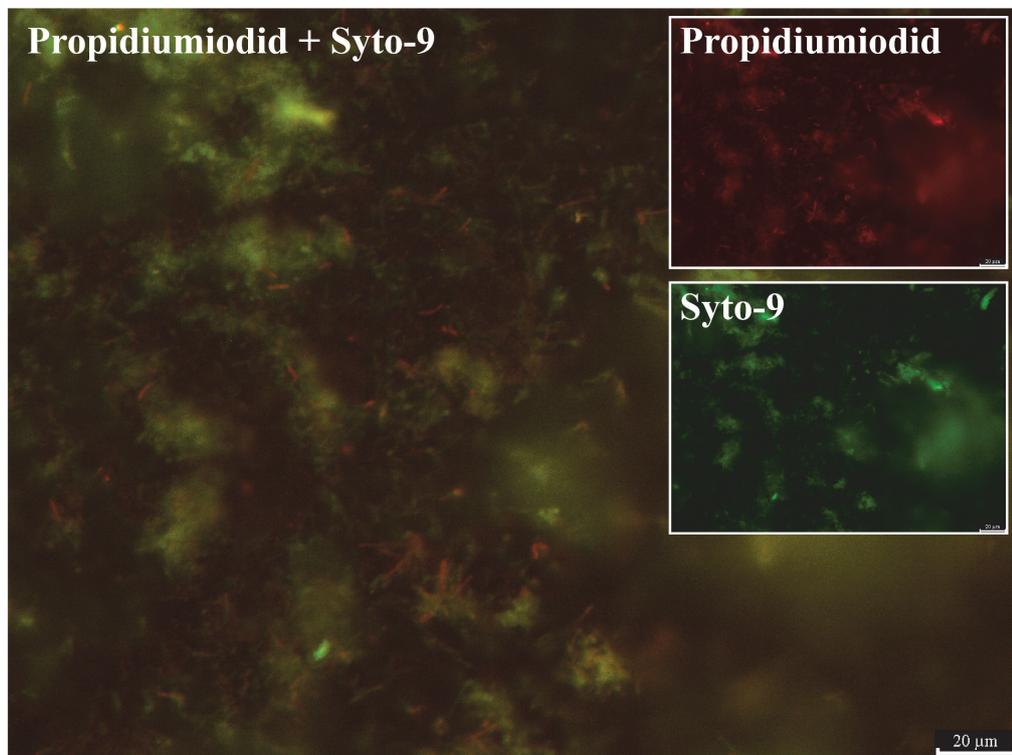


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Graphitkathode mit Biofilms nach 10 Tagen (63x-Objektiv). A. Nilrot-Färbung der Kathode. B. Live/Dead-Färbung der Kathode. Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle sind klein, deren Überlagerung groß dargestellt.

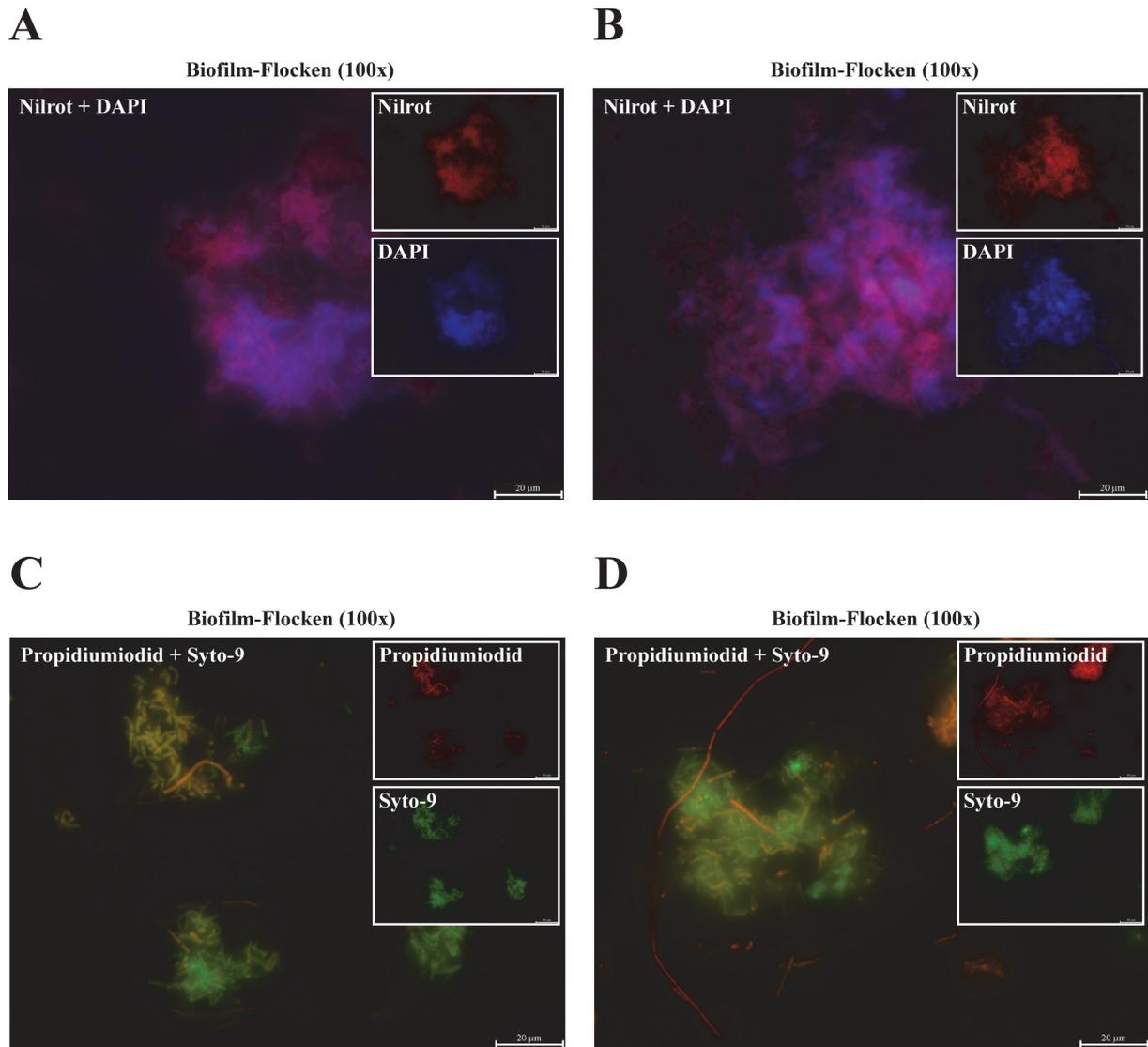


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von entnommenen Biofilm-Flocken nach 10 Tagen (100x-Objektiv). **A.** Nilrot- und DAPI-Färbung von entnommenen Biofilm-Flocken. **B.** Live/Dead-Färbung von entnommenen Biofilm-Flocken. Die Einzelbilder der jeweiligen Kanäle sind klein, deren Überlagerung groß dargestellt.

3.1.2. Heterotrophes und hydrogenotrophes Wachstum

Um zu überprüfen, ob das Adaptionsexperiment zu einem verbesserten allgemeinen Wachstum von *Kyrpidia spormannii* geführt hat, wurden Wachstumskurven unter heterotrophen, wie auch unter hydrogenotrophen Bedingungen von Stamm EAD und dem Wildtyp angefertigt. Dafür wurde für die heterotrophe Kultivierung RR2A-Medium (Tab. 6) und für die hydrogenotrophe Kultivierung ES-Medium (Tab. 7) mit H₂ als Elektronen- und Energiequelle, sowie CO₂ als Kohlenstoffquelle verwendet. Es ließ sich feststellen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wachstum der beiden Stämme unter den jeweils getesteten Wachstumsbedingungen bestand (Abb. 20 und Abb. 21).

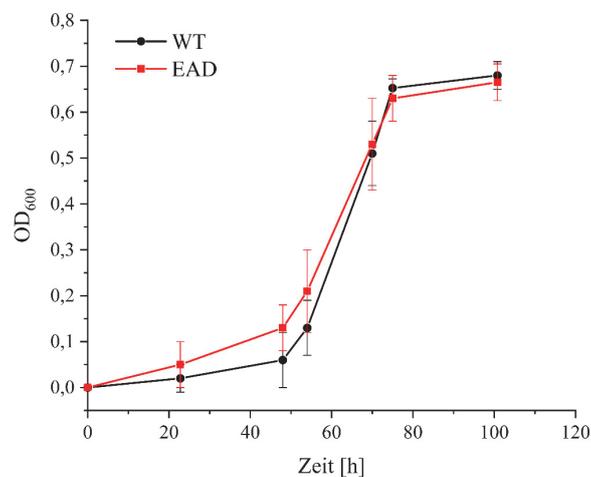


Abb. 20: Wachstumskurve des heterotrophen Wachstums von *K. spormannii* Stamm EAD und dem Wildtyp (WT). Die Kultivierung erfolgte dabei im Triplikat.

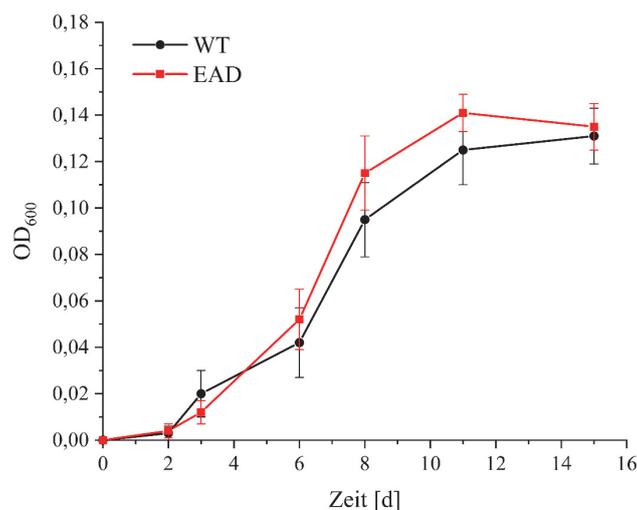


Abb. 21: Wachstumskurve des hydrogenotrophen Wachstums von *K. spormannii* Stamm EAD und dem Wildtyp (WT). H₂ diente hierbei als Elektronen- und Energiequelle, CO₂ war die einzige Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung erfolgte dabei im Triplikat.

3.2. Variationsanalyse von *Kyrpidia spormannii* Stamm EAD

Die Vergleichskultivierung unter elektroautotrophen Bedingungen zeigte ein verbessertes kathodisches Biofilmwachstum des adaptierten Stamms EAD, speziell in Bezug auf die Wachstumsraten, die Substratbedeckung und die Gleichmäßigkeit des gewachsenen Biofilms. Da solche phänotypischen Veränderungen in Adaptionsexperimenten oft durch erworbene genetische Mutationen hervorgerufen werden, sollte die Frage der genotypischen Varianten des adaptierten Stamms EAD, die sich im Vergleich zum Wildtyp gebildet hatten, adressiert werden. Hierzu wurde die genomische DNA von Stamm EAD isoliert, per Illumina-Sequenzierung sequenziert und mit dem Genom des Wildtyps verglichen. Die verwendete Illumina-Sequenzierung ist Teil der NGS-Methoden (*next generation sequencing*) und wurde gewählt, da sie eine besonders niedrige Fehlerrate aufweist. Diese geringe Fehlerrate ist für eine verlässliche Variationsanalyse, mit möglichst wenigen falsch-positiven Ergebnissen, essentiell.

3.2.1. Allgemeine Sequenzierungs- und Variationsauswertung

Die Illumina-Sequenzierung wurde bei IMGGM Laboratories GmbH (Martinsried, DE) auf einem MiSeq PE150 Gerät durchgeführt. Insgesamt lieferte die Sequenzierung 38.354.462 *reads* mit einer Durchschnittslänge von 140 bp. Diese wurden prozessiert und anschließend einem *mapping* (engl. für Abgleichen) unterzogen. Als Referenz hierfür diente das Wildtyp-Genom von *Kyrpidia spormannii* EA-1 (GenBank Sequenz CP024955.1) (Reiner, Lapp, *et al.*, 2018). Insgesamt konnten dem Referenzgenom 38.058.785 *reads* zugeordnet werden, welches einer Basenabdeckung von 1469 (± 290) entspricht. Einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein von Mutationen in den zugeordneten *reads* stellte die hohe Anzahl unpassender Basenpaarungen (engl.: *non-perfect matches*) dar: in 43 % aller zugeordneten Reads konnte mindestens eine Basenpaaränderung (engl.: *mismatch*) detektiert werden.

Anschließend wurde eine Variantenerkennung durchgeführt. Diese erstellt auf Basis der falsch-zugeordneten Basen des *mappings* eine Liste, welche die Basenvarianten im Vergleich zur Referenzsequenz aufführt. Für die Variantenerkennung wurde das *Low Frequency Variant Detection* Plugin der CLC Genomics Workbench verwendet, mit einem Schwellenwert (engl.: *threshold*) der minimalen Häufigkeit (engl.: *frequency*) einer Basenänderung von 10 %. Die Häufigkeit gibt dabei den Anteil an, mit der eine bestimmte Basenvariation (engl.: *count*) innerhalb des abgedeckten Bereichs (engl.: *coverage*) vorkommt. Diese Basenvariationen können in fünf verschiedene Typen unterteilt werden: Bei (I) SNVs (*single nucleotide variant*) wird eine Base durch eine andere ersetzt (oft auch als SNP (*single nucleotide polymorphism*))

bezeichnet). (II) MNVs (*multiple nucleotide variant*) zeichnen sich hingegen durch den Austausch von zwei oder mehr Basen aus. Weiterhin gibt es (III) Insertionen und (IV) Deletionen, bei denen im Vergleich zur Referenz, eine oder mehrere Basen eingefügt bzw. entfernt wurden. Eine (V) Ersetzung (*engl.: replacement*) bezeichnet einen komplexeren Sachverhalt. Oft sind solche Variationen eine Mischung der vier oben genannten Typen. Sie umfassen dabei also meist mindestens eine Nukleotid-Variation in Kombination mit dem Einfügen oder Entfernen einer weiteren Base. Der Begriff der Variation ist in diesem Zusammenhang nicht gleichzusetzen mit dem der Mutation. Mutationen beschreiben die Veränderung einer DNA Sequenz in einem Organismus, welche auf natürliche Weise oder durch äußere Einflüsse wie schädigende Strahlung hervorgerufen werden kann. Variationen beschreiben hingegen die Veränderungen bzw. Variationen in der DNA Sequenz in Bezug auf die gesamte Population. Die Veränderungen können einerseits durch Mutationen hervorgerufen werden, andererseits jedoch auch durch andere Umwelteinflüsse oder genetische Vorgänge wie die Rekombinationen oder genetischen Drift.

Im Zuge der Variantenerkennungen konnten insgesamt 839 Variationen bzw. potentielle Mutationsereignisse detektiert werden, die mit einer Häufigkeit von über 10 % in der sequenzierten Population vorkommen (Abb. 22). Etwa die Hälfte davon konnten in kodierenden Sequenzen (*engl.: coding sequences*, CDS) verortet werden. Hiervon hatten ein Großteil der Variatioben die Änderung einer Aminosäure zur Folge (sogenannte laute Mutationen) (Abb. 22). Eine große Anzahl dieser lauten Mutationen entfallen dabei auf SNVs (60 %). MNVs, Deletionen und Insertionen machen zusammen weitere 39 % aus, wohingegen Ersetzungen nur zu einem kleinen Teil vorkommen.

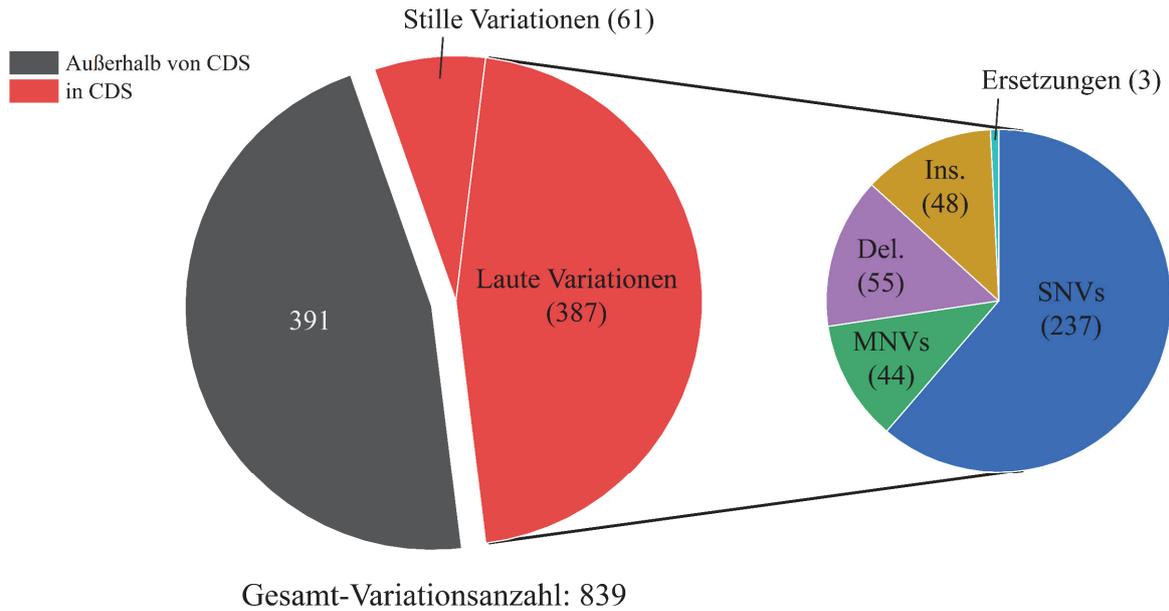


Abb. 22: Aufteilung der ermittelten Variationen, die mit einer Häufigkeit von über 10 % in der Population von Stamm EAD aufgetreten sind. SNVs – *single nucleotide variations*; MNVs – *multiple nucleotide variations*; Del. – Deletionen; Ins. – Insertionen.

Innerhalb der auftretenden SNVs konnte beobachtet werden, dass bestimmte Basenänderungen gehäuft auftraten (Abb. 23). Besonders die Transversionen A zu T bzw. T zu A und G zu C und C zu G, aber auch die Transitionen A zu G und C zu T hatten einen größeren Anteil an der Gesamtheit der beobachteten Basenänderungen.

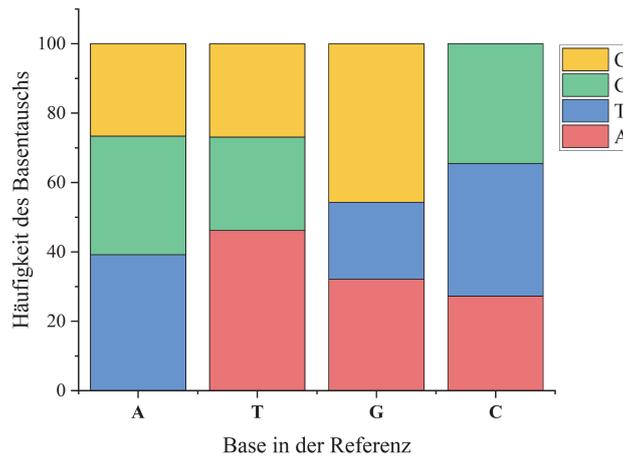


Abb. 23: Häufigkeit mit der eine bestimmte Base der Referenz-Sequenz durch eine andere Base in den ermittelten Varianten mit einer Häufigkeit von über 10 % ersetzt wurde.

Der folgende Teil der Arbeit soll den Fokus auf zwei verschiedene Phänomene der Varianten in Stamm EAD setzen. Ein Fokus soll auf der Analyse der Varianten liegen, die mit einer besonders hohen Häufigkeit in der sequenzierten genomischen Information von Stamm EAD zu finden waren. Im Weiteren soll zudem auf CDS mit einer besonders hohen Mutationsrate, also mit einer auffallend hohen Variationsanzahl in einer CDS, eingegangen werden.

3.2.2. Analyse der Varianten mit großer Häufigkeit

Betrachtet man Variationen mit größeren Häufigkeiten als 10 %, kann mit steigender Häufigkeit ein Abfall der absoluten Variantenanzahl festgestellt werden (Abb. 24A). Von den 839 Variationen, die mit einer Häufigkeit von über 10 % detektiert wurden, sind es noch elf Variationen mit einer Häufigkeit von über 33 %, und fünf mit über 90 %. Die folgende Analyse der Variationen soll sich nun mit den elf Variationen beschäftigen, die mit einer Häufigkeit von über 33 % auftraten. Dazu gehören insgesamt sechs laute Mutationen (vier SNVs, zwei Deletionen), drei stille Mutationen und zwei Mutationen außerhalb einer CDS (Abb. 24B). In Tab. 28 ist ein genauerer Überblick über das Ergebnis der Variantendetektion dieser Varianten dargestellt.

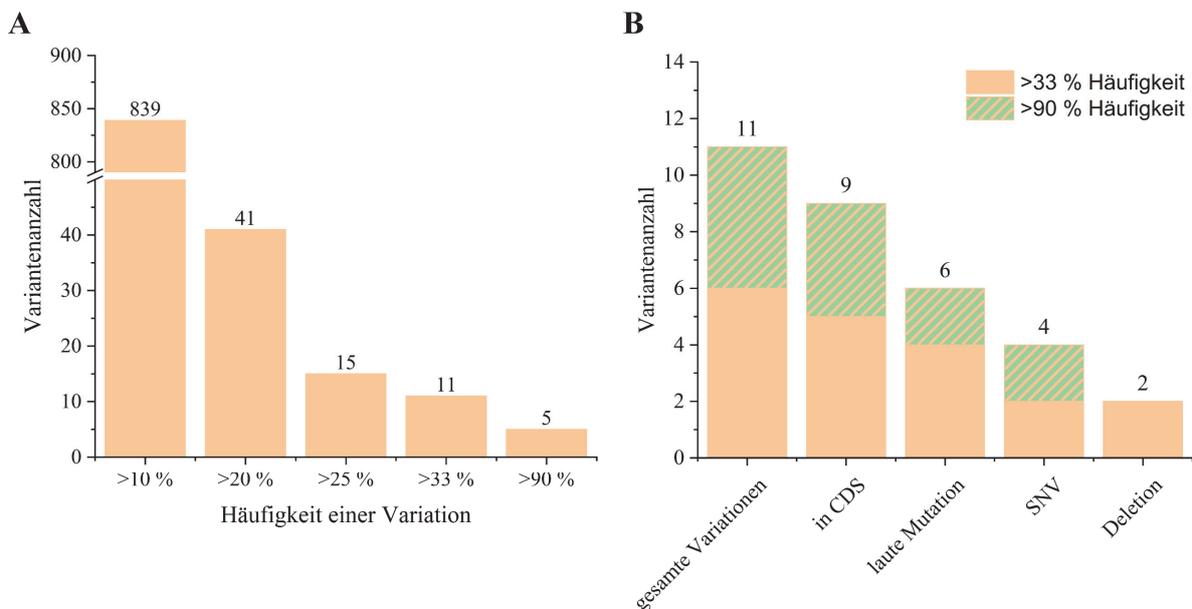


Abb. 24: A: Die absolute Variantenanzahl, die mit einer steigenden Häufigkeit auftreten. B: Eine genauere Unterteilung der Variationen die mit einer Häufigkeit von über 33% auftreten.

Tab. 28: Ergebnisse der Variantendetektion der Variationen mit einer Häufigkeit von über 33 %. Die Nummerierung der Nukleotide (Nt-Nr.) und die Annotationen beziehen sich auf das sequenzierte und annotierte Genom von *K. spormannii* (GenBank: CP024955.1). CR – coding region (engl. für kodierende Region); AS – Aminosäure.

Nt-Nr.	Typ	Variation	Häufigkeit [%]	Annotation	CR-Änderung	AS-Änderung
71257	SNV	G → T	55,25	<i>mfd</i>	2708G>T	G903V
1084169	Del.	G → -	44,02	<i>acs2</i>	1272Del	T425fs
1352442	SNV	G → T	99,75	<i>CVV65_06825</i>	410G>T	C137F
1476258	Del.	A → -	34,88	<i>CVV65_07525</i>	72Del	V25fs
1515328	Ins.	- → GG	90,82	-	-	-
1563731	SNV	C → T	38,81	-	-	-
1859765	SNV	T → G	36,81	<i>CVV65_09460</i>	528T>G	-
2495265	SNV	A → C	99,78	<i>CVV65_12480</i>	932T>G	V311G
2838678	SNV	T → C	99,42	<i>CVV65_14005</i>	822A>G	-
3241436	SNV	A → T	37,06	<i>murA2</i>	698T>A	I233N
3335370	SNV	G → T	99,75	<i>CVV65_16360</i>	1425G>T	-

3.2.2.1. Mutation in *mfd* (55,25 %)

Die Basenänderung 2708G>T in der kodierenden Sequenz von *mfd* (*CVV_00395*) führt in 55,25 % der Population zu der Aminosäuren-Änderung G903V. Dieses Gen ist im Genom von *K. spormannii* als *mfd* (*transcription-repair coupling factor*) annotiert. Blast-Analysen und die Analyse konservierter Proteindomänen in dessen Genprodukt konnten dabei bestätigen, dass es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um das Protein Mfd handelt (Tab. 29 und Tab. 30).

Tab. 29: Ergebnis der Blast-Analyse von *mfd* (*CVV_00395*). Es sind die ersten beiden signifikanten Treffer gezeigt.

Annotation	Nächste Verwandte	e-Wert	Identität [%]
<i>transcription-repair coupling factor</i>	<i>Kyrpidia tusciae</i>	0	96,74
	<i>Effusibacillus pohliae</i>	0	62,30

Tab. 30: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in *mfd* (*CVV_00395*). Es sind die ersten beiden Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer gezeigt.

Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
Mfd (COG1197)	<i>transcription-repair coupling factor</i> (<i>superfamily II helicase</i>)	0
Mfd (TIGR00580)	<i>transcription-repair coupling factor</i> (<i>mfd</i>)	0

Das Protein Mfd (*mutation frequency decline*) spielt in der Zelle als Teil der DNA-Reparaturmechanismen während der Transkription eine wichtige Rolle. Die Funktion von Mfd besteht darin, die RNA-Polymerase (RNAP) während der Transkription von der DNA zu dissoziieren, falls die RNAP nicht mehr in der Lage ist die RNA weiter zu elongieren (Roberts und Park, 2004). Dies geschieht insbesondere dann, wenn sich nicht-kodierende DNA-Läsionen (wie Pyrimidin-Dimere) in der kodierenden Sequenz gebildet haben. Solche DNA-Läsionen können unter anderem durch UV-Licht oder oxidativen Stress entstehen. Infolgedessen rekrutiert Mfd den DNA-Reparaturkomplex UvrABC, welcher die DNA-Läsion durch die Nukleotidexzisions-Reparatur auflöst und die DNA-Sequenz wieder in seiner originalen Form herstellt (Roberts und Park, 2004). Das Mfd-Protein ist in *E. coli* in mehrere funktionelle und strukturelle Domänen unterteilt: Eine UvrA-Interaktions-Domäne, eine RNA-Polymerase-Interaktions-domäne (RID) und eine Domäne mit Helikase-Motiv. In *E. coli* konnte dabei festgestellt werden, dass die C-Terminus-Region des Helikase-Motivs essentiell für die Translokation der RNAP und damit für die Funktion von Mfd ist (Selby und Sancar, 1995). Die in Stamm EAD auftretende Mutation konnte in eben jenem C-Terminus des Helikase-Motivs lokalisiert werden.

3.2.2.2. Mutation in *acs2* (44,02 %)

In der kodierenden Sequenz des Gens *acs2* (*CVV_05350*) trat die Variation 1272Del und damit ein *frameshift* (fs) im nächsten Basentriplett (T425fs) in 44,02 % der Population auf. Diese Deletion führt dazu, dass im korrespondierenden Genprodukt nach Aminosäure (AS) 435 ein Stoppcodon entsteht und damit das letzte Drittel des Proteins Acs2 fehlt (Gesamt: 635 AS). Um eine potentielle Funktion von Acs2 zu bestimmen und damit die Auswirkungen des *frameshifts* auf den Metabolismus von Stamm EAD abschätzen zu können, wurde eine Blast- und Proteindomänen-Analyse durchgeführt (Tab. 31 und Tab. 32). Aufgrund dieser Analyse wird postuliert, dass es sich bei Acs2 um eine AMP-formende Acetyl-CoA Synthetase handelt. Diese katalysiert die ATP-abhängige Aktivierung von Acetat mit Coenzym-A (CoA) und bildet Acetyl-CoA.

Tab. 31: Ergebnis der Blast-Analyse von *acs2* (*CVV_05350*). Es sind die ersten beiden signifikanten Treffer gezeigt.

Annotation	Nächste Verwandte	e-Wert	Identität [%]
<i>acetate-CoA ligase</i>	<i>Kyrpidia tusciae</i>	0	97,40
	<i>Bacillus thermozeamaize</i>	0	68,95

Tab. 32: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in *acs2* (CVV_05350). Es sind die ersten drei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer gezeigt.

Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
PRK00174	<i>acetyl-CoA synthetase</i>	0
ACS (cd05966)	<i>acetyl-CoA synthetase (AMP-forming)</i>	0
Ac_CoA_lig_AcsA (TIGR02188)	<i>acetate-CoA ligase (acetyl-CoA synthetase and acetyl-activating enzyme)</i>	0

Um die strukturellen Auswirkungen abzuschätzen wurde eine Vorhersage der Struktur des Proteins auf der Basis von Homologien zu bereits kristallisierten Proteinen mithilfe des SWISS-MODEL-Servers durchgeführt. Die erhaltene Struktur ist in Abb. 25 dargestellt, wobei das fehlende Drittel rot eingefärbt wurde. Es zeigte sich dabei, dass durch den *frameshift* nicht nur ein großer Teil des Proteins fehlt, sondern auch, dass damit ein großer Teil der Aminosäuren des aktiven Zentrums fehlen (siehe in Abb. 25: Aminosäurereste (blau) und Produkt (Acetyl-CoA; türkis)). *K. spormannii* besitzt mit *acs1* (CVV65_04600) noch ein Homolog zu *acs2*. Proteindomänen-Analysen zeigten die gleichen konservierten Domänen, weswegen Acs1 ohne weitere Analysen die gleiche Reaktion zugesprochen wird.

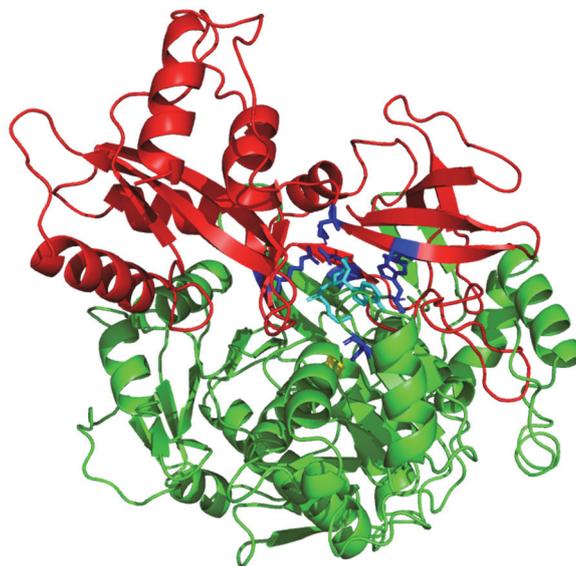


Abb. 25: Vorhergesagte Proteinstruktur von Acs2. Das Modell wurde anhand von Homologien zur Kristallstruktur der Acetyl-CoA Synthetase von *Salmonella typhimurium* (PDB-Nr. 2P2M) durch Swiss-Model erstellt. Rot: fehlende Aminosäure durch die Variation T425fs; Blau: Aminosäuren des aktiven Zentrums; Türkis: Produkt (Acetyl-CoA).

3.2.2.3. Mutation in CVV_06825 (99,75 %)

Die Basenänderung 410G>T in der kodierenden Sequenz des Gens *CVV_06825* kam in 99,75 % der Population vor und führte zu der Aminosäure-Änderung C137F. Dieses Gen ist als ein transkriptioneller Repressor im Genom annotiert, jedoch konnte die Analyse konservierter Proteindomänen zeigen, dass es der Gruppe der Fur-Proteine zugeordnet werden kann (Tab. 33). Diese Gruppe beinhaltet unter anderem eine Reihe verschiedener Regulatoren der Fe²⁺-, Zn²⁺- oder Mn²⁺-Aufnahme. Blast-Analysen zeigten, dass die größte Homologie zu dem Fur-Protein PerR besteht (Tab. 34).

Tab. 33: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in *CVV_06825*. Es sind die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen, mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer gezeigt.

Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
Fur (COG0735)	<i>Fe²⁺ or Zn²⁺ uptake regulation protein</i>	1,6*e ⁻³³
Fur_like (cd0753)	<i>Ferric uptake regulator (Fur) and related metalloregulatory proteins; DNA-binding repressors and activators</i>	3,2*e ⁻³²

Tab. 34: Ergebnis der Blast-Analyse von *CVV_06825*. Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.

Annotation	Nächste Verwandte	e-Wert	Identität [%]
<i>transcriptional repressor</i>	<i>Kyrpidia tusciae</i>	0	98,59
<i>peroxide-responsive transcriptional repressor PerR</i>	<i>Halobacillus halophilus</i>	0	60,74

PerR ist sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Mikroorganismen ein stark konserviertes Protein, das primär die Funktion eines H₂O₂- und NO-Sensorproteins erfüllt. In *B. subtilis* umfasst das PerR-Regulon – neben *perR* selbst – weitere Gene, die an der Abwehr von oxidativem Stress (*kata*, *ahpCF* und *mrgA*), der Metall-Ionen Homöostase (*zosA*, *fur*, *hemAXCDBL*) und der Produktion von Surfactanten (*srfa*) beteiligt sind (De Bruijn, 2016).

Die funktionelle Einheit von PerR in *B. subtilis* ist ein Homodimer (Traoré *et al.*, 2006). Jedes dieser Monomere besitzt zwei Metall-Ionen Bindestellen: eine strukturelle Zn²⁺- und eine regulatorische Fe²⁺- oder Mn²⁺-Bindestelle. Die Koordination von Fe²⁺ oder Mn²⁺ ist zum einen für die Bindung von PerR an dessen DNA-Bindestelle und zum anderen für die Funktion als H₂O₂-Sensorprotein essentiell (Dubbs und Mongkolsuk, 2012). Diese Funktion beruht auf der Reaktion von H₂O₂ mit Fe²⁺, wodurch in einer Fenton-Reaktion Fe³⁺ und ein Hydroxyl-Radikal entsteht. Letzteres oxidiert eines der Fe²⁺-komplexierenden Histidin-Reste zu 2-Oxo-Histidin. Da diese Oxidation nicht reversibel ist, führt dies zu einer irreversiblen Schädigung der

Bindestelle und zum Abbau des Proteins (Mongkolsuk und Helmann, 2002). Schlussendlich wird die Repression, beispielsweise H_2O_2 -detoxifizierender Proteine, gelöst.

Die Bindung von Zn^{2+} ist hingegen essentiell für die Dimerisierung der beiden Monomere und damit für die Struktur von PerR. Es wird derzeit jedoch nicht angenommen, dass die Koordination der Zn^{2+} -Atome eine Rolle in der Sensor-Eigenschaft von PerR spielt, da die komplexierenden Cystein-Reste in hohem Maße resistent gegenüber der Oxidation durch H_2O_2 sind (Traoré *et al.*, 2006). Jedes Zn^{2+} -Atom wird von vier dieser Cystein-Reste komplexiert, die in zwei konservierten CXXC-Motiven am C-Terminus des Proteins lokalisiert sind (Mongkolsuk und Helmann, 2002). Diese konnten ebenfalls in dem hier analysierten PerR von *K. spormannii* identifiziert werden (C92, C95, C134, C137). Die Variante in der Population von Stamm EAD zeigt einen Austausch von C137 durch ein Phenylalanin (C137F). Um einen genaueren Einblick in die strukturellen Änderungen dieser Mutation zu bekommen wurde eine 3D-Rekonstruktion von PerR auf der Basis des PerRs von *Bacillus subtilis* erstellt (Abb. 26A). Bei der genaueren Betrachtung der Zn^{2+} -Bindestelle konnte anhand dessen auch die Lokalisation der vier komplexierenden Cysteine bestätigt werden (Abb. 26B). Zusätzlich wurde die gleiche Struktur auch mit der in Stamm EAD vorherrschenden Mutation C137F durchgeführt (Abb. 26C).

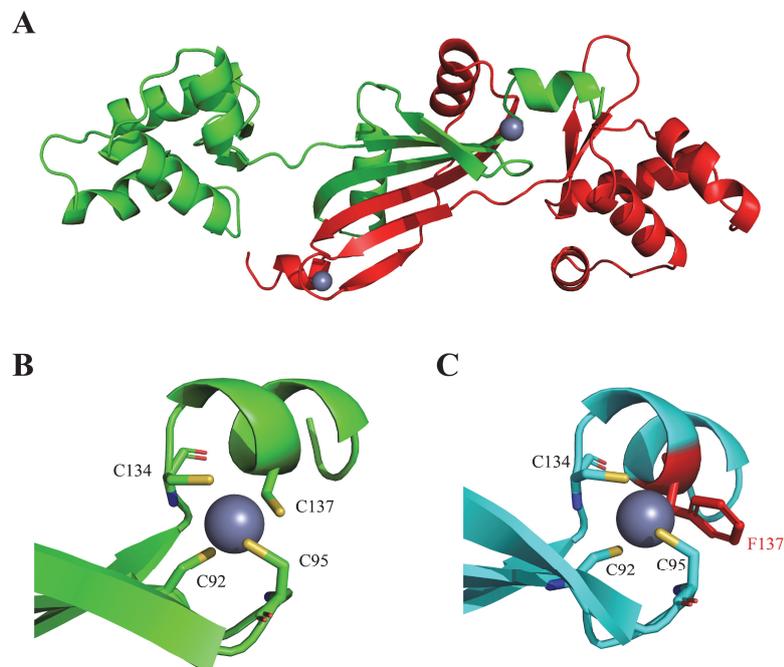


Abb. 26: Vorhergesagte Proteinstruktur von CVV_06825. Das Modell wurde anhand von Homologien zur Kristallstruktur von PerR aus *Bacillus subtilis* (PDB-Nr. 2RGV) durch Swiss-Model erstellt. A: Struktur des Homodimers von PerR. B: Detail-Aufnahme der Zink-Bindestelle mit den komplexierenden Cystein-Resten. C: Detailaufnahme der Zink-Bindestelle mit der Variation C137F.

3.2.2.4. Mutation in CVV_07525 (34,88 %)

In der kodierenden Sequenz von CVV_07525 führt die Deletion von Nukleotid 72 zu einem *frameshift* an Valin 25 in 34,88 % der Population von Stamm EAD. Es handelt sich bei CVV_07525 um ein 8 kDa kleines Protein, welches als *hypothetical protein* (engl. für hypothetisches Protein) annotiert ist. Es konnte ihm durch Sequenzanalysen keine genauere Funktion zugeordnet werden. Auch der genomische Kontext mit möglichen funktionellen Gemeinsamkeiten lieferte dazu keinen Anhaltspunkt.

3.2.2.5. Mutation in CVV_12480

In der kodierenden Sequenz von CVV_12480 wurde der Aminosäure-Austausch V233G in 99,78 % der Population von Stamm EAD vorgefunden. Im Genom von *K. spormannii* ist CVV_12480 als Fe-S Bindeprotein annotiert, jedoch zeigte die Analyse der konservierten Proteindomänen eine potentielle Funktion in der Energiekonservierung als Teil des *succinate dehydrogenase/fumarate reductase* Komplexes oder als C-Untereinheit eines *CoB-CoM heterodisulfide reductase* Komplexes (Tab. 35 und Tab. 36).

Tab. 35: Ergebnis der Blast-Analyse von CVV_12480. Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.

Annotation	Nächste Verwandte	e-Wert	Identität [%]
<i>(Fe-S)-binding protein</i>	<i>Kyrpidia tusciae</i>	0	99,01
	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	0	79,11

Tab. 36: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in CVV_12480. Es sind die ersten drei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer gezeigt.

Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
GlpC (COG0247)	<i>Fe-S oxidoreductase [Energy production and conversion]</i>	6,36*e ⁻³²
PRK06259	<i>succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit</i>	3,39*e ⁻²⁹
CoB_CoM_SS_C (TIGR03290)	<i>CoB-CoM heterodisulfide reductase, subunit C; The last step in methanogenesis leaves two coenzymes of methanogenesis, CoM and CoB; Similar enzyme complex subunits are found in various other species, but likely act on a different substrate</i>	2,9*e ⁻¹⁴

Weitere Blast-Analysen der umliegenden Gene zeigten große Sequenzidentitäten zu verschiedenen Untereinheiten eines Heterodisulfidreduktase- (HDR-) ähnlichen Komplexes von *K. tusciae*, aber auch zu *Sulfobacillus* sp. (siehe Anhang, Tab. 43 für die Blast-Ergebnisse). Dieser Komplex ist besonders in Methanogenen als der Reduktase-Komplex des

Heterodisulfids CoB-S-S-CoM beschrieben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass HDR-ähnliche Proteine auch in anderen acidophilen schwefeloxidierenden Bacteria und Archaea vertreten sind. Dieser HDR-Komplex scheint hier eine wichtige Rolle in der Oxidation von Disulfid-Verbindungen zu Sulfid zu haben (Cao *et al.*, 2018). Dessen Substrat sind wohl Sulfan-Schwefelverbindungen (RSS_nH), die von reduzierten Schwefelspezies aus dem Extrazellularraum ins Cytoplasma transportiert werden (Justice *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2018). Das gesamte analysierte Gencluster mit *CVV_12480* hat durch seinen Aufbau und die Sequenzidentitäten der einzelnen Proteine eine starke Homologie zu dem *hdr*-ähnlichen Gencluster aus *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* AMDSBA1 (Abb. 27). Ähnliche Gencluster konnten auch in anderen acidophilen Schwefeloxidierern wie *Acidithiobacillus* sp. oder *Aquifex aeolicus* beschrieben werden.

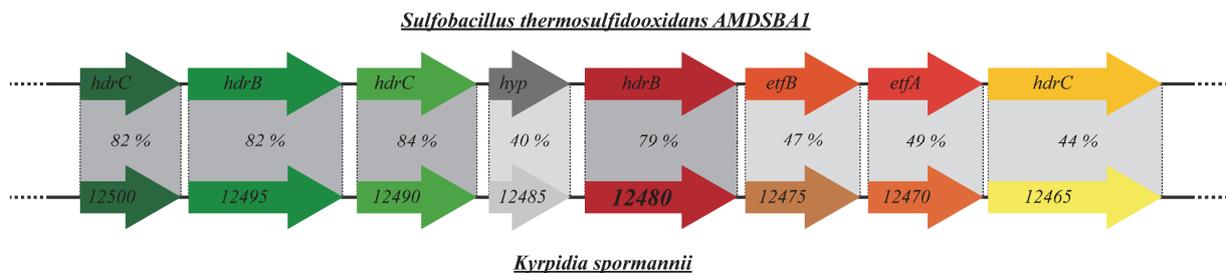


Abb. 27: Schematische Darstellung des *hdr*-ähnlichen Genclusters von *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* AMDSBA1 mit der jeweiligen Sequenzidentität (in %) zu dem potentiellen Gencluster aus *K. spormannii*. Die Sequenzabdeckung war für alle untersuchten Proteine über 90 %. Nach Justice *et al.*, 2014.

Bisher wurde die Fähigkeit der Oxidation reduzierter Schwefelspezies für *K. spormannii* noch nicht beschrieben. Daher wurden Wachstumskurven des Wildtyps und des Stamms EAD unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen mit elementarem Schwefel (S^0) als Elektronen- und Energiequelle, CO_2 als Kohlenstoffquelle und O_2 als Elektronendonator durchgeführt. Da die Entstehung von SO_4^{2-} , sowie eine Ansäuerung des Mediums, Zeichen des Wachstums mit S^0 sind, wurden diese Parameter aufgezeichnet. Ein abiotischer Ansatz diente als Negativ-Kontrolle. Es ließ sich für beide Kulturen nach ca. fünf Tagen eine leichte Trübung beobachten, die einher ging mit der Akkumulation von SO_4^{2-} (bis zu 0,45 mM) und dem Absinken des pHs von 3,7 bis auf etwa 2,9 (Abb. 28). Diese Ergebnisse sprechen für die metabolische Aktivität und damit für das Wachstum von *K. spormannii* mit S^0 als Elektronen- und Energiequelle. Die abiotische Kontrolle zeigte im Gegensatz dazu keine solche Anzeichen für Wachstum. Es

konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate der beiden getesteten Stämme festgestellt werden.

Über die Struktur dieses HDR-ähnlichen-Komplexes und der Funktion seiner einzelnen Komponenten ist bisher nur wenig bekannt, daher kann auch keine verlässliche Aussage über die Auswirkungen der in Stamm EAD beobachteten Variante V233G getroffen werden.

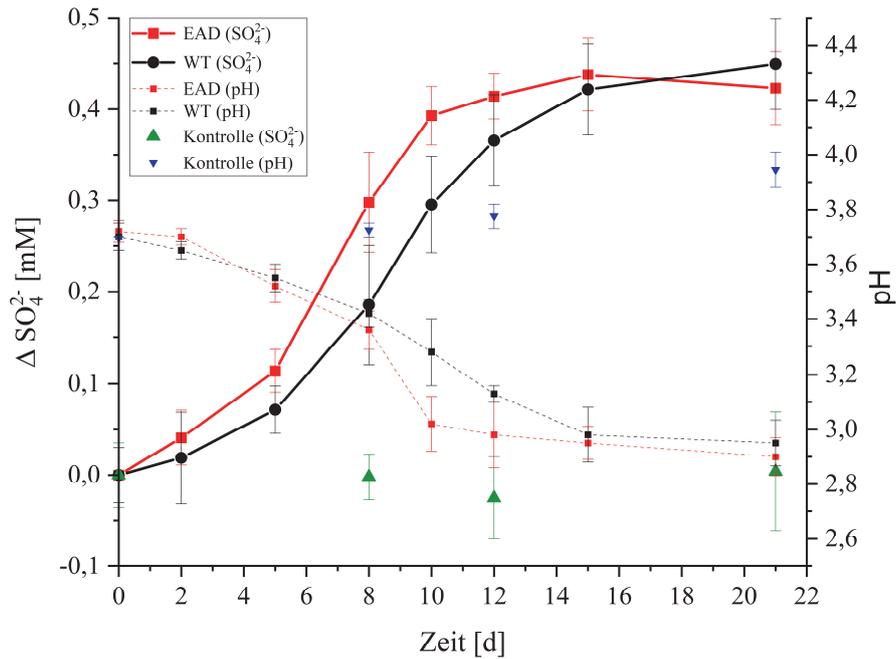


Abb. 28: Wachstumskurve von *Kyrpidia spormannii* WT und Stamm EAD unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen mit S^0 als Elektronen- und Energiequelle und O_2 als Elektronenakzeptor. Die Änderung der Sulfat-Konzentration (ΔSO_4^{2-}) und der pH-Wert wurden aufgezeichnet. Die Kontrolle stellte ein abiotisches Experiment dar. Die Wachstumskurven wurden im Triplikate durchgeführt.

3.2.2.6. Mutation in *murA2*

In der kodierenden Sequenz von *murA2* (CVV65_15980) führte die Basenänderung 698T>A in 37,08 % der Population zu der Aminosäureänderung I233N. Das korrespondierende Genprodukt ist als das Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase annotiert, was durch Blast- und Proteindomänen-Analysen bestätigt werden konnte (Tab. 37 und Tab. 38).

Tab. 37: Ergebnis der Blast-Analyse von *murA2* (CVV65_15980). Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.

Annotation	Nächste Verwandte	e-Wert	Identität [%]
UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine	<i>Kyrpidia tusciae</i>	0	99,76
1-carboxyvinyltransferase	<i>Effusibacillus pohliae</i>	0	69,29

Tab. 38: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in *murA2* (CVV65_15980). Es sind die ersten drei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer gezeigt.

Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
PRK09369	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1,8*e ⁻¹⁶³
MurA (COG0766)	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [<i>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</i>]	2,38*e ⁻¹⁶²
UdpNAET (cd01555)	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine enolpyruvyl transferase	3,54*e ⁻¹⁵⁹

Die UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase MurA katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese des Peptidoglykans. Dabei überträgt MurA die Enolpyruvat-Gruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf UDP-*N*-Acetylglucosamin (UNAG), wobei Enolpyruvyl-UDP-*N*-Acetylglucosamin (EP-UNAG) entsteht (Abb. 29). Dieses wird in der weiteren Peptidoglykan-Biosynthese durch die Mur-Enzyme MurB-F zur finalen Peptidoglykan-Vorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid umgesetzt und anschließend durch weitere enzymatische Schritte über die Cytoplasmamembran transportiert (Teo und Roper, 2015).

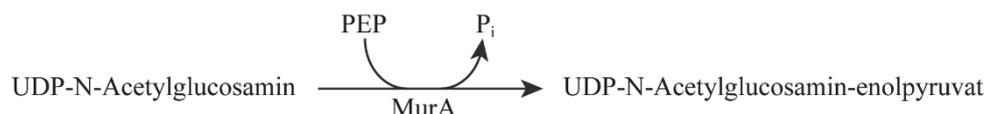


Abb. 29: Schematische Darstellung der von MurA katalysierten enzymatischen Reaktion. PEP – Phosphoenolpyruvat; P_i – anorganisches Phosphat.

Um die Auswirkungen dieser Mutation auf die Proteinaktivität experimentell zu testen, wurde das Wildtyp-Protein (MurA2_{WT}) und die Variante aus Stamm EAD (MurA2_{Mut}) heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und die Enzymaktivitäten bestimmt. Der Vektor pASK-IBA43plus wurde für die heterologe Expression gewählt, da durch die Klonierung des Gens in diesen Vektor ein N-terminaler Polyhistidin-(His-)Tag an die Gensequenz kloniert werden konnte. Für die Klonierung der Expressions-Plasmide wurde *murA2_{WT}* mit den Primern 1 und 2 (Tab. 9) amplifiziert, wobei genomische DNA (gDNA) von *K. spormannii* als *template* verwendet wurde. Der Basenaustausch 698T>A wurde über eine PCR-basierte *site-directed mutagenesis* in die Nukleotid-Sequenz *murA2_{WT}* eingeführt (Primer 3 und 4). Die beiden Amplifikate der Gene *murA2_{WT}* und *murA2_{Mut}* wurden anschließend mittels isothermaler *in-vitro* Ligation in den Vektor pASK-IBA43plus ligiert. Dieser wurde zuvor mit den Restriktionsenzymen PstI und EcoRI geschnitten. Die erhaltenen Plasmide wurden nun jeweils in *E. coli* BL21 transformiert (siehe Anhang, Abb. 51 für die Plasmidkarten).

Anschließend wurden die Proteine in *E. coli* BL21 pASK-IBA43plus_*murA2_{WT}* und *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA43plus_*murA2_{Mut}* exprimiert. Die Zellen wurden mittels French Press lysiert, grobe Zell- und Membranbestandteile in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert und der lösliche Überstand mit den beiden heterolog exprimierten Proteinen weiterverwendet. Da die aus *K. spormannii* stammenden Proteine, im Gegensatz zu denen aus dem mesophilen Organismus *E. coli* thermostabil sind, wurde eine Hitzefällung der *E. coli* Proteine durchgeführt. Dies sollte helfen Verunreinigungen während der Affinitätschromatographie zu reduzieren. Mit den zentrifugierten und filtrierten Proben nach der Hitzefällung wurde eine Affinitätschromatographie über eine Ni²⁺-NTA-Säule durchgeführt. Es wurden die Imidazol-Konzentrationen 50, 100, 150 und 250 mM zur Elution des Proteins gewählt. In Abb. 30 sind die SDS-Gele der einzelnen Reinigungsschritte beider Proteine zu sehen. In den Eluat-Fractionen nach der Affinitätschromatographie sind klare Banden zu erkennen, die anhand ihrer Größe den beiden Proteinen MurA2_{WT} und MurA2_{Mut} (je 46,8 kDa) zugeschrieben werden können. Das Eluat der 150 mM Fraktion wurde für die anschließenden Aktivitätstests verwendet.

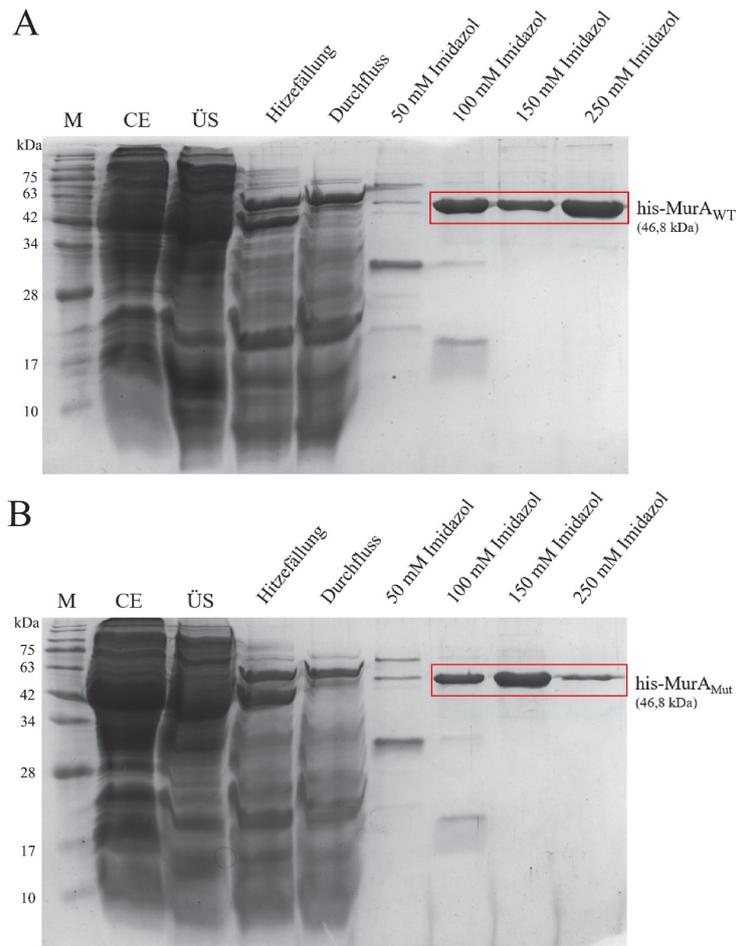


Abb. 30: SDS-Gele der Aufreinigung von His-MurA₂^{WT} (A) und His-MurA₂^{Mut} (B). Die Gele zeigen jeweils den Zellextrakt nach der Zellyse (CE, 30 µg Protein), den Überstand nach der Ultrazentrifugation (ÜS, 30 µg Protein), die Proteinfraction nach der Hitze-fällung (20 µg Protein), den Durchfluss des His-Tag Aufreinigung (20 µg Protein) und die einzelnen Elutions-Fractionen (je 5 µg Protein). Die Größen des Markers (M) entsprechen dem Marker BlueStar Prestained Protein Marker und sind in kDa angegeben

Die gereinigten Proteine wurden nun auf ihre katalytischen Eigenschaften getestet. Dafür wurde ein Test auf der Basis von Malachit-Grün gewählt, bei dem das anorganische Phosphat (P_i) gemessen wird, welches während der Reaktion entsteht. Für beide Enzyme konnte durch die Akkumulation von P_i gezeigt werden, dass es sich bei ihnen um eine aktive UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase handelt (Abb. 31). Das ermittelte V_{max} der beiden Enzyme war für MurA₂^{WT} 8,9 µM min⁻¹, für MurA₂^{Mut} 1,84 µM min⁻¹. Es ließ sich also feststellen, dass die ermittelte Mutation I233N in MurA₂ zu einer Verringerung der Aktivität um 80 % führt.

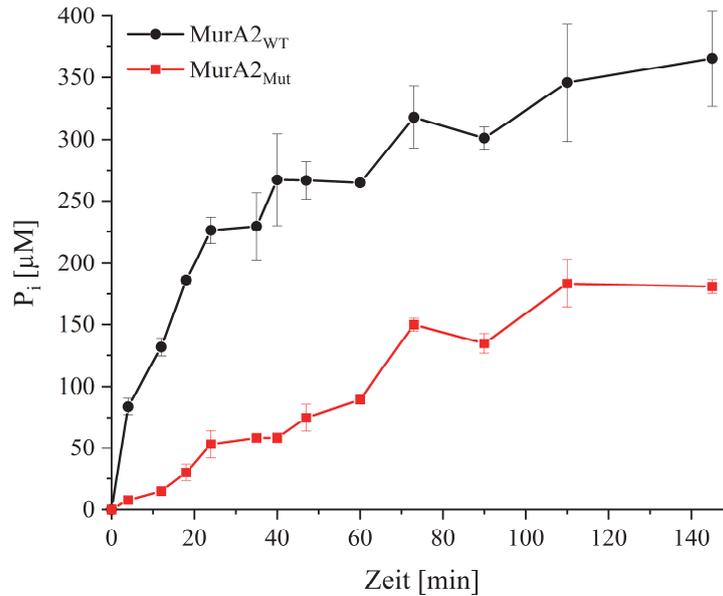


Abb. 31: Auswertung der Aktivitätstests von MurA2_{WT} (schwarz) und MurA2_{Mut} (rot). Der Test wurde im Triplikot durchgeführt.

Um herauszufinden, ob diese Aktivitätsverringering möglicherweise auf strukturelle Veränderungen der MurA2-Mutante zurückgeführt werden könnte, wurde eine 3D-Rekonstruktion der Kristallstruktur von MurA2_{WT} erstellt (Abb. 32A). Diese zeigt den typischen Aufbau von MurA mit seinen zwei scheinbaren Fass-artigen Domänen, die über eine „Scharnier“-Region miteinander verbunden sind (Barreteau *et al.*, 2008). Bisherige Analysen in *Enterobacter cloacae* und *Escherichia coli* konnten zeigen, dass dieses Protein in seiner offenen Form (Abb. 32B, links) die Substrate bindet und daraufhin in seiner geschlossenen Form die Reaktion katalysiert (Abb. 32B, rechts) (Barreteau *et al.*, 2008). Die Mutation I233N befindet sich in der „Scharnier“-Region des Proteins (siehe Abb. 32A, roter Pfeil) und damit in einer potentiell wichtigen Region für den „Auf-Zu“-Mechanismus des Proteins.

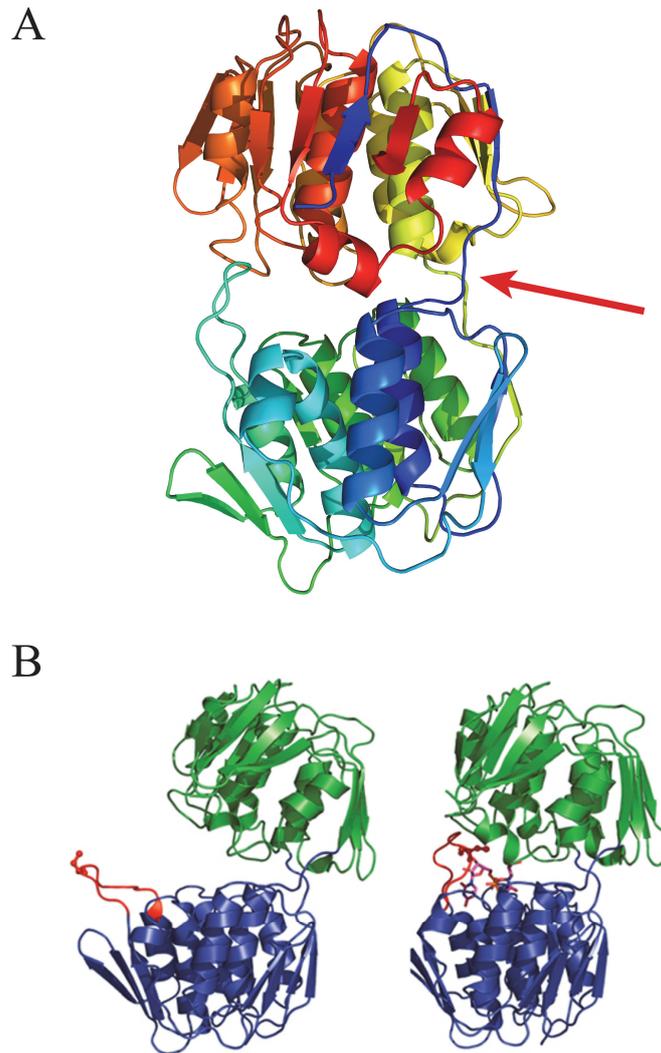


Abb. 32: Vorhergesagte 3D-Proteinstruktur von MurA2 aus *K. spormannii* (A) und die strukturellen Änderungen von MurA während der Reaktion (B). A: Die Struktur wurde mit SWISS-MODEL anhand der Strukturhomologien zu MurA1 aus *Bacillus anthracis* (PDB-Nr.: 3SG1) erstellt. Der rote Pfeil deutet die Stelle an, in der sich die Mutation I233N befindet. B: Links: Offene, liganden-freie Form von MurA aus *Enterobacter cloacae* (PDB-Nr.: 1NAW) und geschlossene Form mit UDP-GlcNAc und Fosfomycin aus *Escherichia coli* (PDB-Nr.: 1UAE). Aus Barreteau *et al.*, 2008.

3.2.2.7. Stille Mutationen

In drei der detektierten Variationen konnten stille (synonyme) Mutationen, also solche, welche die Aminosäuresequenz des Proteins nicht ändern, mit einer zum Teil hohen Häufigkeit detektiert werden. Insgesamt beläuft sich der Anteil stiller Mutationen an den gesamten Mutationen in kodierenden Sequenzen auf 13,6 %. Das Auftreten von stillen Mutationen konnte in Adaptionsexperimenten schon wiederholt beobachtet werden, weswegen davon ausgegangen wird, dass auch sie vorteilhaft für die schnelle Evolution und Adaption eines Organismus sind (Lebeuf-Taylor *et al.*, 2019).

CVV_16360

In Gen *CVV_16300* konnte der Basenaustausch 1425G>T mit einer Häufigkeit von 99,75 % ermittelt werden. Die Analyse der Proteindomänen des kodierten Proteins legt eine potentielle Funktion als Pyruvat-Oxidase nahe (Tab. 39). Es könnte sich daher um ein Enzym handeln, dass die in Abb. 33 gezeigte Reaktion katalysiert.



Abb. 33: Schematische Darstellung der katalysierten Reaktion einer potentiellen Pyruvat-Oxidase *CVV_16300*.

CVV_14005

In Gen *CVV_14005* konnte der Basenaustausch 822A>G mit einer Häufigkeit von 99,42 % ermittelt werden. Proteindomänenanalysen legen hier eine potentielle Funktion als Teil eines Ni²⁺-Transporters nahe (Tab. 39).

CVV_09460

In Gen *CVV_09460* konnte der Basenaustausch 528T>G mit einer Häufigkeit von 36,81 % ermittelt werden. Nach den konservierten Proteindomänen zu urteilen handelt es sich hierbei um eine Prolin-spezifische Peptidase, deren genauere Funktion jedoch nicht weiter spezifiziert werden konnte (Tab. 39).

Tab. 39: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in Genen, die eine stille Mutation tragen. Die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer sind gezeigt. Es sind lediglich Treffer mit e-Werten unter e⁻¹⁰ aufgeführt.

Variation (Gen-Nr.)	Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
<i>CVV65_16360</i>	PRK08611	<i>pyruvate oxidase</i>	3,8*e ⁻⁹²
	TPP_POX (cd02014)	<i>Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Pyruvate oxidase (POX) subfamily</i>	6,63*e ⁻⁶⁷
<i>CVV65_14005</i>	DppC (COG1173)	<i>ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, permease component</i>	1,22*e ⁻⁶³
	nickel_nikC (TIGR02790)	<i>nickel ABC transporter, permease subunit NikC</i>	1,43*e ⁻³⁹
<i>CVV65_09460</i>	pro_imino_pep_2 (TIGR01250)	<i>proline-specific peptidase</i>	1,18*e ⁻⁹³

3.2.2.8. Variationen in nicht-kodierenden Bereichen

Eine weitere Beobachtung, die bei der Variantendetektion gemacht werden konnte, war das Auftreten von Variationen in nicht-kodierenden, intergenischen Bereichen. Da diese Auswirkungen auf regulatorische DNA-Sequenzen haben können, wurden die Gene analysiert, die vor bzw. nach der detektierten Basenvariation lokalisiert waren.

Insertion nach Nukleotid 1515328

Nach Nukleotid (Nt) 1515328 kam es mit einer Häufigkeit von 90,82 % zu einer Insertion von zwei Guaninen. Dieses Nukleotid liegt 37 nt vor *CVV_07760* bzw. 59 nt vor *CVV_07755* (Abb. 34). Sowohl die Annotation, als auch die durchgeführten Proteindomänenanalysen legen für *CVV_07760* eine Funktion als Methyltransferase CheR nahe (Tab. 40). Diese ist ein Teil der Regulationsmechanismen der Chemotaxis. Für *CVV_07755* konnte weder durch seine Annotation, noch durch die Analyse der Proteindomänen eine Funktion zugeordnet werden.

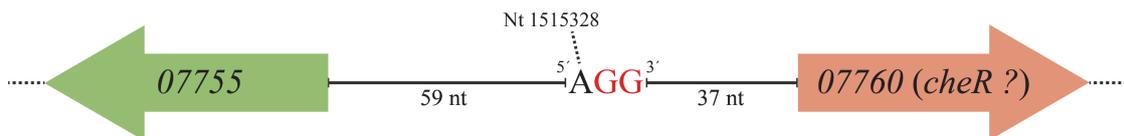


Abb. 34: Schematische Darstellung des nicht-kodierenden Bereichs zwischen den Genen *CVV_07755* und *CVV_07760* mit der Insertion der zwei Guaninen nach Nukleotid 1515328.

Tab. 40: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen der Gene, die sich vor bzw. nach einer Variation in einem nicht-kodierenden Bereich befinden. Die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen, mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer sind gezeigt. Es sind lediglich Treffer mit e-Werten unter e^{-10} aufgeführt.

Gen-Nr.	Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
<i>CVV65_07760</i>	CheR (COG1352)	<i>Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins</i>	$5,41 * e^{-60}$
	MeTrc (smart00138)	<i>Methyltransferase, chemotaxis proteins</i>	$5,49 * e^{-51}$

Basenaustausch an Nukleotid 1563731

An Nukleotid 1565328 fand der Basenaustausch C>T mit einer Häufigkeit von 38,81 % statt. Dieses befindet sich 35 nt nach Gen *CVV_08000*, welchem jedoch weder durch seine Annotation, noch durch Proteindomänenanalysen eine Funktion zugeordnet werden konnte.

3.2.3. Analyse der Gene mit hoher Mutationsrate

Es stellte sich heraus, dass die Verteilung der lauten Mutationen innerhalb der betroffenen CDS nicht gleichmäßig ist, sondern dass bestimmte CDS verhältnismäßig oft von Mutationen betroffen sind. So sind die 387 lauten Mutationen auf nur 155 verschiedene CDS verteilt. Etwa 85 % der betroffenen CDS haben mehr als eine Variation und allein 12 CDS haben 5 bis 13 Variationen mit einer Häufigkeit von mindestens 10 % (Abb. 35).

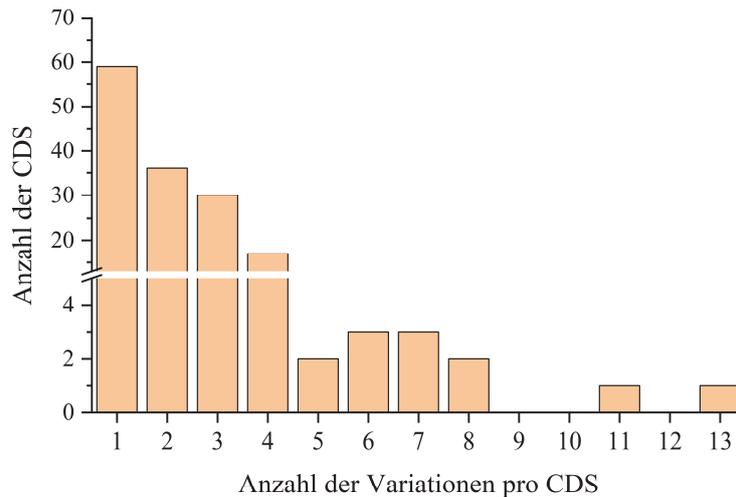


Abb. 35: Anzahl der CDS, die eine unterschiedliche Anzahl an Variationen besitzen.

In diesem Teil der Arbeit soll nun auf die sieben Gene eingegangen werden, für die mehr als sieben Mutationen pro CDS ermittelt werden konnten. Tab. 41 zeigt hierbei eine Zusammenfassung der ermittelten Daten zu den einzelnen Genen. Die Mutationsraten der einzelnen Gene nahmen Werte zwischen $2,96 \cdot 10^{-3}$ (*tkt*) und $10,84 \cdot 10^{-3}$ (*10770*) an. Eine weitere Beobachtung die gemacht werden konnte war, dass die Variationen in den Genen in den meisten Fällen dazu führten, dass eine lokale Häufung der variierten Aminosäuren stattfand. Auffällig ist außerdem, dass diese lokalen Häufungen mit teilweise gleichen Häufigkeiten detektiert werden konnten. Die Funktion der einzelnen Gene wurde anhand ihrer Annotation oder Proteindomänenanalysen durchgeführt und soll im Folgenden kurz behandelt werden.

Tab. 41: Übersicht der ermittelten Daten der Variationen mit einer hohen Mutationsrate. Die hier aufgeführte Zusammenfassung der Proteindomänenanalysen ist im Anhang, Tab. 44 genauer erläutert.

Annotiertes Gen (Länge in bp)	Mutationen in CDS (Häufigkeit in %)	Mutationsrate (Mutationen pro Basenpaar)	Aminosäure- Änderungen	Zsfg. der Proteindomänen- Analyse (oder Annotation)
<i>argH</i> (1344)	391del (10,91) 388C>A (10,89) 386_387insT (10,93) 382del (10,76) 380T>G (10,78) 377_378insT (10,88) 308A>C (17,55) 305T>C (17,54) 301_302delinsTT (15,52) 298G>A (18,28) 295G>T (18,16) 286G>C (10,47) 278A>T (14,11)	$9,67 \cdot 10^{-3}$	I131fs L130I G129fs I128fs I127S G126fs H103P L102P K101L G100S G99C G96R D93V	Arginiosuccinat- Lyase ArgH
<i>CVV_10770</i> (1015)	339_340insC (12,75) 334del (15,27) 330_331insT (15,20) 326T>A (11,13) 324_325insG (11,19) 322T>A (11,17) 319del (11,18) 317T>A (11,11) 312del (15,21) 308_209insA (14,67) 303del (11,71)	$10,84 \cdot 10^{-3}$	A114fs T112fs Pro11fs L109H L109fs S108C A107fs V106G P105fs G104fs I103fs	„hypothetical protein“
<i>CVV_10610</i> (1512)	235C>G (12,50) 1121A>C (13,66) 1123C>G (13,75) 1208C>G (10,25) 1211A>T (10,33) 1214C>G (10,36) 1218del (10,13) 1220A>C (10,30)	$5,29 \cdot 10^{-3}$	H79A F374C A375G P403R N404I P405R D406fs N407T	Proteindomäne: Aromaten-/Alken- hydroxylierende Monooxygenase (α -Untereinheit)
<i>CVV_08360</i> (1332)	1252C>G (10,50) 1250A>G (10,55) 89T>C (11,39) 87del (11,38) 85G>C (11,43) 80G>C (11,52) 78_79insA (11,67) 77G>A	$6,01 \cdot 10^{-3}$	P418A L417A M30T M30fs G29R R27P R27fs R26H	Proteindomäne: “ <i>YhcC/D like</i> <i>ATP-grasp</i> ”
<i>CVV_03605</i> (1608)	735_736delinsCA (10,73) 738_739insC 742delinsAA 749T>C 754G>C 756_757delinsAA 760_761delinsCG 763G>C	$4,98 \cdot 10^{-3}$	G245_D246delinsDN S247fs L248fs L250P G252R G253S F254R G255R	Cobalamin- Synthase CobQ
<i>tkt</i> (2025)	1387C>T 1390A>T	$2,96 \cdot 10^{-3}$	L463F T464S	Transketolase Tkt

Ergebnisse

	1396dup 1397A>C 1401C>G 1405del 1406C>T		D466fs D466A S467N A469fs A496V	
<i>CVV_02760</i> (1374)	659T>A 656C>T 652T>G 362_363insT 360G>C 355G>C 352del	4,37*10 ⁻³	L220Q A219V Y218D A123fs G120D V119L M118fs	Transposase

argH (CVV65_02325)

Das Protein für das *argH* kodiert, ist auch als das Enzym Argininosuccinat-Lyase bekannt und katalysiert als Teil des Harnstoffzyklus die Spaltung von Argininosuccinat zu Arginin und Fumarat.

CVV_10770

Bei dem Genprodukt von Gen *CVV_10770* handelt es sich um ein als „hypothetisches Protein“ annotiertes Protein. Ihm konnten weder mit Blast- noch mit Proteindomänen-Analysen eine Funktion zugeordnet werden.

CVV_10610

Bei dem Genprodukt von Gen *CVV_10610* handelt es sich um ein annotiertes *YHS domain-containing protein*. Blast- und Proteindomänen-Analysen konnten seine Funktion näher als die α -Untereinheit einer Aromaten- und Alken-hydroxylierende Monooxygenase spezifizieren. Da diese jedoch eine sehr diverse Klasse an Enzymen darstellen, kann dem Protein *CVV_10610* keine eindeutige Funktion in Form einer spezifischen Reaktion zugeordnet werden.

CVV_08360

Das Genprodukt von Gen *CVV_08360* ist ebenfalls als ein „hypothetisches Protein“ annotiert. Blast- und Proteindomänen-Analysen ergaben „*YheC/D-like ATP-grasp*“ als eine potentielle Proteindomäne. Diese Domäne beschreibt generell Proteine, die in der Modifikation und Biosynthese von Sporenhüllen- und Kapselproteinen beteiligt sind.

CVV_03605

Das Genprodukt von Gen *CVV_03605* ist als die Cobalamin-Synthase *CobQ* annotiert. Dies konnte auch durch Blast- und Proteindomänenanalysen bestätigt werden. *CobQ* spielt eine wichtige Rolle in der Cobalamin Biosynthese, in der es bestimmte ATP-abhängige

Amidierungen des Porphyrinrings mithilfe von Glutamin als NH₂-Quelle katalysiert (Blanche *et al.*, 1991).

tkt (CVV_14375)

Das *tkt*-Gen (CVV_14375) wurde schon in vorherigen Arbeiten anhand von Sequenzanalysen als Teil des Calvin-Zyklus-Genclusters in *K. spormannii* identifiziert (Reiner *et al.*, 2020). Die Transketolase (Tkt) katalysiert dabei verschiedene Reaktionen im reduktiven Teil des Pentosephosphatwegs und ist damit ein wichtiger Teil der Regulation des Calvin-Zyklus.

CVV_02760

Bei CVV_02760 handelt es sich um das annotierte Gen einer Transposase, was ebenfalls durch Proteindomänen-Analysen bestätigt werden konnte.

3.3. Identifizierung und Funktionalitätstests der PHB-Synthesegene

In früheren Arbeiten, die sich mit der Synthese von PHB in *Kyrpidia spormannii* befassten, konnten schon einige potentiell daran beteiligte Gene durch Sequenzanalysen identifiziert werden (*phaA*, *phaB*, *phaC* und *phaR*) (Reiner, Jung, *et al.*, 2018; Reiner *et al.*, 2020). Dabei stellte sich heraus, dass der Aufbau des PHB-Syntheseclusters dem von *Bacillus megaterium* gleicht (Abb. 36). In der hier vorliegenden Arbeit sollten nun weitere Gene die an der PHB-Biogenese in *K. spormannii* beteiligt sind identifiziert, und die Funktionalität des PHB-Synthese-Genclusters durch eine heterologe Expression in *E. coli* experimentell verifiziert werden.

B. megaterium



K. spormannii

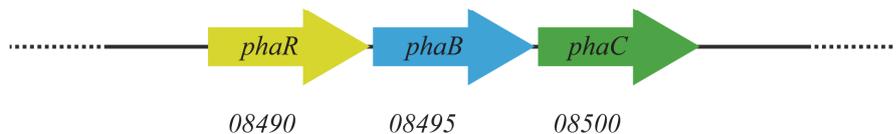


Abb. 36: Schematische Darstellung des PHB-Synthese Genclusters in *B. megaterium* und der bisher identifizierten Gene in *K. spormannii*. *phaP* – Phasin; *phaQ* – Regulatorprotein; *phaR* – Regulatorprotein und Teil der PHA-Synthaseeinheit; *phaB* – Acetoacetyl-CoA Reduktase; *phaC* – PHA-Synthase. Die Gennummern des *phaR-phaB-phaC* – Genclusters aus *K. spormannii* sind als CVV_XXXXX angegeben.

3.3.1. Identifizierung weiterer Gene der PHB-Biogenese

Um weitere Gene zu identifizieren wurde eine bioinformatische Untersuchung der Gene vorgenommen, die um das *phaR-phaB-phaC*-Gencluster (*phaRBC_{Ksp}*) lokalisiert sind. Dabei konnte Gen CVV_08505 als „poly-beta-hydroxybutyrate-responsive repressor“ identifiziert werden. In *B. megaterium* wurde das Gen *phaQ* ebenfalls als solches beschrieben (Lee *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Tatsache und der Lokalisation in der Nähe von *phaRBC_{Ksp}*, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei Gen CVV_08505 um das Gen für das PHB-Regulatorprotein PhaQ (*phaQ_{Ksp}*) handelt.

PhaQ hat in der Biogenese von PHB die Funktion eines Regulators, wobei es sowohl seine eigene Expression reguliert, aber insbesondere die von PhaP, einem wichtigen PHA-Struktur- bzw. Hüllprotein (Lee *et al.*, 2004). Dabei bilden *phaQ* und *phaP* in *B. megaterium* ein

bicistronisches Operon, welches ausgehend von einer Promotorsequenz vor *phaQ* transkribiert wird (Lee *et al.*, 2004). Daher wurde sich in der weiteren Analyse verstärkt auf die Untersuchung des *phaQ*-folgenden Gens (*CVV_08500*) konzentriert, mit der Hypothese, dass es sich hierbei um *phaP* aus *K. spormannii* (*phaP_{Ksp}*) handeln könnte. Mit einem Molekulargewicht von 22,5 kDa stellt das ermittelte Genprodukt von *CVV_08500* ein Protein dar, welches ein phasin-typisches Molekulargewicht besitzt (Pötter *et al.*, 2004; Tirapelle *et al.*, 2013; Mezzina und Pettinari, 2016). Blast- und Proteindomänenanalysen ergaben hingegen keine Übereinstimmung mit bisher beschriebenen Phasinen. Da Phasine jedoch sehr distinkte Sekundärstrukturen in Form einer hohen Abundanz von Alpha-Helices besitzen, wurde *CVV_08500* auf seine Sekundärstrukturen überprüft (Mezzina und Pettinari, 2016). Die Vorhersage der Sekundärstrukturen ergab, dass das Protein fünf α -Helices besitzt, in denen ein Großteil der Aminosäuren (75 %) angeordnet sind (Abb. 37).



Abb. 37: Vorhersage der α -Helices in der Aminosäuresequenz des Genprodukts von *CVV_08500* aus *K. spormannii*.

Weiterhin wurde eine 3D-Struktur-Vorhersage von *CVV_08500* anhand der Kristall-Struktur des PhaPs von *Aeromonas hydrophila* gemacht (Zhao *et al.*, 2016). Diese zeigte eine typische Anordnung der α -Helices, wie sie auch für andere Phasine beschrieben werden konnte (Abb. 38A) (Zhao *et al.*, 2016). Durch die Einfärbung hydrophober Oberflächenstrukturen konnten außerdem die amphiphilen Moleküleigenschaften der vorhergesagten 3D-Struktur von *CVV_08500* gezeigt werden, die ebenfalls wichtig für die Funktion der Phasine als Strukturprotein der hydrophoben PHB-Granula sind (Abb. 38B). Daher ist davon auszugehen, dass es bei Gen *CVV_08500* um das *phaP* von *K. spormannii* handelt.

Zusammenfassend lässt sich mit den durchgeführten *in-silico* Untersuchungen der beiden Gene *CVV_08505* (*phaQ*) und *CVV_08505* (*phaP*) ein aktualisiertes Schema des PHB-Synthese Genclusters in *K. spormannii* postulieren (Abb. 39). Im Vergleich mit dem Aufbau des Genclusters in *B. megaterium*, ist hier die gleiche Orientierung der Gene *phaQP* zu *phaRBC* in *K. spormannii* auffällig (Abb. 36).

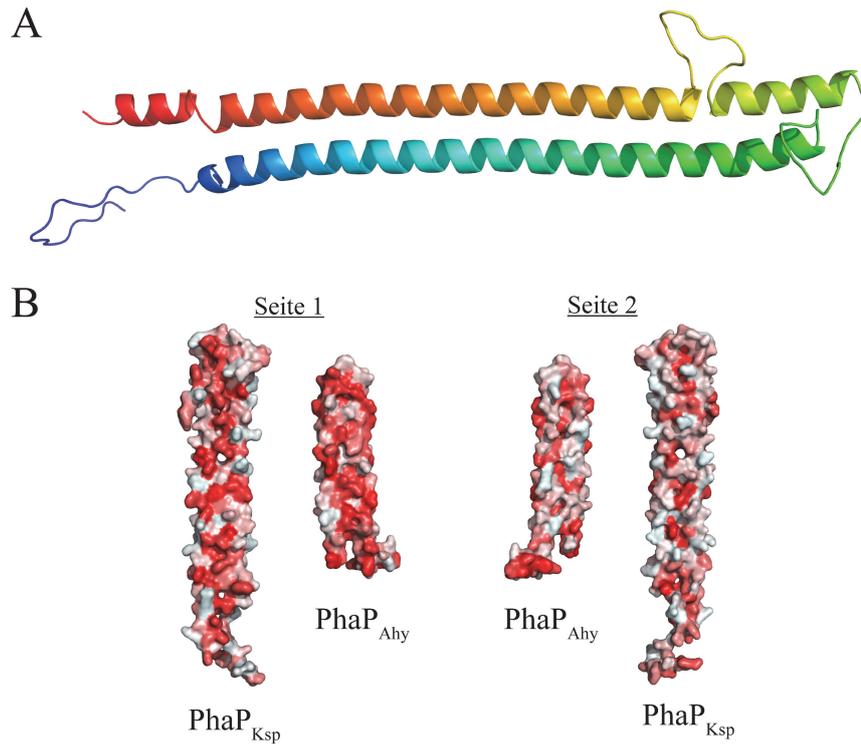


Abb. 38: Analysen der 3D-Strukturen des potentiellen PhaP von *K. spormannii* (PhaP_{Ksp}). **A:** Vorhergesagte 3D-Struktur anhand des PhaPs von *Aeromonas hydrophila* (PhaP_{Ahy}). **B:** Analyse der Oberflächen-Hydrophobizität von PhaP_{Ksp} und PhaP_{Ahy}.

PHB-Synthese Gencluster *K. spormannii*



Abb. 39: Schematische Darstellung des potentiellen PHB-Synthese Genclusters in *K. spormannii*. *phaP* – Phasin; *phaQ* – Regulatorprotein; *phaR* – Regulatorprotein und Teil der PHA-Synthaseeinheit; *phaB* – Acetoacetyl-CoA Reduktase; *phaC* – PHA-Synthase. Die jeweiligen Gennummern sind als CVV_XXXXX aus *K. spormannii* angegeben.

3.3.2. Heterologe Expression potentieller PHB-Synthesegene in *E. coli*

Um die Funktionalität des identifizierten PHB-Synthese-Genclusters *phaQPRBC* aus *K. spormannii* zu überprüfen, wurden die Gene *phaQPRBC* zusammen mit dem β -Ketohiolase-Gen *phaA* (10615) heterolog in *E. coli* exprimiert.

Hierzu wurde das Plasmid pBAD202_*phaA*_phaQPRBC erstellt. Die beiden Gensequenzen wurden mit den Primern 5 und 6 (*phaA*) bzw. mit den Primern 7 und 8 (*phaQPRBC*) aus der genomischen DNA von *K. spormannii* amplifiziert. Die Klonierung des Plasmids erfolgte anschließend in zwei Schritten: zuerst wurde pBAD202 mit den Restriktionsenzymen NcoI und PmeI geschnitten und das *phaA*-Konstrukt über eine isothermale *in-vitro* Ligation eingefügt. Das erhaltene pBAD202_*phaA* wurde daraufhin mit XmnI geschnitten und das *phaQPRBC*-Konstrukt ebenfalls über die isothermale *in-vitro* Ligation eingefügt. Schlussendlich wurde das erhaltene pBAD202_*phaA*_phaQPRBC mittels Elektroporation in *E. coli* BL21 transformiert. Die Plasmidkarte von pBAD202_*phaA*_phaQPRBC ist im Anhang, Abb. 52 abgebildet.

Der Stamm *E. coli* BL21 pBAD202_*phaA*_phaQPRBC wurde, wie in 2.8.1 beschrieben, kultiviert und die Plasmide induziert. Nach einer weiteren Kultivierung von 20 h wurde eine Nilrot-Färbung des Stammes, sowie eines *E. coli* BL21 Wildtyps als Negativ-Kontrolle durchgeführt. In den nachfolgenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten intrazelluläre Granula-Strukturen in *E. coli* BL21 pBAD202_*phaA*_phaQPRBC beobachtet werden (Abb. 40). In der Kontrolle wurden lediglich die Zellmembran und teilweise die Zellpole durch Nilrot angefärbt.

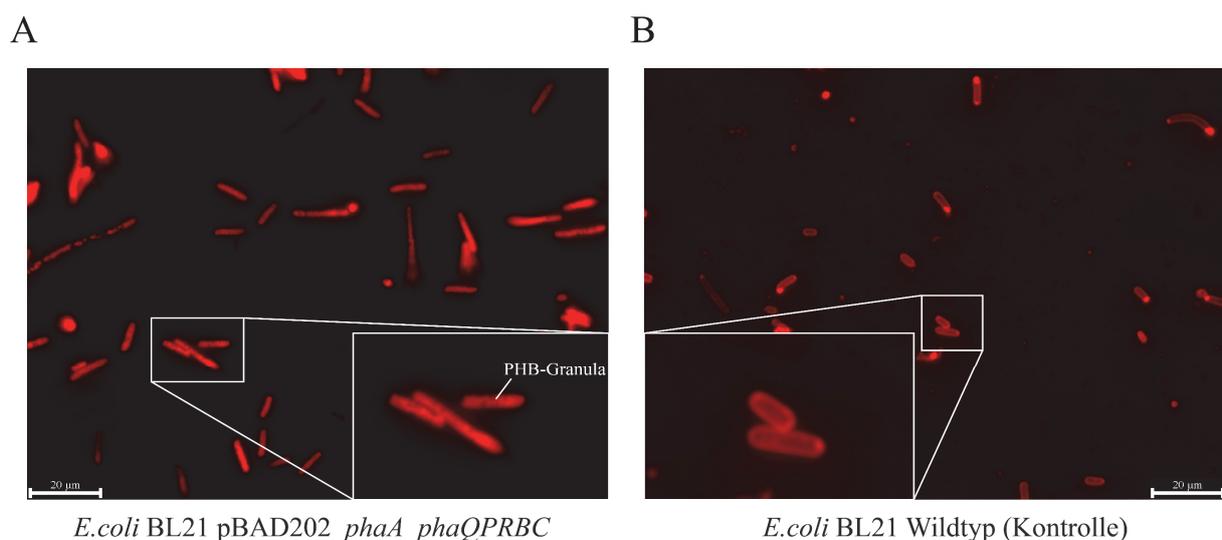


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Nilrot-gefärbten *E. coli* BL21 pBAD202_*phaA*_phaQPRBC (A) und eines *E. coli* BL21 Wildtyps (B).

Um einen qualitativen Nachweis zu erlangen, ob es sich bei den beobachteten intrazellulären Strukturen tatsächlich um PHB handelt, wurde eine HPLC-basierte Nachweismethode durchgeführt. Zusätzlich sollte eine quantitative Aussage des gemessenen PHB-Gehalts bezogen auf die Zelltrockenmasse anhand eines PHB-Standards erfolgen. Dafür wurde *E. coli* BL21 pBAD202_phaA_phaQPRBC wie oben beschrieben kultiviert und die Zellen gefriergetrocknet. Das PHB von 100 mg gefriergetrockneter Zellen wurde extrahiert und mittels saurer Hydrolyse in seine Monomere gespalten. Diese Hydrolysate wurden anschließend mittels HPLC analysiert und die Retentionszeit bei einer Wellenlänge von 210 nm mit der des PHB-Standards verglichen. Bei den Proben aus *E. coli* pBAD202_phaA_phaQPRBC konnte ein Peak bei einer Retentionszeit von 23,9 min in dem Chromatogramm detektiert werden, welcher mit der Retentionszeit des Peaks des PHB-Standards übereinstimmte. Unter der Einbeziehung der PHB-Eichgerade konnte ein Anteil von 9,6 % PHB in der Zelltrockenmasse ermittelt werden.

3.4. Entwicklung eines genetischen Systems für *K. spormannii*

Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollte ein genetisches System für *Kyrpidia spormannii* entwickelt werden. Dieses sollte, zusammen mit den vorherigen Ergebnissen, dabei helfen durch gezielte genetische Manipulationen ein besseres Verständnis über die elektroautotrophe Lebensweise und die Produktbildung in *K. spormannii* zu erhalten und dessen Produktspektrum im Hinblick auf einen biotechnologischen Prozess zu erweitern. In den seltensten Fällen können dabei die Komponenten und Verfahren eines gut erforschten und genetisch zugänglichen Laborstamms wie *E. coli* verwendet werden. Einige allgemeine Dinge die dabei berücksichtigt werden sollten sind:

- die Codon-Verwendung (engl.: *codon-usage*),
- die Kompatibilität des verwendeten Replikationsursprungs (*origin of replication*, Ori),
- der Schutz vor dem Abbau der eingebrachten DNA durch das Restriktions-/Modifikations-system des Zielorganismus
- die gewählte Transformationsmethode.

Da es sich bei *Kyrpidia spormannii* um einen thermophilen Mikroorganismus handelt muss zusätzlich auch die thermische Stabilität aller verwendeter Proteine und Selektionsmarker beachtet werden. Im Weiteren soll daher zuerst die Anpassung dieser Parameter an *K. spormannii* beschrieben werden und anschließend die damit durchgeführten Transformationsversuche.

3.4.1. Das Selektionssystem

In dieser Arbeit sollte ein Selektionssystem verwendet werden, das auf dem Antibiotikum Kanamycin beruht. Kanamycin ist zum einen thermisch sehr stabil ist, zum anderen sind mehrere thermostabile Selektionsmarker-Gene erhältlich (Peteranderl *et al.*, 1990; Kananavičiute und Čitavičius, 2015). Als ein solches Selektionsmarker-Gen wurde hier eine für *K. spormannii* codon-optimierte Variante von *TK101* verwendet (Liao und Kanikula, 1990). Diese DNA-Sequenz wurde zusammen mit dem nativen Promotorbereich (P_{Nat}) extern synthetisiert und im Labor gesichert ($pT7\text{blue_}P_{\text{Nat}}\text{-TK101}_{Ksp}$) (siehe Anhang, Abb. 53 für die Sequenz von $P_{\text{Nat}}\text{-TK101}_{Ksp}$). Um sicherzustellen, dass der Promoter für die Expression von *TK101* funktional ist, sollte ein potentiell konstitutiv-exprimierender Promotor für die Kanamycin-Resistenz aus dem Genom von *K. spormannii* ausgewählt werden. Die Wahl fiel auf den Promoter der Aminoacyl-tRNA Synthetase von Methionin (Methionin-tRNA Synthetase (*CVV_00280*); Promoter: P_{Met}). Aminoacyl-tRNA Synthetasen sind als Enzyme,

welche die Aminosäure mit ihren jeweiligen tRNA verknüpfen, essentiell für die Proteinsynthese und müssen daher konstitutiv exprimiert werden. Als Start-Aminosäure eines beinahe jeden Proteins muss die Methionin-tRNA dabei immer in ausreichender Abundanz in der Zelle vorliegen. Um die Funktionalität von P_{Met} (200 bp vor *CVV65_00280*) zu testen, wurde es zusammen mit dem codon-optimierten Gen des thermostabilen Fluoreszenzproteins FFTS-YFP (*fast folding thermostable YFP*) extern synthetisiert und gesichert (Aliye *et al.*, 2015). Die Sequenz des synthetisierten P_{Met} -FFTS-YFP_{Ksp}-Konstrukts ist im Anhang, Abb. 54 gezeigt. *E. coli* pT7blue_ P_{Met} -FFTS-YFP_{Ksp} wurde in LB ohne einen Induktor kultiviert und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen damit durchgeführt. Hierbei konnten die deutlich fluoreszierenden *E. coli*-Zellen die konstitutiven Eigenschaften von P_{Met} belegen (Abb. 41).

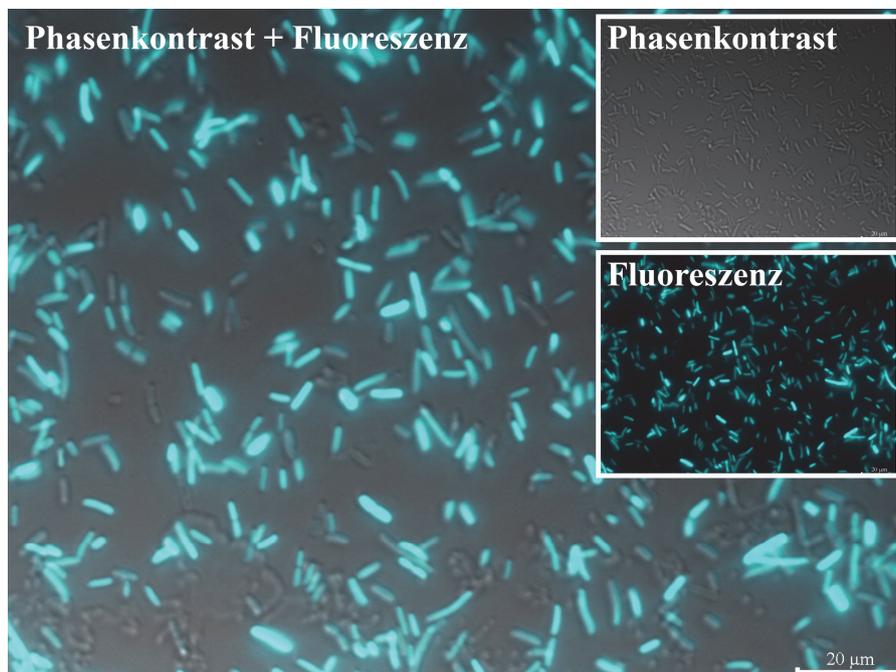


Abb. 41: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* pT7blue_ P_{Met} -FFTS-YFP_{Ksp}.

Anschließend sollte die Plasmide pT7blue_ P_{Nat} -TK101_{Ksp} und pT7blue_ P_{Met} -TK101_{Ksp} in *E. coli* auf ihre Funktion als Kanamycin-Resistenzgen getestet werden. Die Klonierung von pT7blue_ P_{Met} -TK101_{Ksp} wurde in mehreren Schritten durchgeführt. P_{Met} wurde mit den Primern 18 und 19 aus pT7blue_ P_{Met} -FFTS-YFP_{Ksp} und TK101_{Ksp} mit den Primern 17 und 20 aus pT7blue_ P_{Nat} -TK101_{Ksp} amplifiziert. Beide Amplifikate wurden durch eine Fusions-PCR mit den Primern 17 und 19 fusioniert und amplifiziert. Das erhaltene Konstrukt P_{Met} -TK101_{Ksp} wurde nun in den linearisierten pT7-Vektor (durch eine PCR mit Primern 15 und 16) über eine

isothermale *in-vitro* Ligation ligiert. Die beiden Plasmide pT7blue_P_{Nat}-TK101_{Ksp} und pT7blue_P_{Met}-TK101_{Ksp} konnten schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* BL21 transformiert werden. Beide Stämme wurden nun, zusammen mit *E. coli* BL21 WT als Kontrolle, auf ihr Wachstum mit und ohne Kanamycin getestet. Dabei konnte beobachtet werden, dass beide Plasmid-tragenden Stämme in der Lage waren mit Kanamycin zu wachsen, wobei der Stamm mit dem Konstrukt P_{Met}-TK101_{Ksp}, sowohl mit als auch ohne Kanamycin ein deutlich besseres Wachstum zeigte (Abb. 42). Die Kontrolle zeigte erwartungsgemäß kein Wachstum mit Kanamycin.

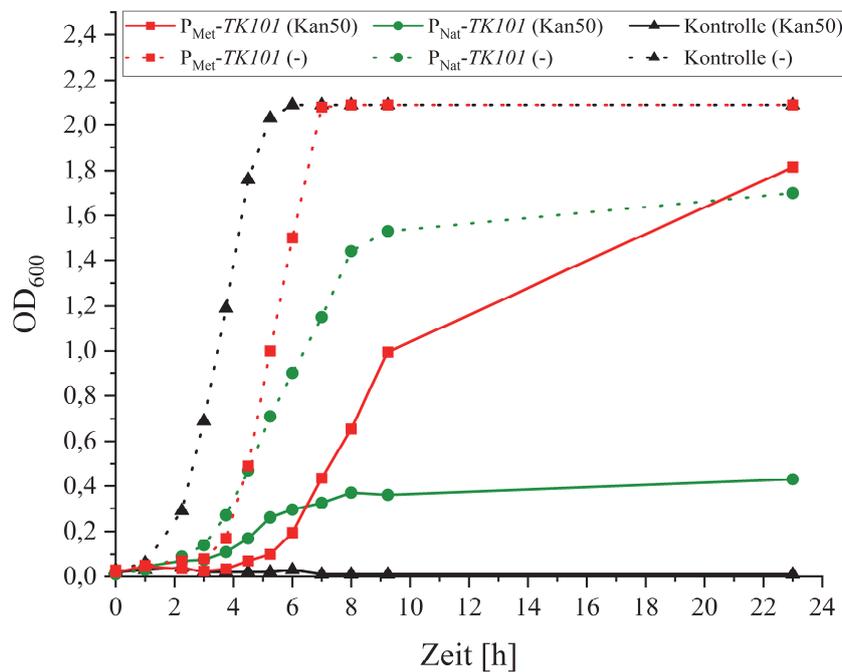


Abb. 42: Wachstumskurven von *E. coli* BL21 pT7blue_P_{Nat}-TK101_{Ksp} und *E. coli* BL21 pT7blue_P_{Met}-TK101_{Ksp} mit 50 µg ml⁻¹ (Kan50) und ohne (-) Kanamycin. Als Kontrolle diente *E. coli* BL21 WT.

3.4.2. Klonierung der Transformationsplasmide

Für die Klonierung der finalen Transformationsplasmide sollten nun die Konstrukte P_{Nat}-TK101_{Ksp} und P_{Met}-TK101_{Ksp} jeweils in die drei verwendeten Vektoren pG1AE, pG2AE und pNW33N kloniert werden. Diese Vektoren besitzen drei unterschiedlichen Replikationsursprünge: pBST1 (pG1AE), pUB110 (pG2AE) und pBC1 (pNW33N). Deren stabile Replikation konnte schon in anderen thermophilen Firmicutes, speziell der Gattung *Geobacillus*, nachgewiesen werden konnte (Kananavičiute und Čitavičius, 2015). Dafür wurden die Vektoren mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten: pG1AE und pG2AE

mit BglIII/ PmeI und pNW33N mit HindIII/EcoR1. Die beiden *TK101*-Konstrukte wurden mit Primern amplifiziert, welche Überhänge zu den jeweiligen geschnittenen Vektoren trugen (Tab. 42). Anschließend wurden die Amplifikate über eine isothermale *in-vitro* Ligation in ihre jeweiligen Ziel-Vektoren ligiert. Die Plasmidkarten der erhaltenen Transformationsplasmide sind im Anhang in Abb. 55, Abb. 56 und Abb. 57 abgebildet.

Tab. 42: Verwendete Primer für die Klonierung der Transformationsplasmide.

Ziel-Vektor	<i>TK101</i> -Konstrukt	Primer-Nr.
pG1AE	P _{Met} - <i>TK101</i> _{Ksp}	21 & 25
	P _{Nat} - <i>TK101</i> _{Ksp}	22 & 25
pG2AE	P _{Met} - <i>TK101</i> _{Ksp}	23 & 25
	P _{Nat} - <i>TK101</i> _{Ksp}	24 & 25
pNW33N	P _{Met} - <i>TK101</i> _{Ksp}	26 & 28
	P _{Nat} - <i>TK101</i> _{Ksp}	27 & 28

3.4.3. Entwicklung eines *host-mimicking* Plasmids

Nahe alle Prokaryoten besitzen ein sogenanntes Restriktions-/Modifikationssystem (R/M-System), dass sie dazu befähigt zwischen eigener und fremder DNA zu unterscheiden. Das R/M-System besitzt dabei zwei Funktionen: die Methylierung der eigenen DNA an spezifischen Basensequenzen und die Restriktion falsch-methylierter DNA (Vasu und Nagaraja, 2013). Es stellt daher oft ein Hindernis in der Entwicklung eines zuverlässigen genetischen Systems dar. Aus diesem Grund wurde auch *K. spormannii* auf ein solches R/M-System hin untersucht, indem die generierten PacBio-Daten der Genomsequenzierung von *K. spormannii* von der REBASE Datenbank analysiert wurden (Roberts *et al.*, 2015; Reiner, Lapp, *et al.*, 2018). Dabei stellte sich heraus, dass *K. spormannii* über ein vollständiges R/M-System des Typs 1 verfügt (REBASE Org#26681). Dieses besteht aus drei Proteinen: Der Methylierungs- (M.KspEA1I), Spezifitäts- (S.KspEA1I) und Restriktions- (KspEA1IP) Untereinheit. Die jeweiligen Gene sind in ihrer genomischen Anordnung in Abb. 43A dargestellt. Eine Methylierung konnte in 99,7 bzw. 99,6 % der genomischen DNA von *K. spormannii* an der Erkennungssequenz -ATCNNNNNRTTG- nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine m6A-Methylierung, bei der das C-Atoms 6 von Adenosin methyliert wird. Die Methylierung an der Erkennungssequenz ist schematisch in Abb. 43B dargestellt.

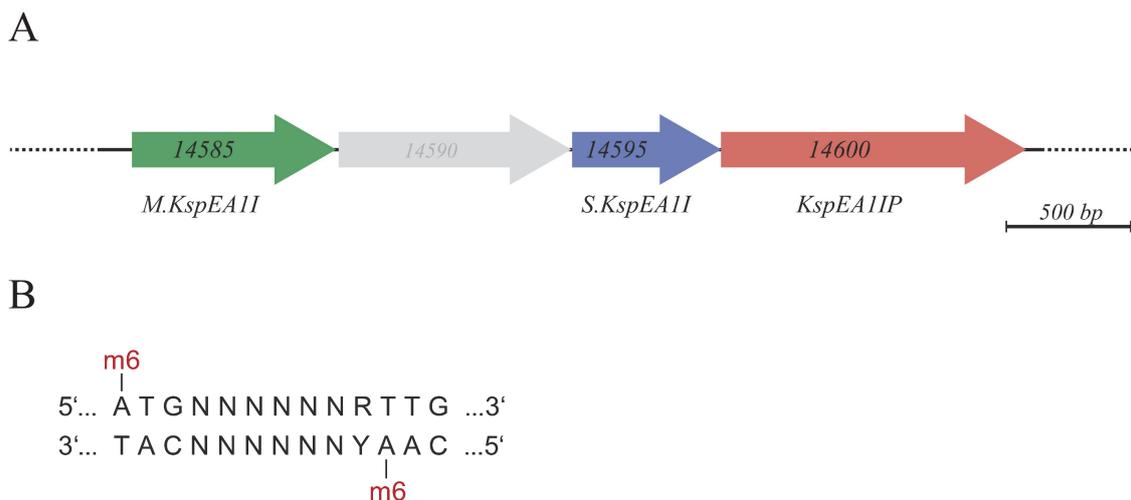


Abb. 43: Restriktions-/Modifikationssystem Typ I von *Kyrpidia spormannii*. A: Darstellung der Gene des R-/M-Systems im Genom von *K. spormannii*: Methylierungsuntereinheit (*M.KspEA1I*), Spezifitätsuntereinheit (*S.KspEA1I*) und Restriktionsuntereinheit (*KspEA1IP*) mit deren jeweiligen Gen-Nummern (als *CVV_XXXXX*). B: Erkennungssequenz des R/M-Systems mit den methylierten Adenosinen (m6A-Methylierung).

Um den Abbau durch dieses R/M-System bei der Transformation in *K. spormannii* zu umgehen, sollte ein sogenanntes *host-mimicking* (engl. für „Wirts-Nachahmung“) System erstellt werden. Dabei wird ein *E. coli* Stamm mit den Methylierungsenzymen des Ziel-Organismus versehen, um Plasmide zu generieren, die dessen Methylierungsmuster besitzen. Um ein solches *host-mimicking*-Plasmid für *K. spormannii* zu erstellen, wurden mehrere Klonierungsschritte durchgeführt, die in Abb. 44 dargestellt sind. Zuerst wurden die Methylierungs- und Spezifitäts-Untereinheit mit den Primern 9 und 10 bzw. 11 und 12 aus der genomischen DNA von *K. spormannii* amplifiziert und über eine Fusions-PCR mit den Primern 9 und 12 fusioniert und amplifiziert. Da eine ausreichende Expression der S-Untereinheit gewährleistet werden sollte, wurde über die Primer-Überhänge eine zusätzliche Ribosomen-Bindestelle zwischen den beiden Genen eingefügt. Das *MS*-Konstrukt wurde daraufhin in einem mit *NcoI* und *PmeI* geschnittenen pBAD202-Vektor über eine isothermale *in-vitro* Ligation ligiert (pBAD-MS). Da der pBAD Vektor einen *high-copy* Ori (*colE1*) besitzt und damit eine zu starke spätere Verdünnung des eigentlichen Transformationsplasmids bei der Plasmidisolation entstehen würde, sollte er durch den *low-copy* Ori des Plasmids pACBSR (p15A) ersetzt und gleichzeitig das Kanamycin-Resistenzgen gegen das Chloramphenicol-Resistenzgen (*chlR*) ausgetauscht werden. Dafür wurde zum einen das Konstrukt p15A-*chlR* mit den Primern 13 und 14 aus pACBSR amplifiziert und zum anderen pBAD-MS mit *BspHI* und *NsiI* geschnitten. Anschließend wurden beide Bestandteile in einer isothermalen *in-vitro* Ligation miteinander ligiert und in den methylierungs-defizienten *E. coli* Stamm HST04 transformiert.

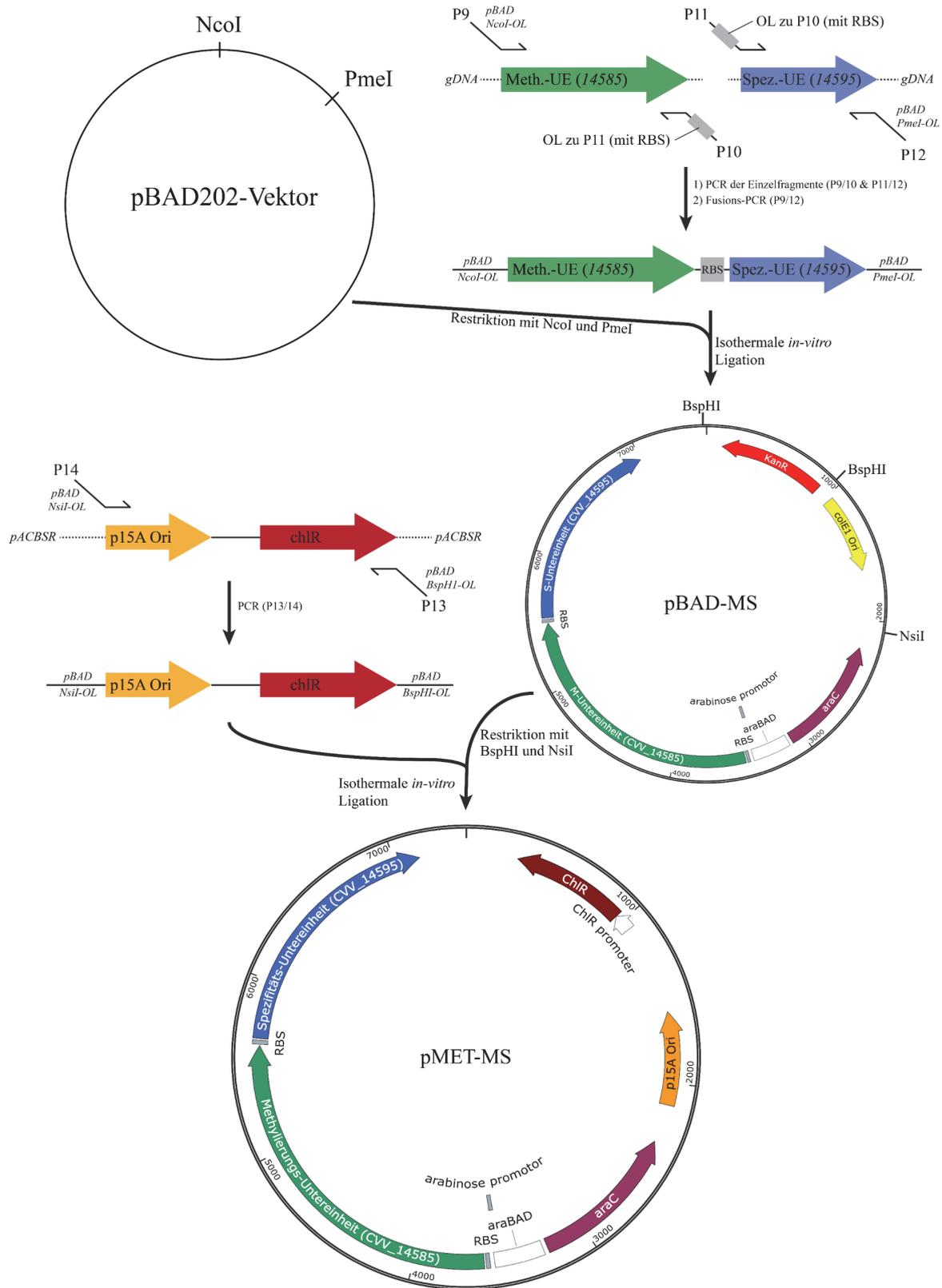


Abb. 44: Schematische Darstellung der Klonierung des Methylierungs- bzw. *host-mimicking*-Plasmids pMET-MS. Die Klonierung erfolgte dabei in zwei Schritten: Zuerst wurden die Methylierungs- und Spezifitäts-Untereinheiten des R-/M-Systems fusioniert und in den Vektor pBAD202 kloniert (pBAD-MS). Anschließend wurde dessen Kanamycin-Resistenzgen (*kanR*) und der *high-copy*-Ori *colE1* durch das Chloramphenicol-Resistenzgen (*chlR*) und den *low-copy*-Ori p15A ersetzt, um schließlich pMET-MS zu erhalten.

Schließlich wurden alle in 3.4.2 erstellten Transformationsplasmide mittels Elektroporation jeweils in den Methylierungsstamm *E. coli* HST04 pMET-MS transformiert. Zur Verifizierung der Methylierungseigenschaft wurde mit einer Auswahl der Stämme (jene mit P_{Nat}-TK101_{Ksp}) ein Dot-Blot Test mit den isolierten Plasmiden durchgeführt. Dabei wird die isolierte Plasmid-DNA auf eine Nitrocellulosemembran gekoppelt und ein Antikörper-Nachweis durchgeführt mit einem Antikörper der spezifisch an m6A-methylierte DNA bindet. Um eine Methylierung der verwendeten Transformationsplasmide zu erreichen, wurde das Methylierungsplasmid pMET-MS während der Kultivierung mit L-Arabinose induziert. Als Kontrolle dienten ein naturgemäß unmethyliertes PCR-Produkt, ddH₂O und die isolierten Plasmide einer nicht-induzierten Kultur. Der Dot-Blot Test zeigte ein deutlich stärkeres Signal der Proben des induzierten Stammes im Vergleich zu den verwendeten Kontrollen (Abb. 45). Dies deutet auf eine größere Menge m6A-methylierter DNA in diesen Proben hin und spricht daher auch für eine erfolgreiche Methylierung der Transformationsplasmide durch das Methylierungsplasmid pMET-MS (Abb. 45). Es ist ebenfalls eine leichte Abstufung in den Intensitäten der induzierten Proben mit den unterschiedlichen Plasmiden zu erkennen (pG1A > pG2A > pNW33N), welche die Anzahl der Erkennungssequenzen in den jeweiligen DNA-Sequenzen widerspiegelt (pG1A: 4, pG2A: 3, pNW33N: 2).

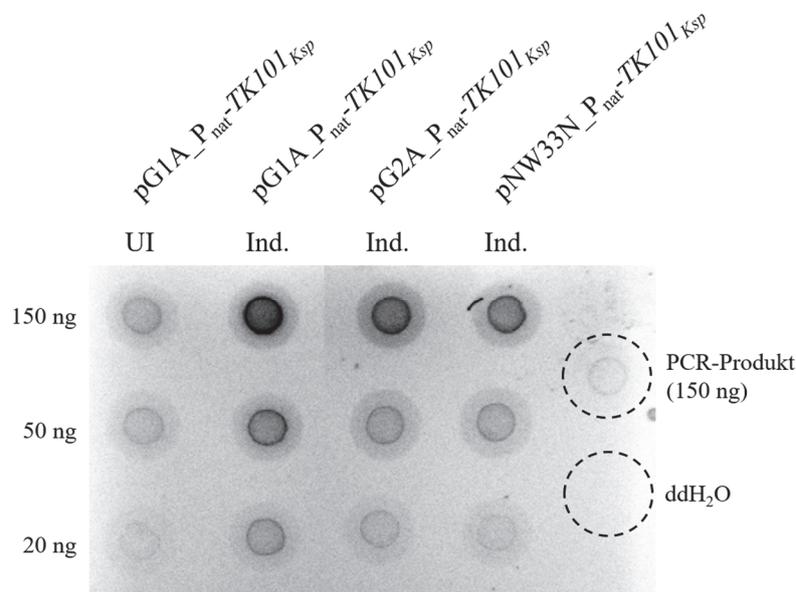


Abb. 45: Dot-Blot Test einiger Transformationsplasmide. Die Nitrocellulosemembran zeigt Plasmide, die in dem Methylierungsstamm durch eine Induktion von pMET-MS methyliert wurden (Ind.). Als Kontrollen wurden die Plasmide eines nicht-induzierten Methylierungsstamms (UI), PCR-Produkt und ddH₂O aufgetragen.

3.4.4. Transformationsversuche

Schlussendlich wurden für die anschließenden Transformationen alle Transformationsplasmide (pG1A_P_{Nat}-TK101_{Ksp}, pG2A_P_{Nat}-TK101_{Ksp}, pNW33N_P_{Nat}-TK101_{Ksp}, pG1A_P_{Met}-TK101_{Ksp}, pG2A_P_{Met}-TK101_{Ksp}, pNW33N_P_{Met}-TK101_{Ksp}) in Stamm HST04 pMET-MS methyliert und isoliert. Insgesamt wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Transformationsmethoden verwendet: Elektroporation, Protoplasten-Transformation und eine auf Sepiolith-basierende Methode.

Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit jeweils 1 µg der isolierten Plasmide durchgeführt und schließlich auf Agarplatten mit und ohne Kanamycin ausplattiert. Es konnte jedoch selbst nach 14 Tagen kein Wachstum auf Platten mit Kanamycin detektiert werden, wohingegen sich nach etwa 3 Tagen die ersten Kolonien auf Platten ohne Kanamycin bildeten.

Protoplasten-Transformation

Die Herstellung der Protoplasten von *K. spormannii* wurde vor der Verwendung für die Transformation mikroskopisch überprüft. Nach einer Inkubationszeit von 22 h in einem osmotisch-stabilisierenden Medium mit Lysozym konnte ein Großteil der Zellen aufgrund ihrer runden Morphologie als Protoplasten identifiziert werden (Abb. 46). Bei einem gewissen Teil konnte dabei auch weiterhin die Zellwand mit den „zusammengezogenen“ Protoplast im Inneren beobachtet werden.

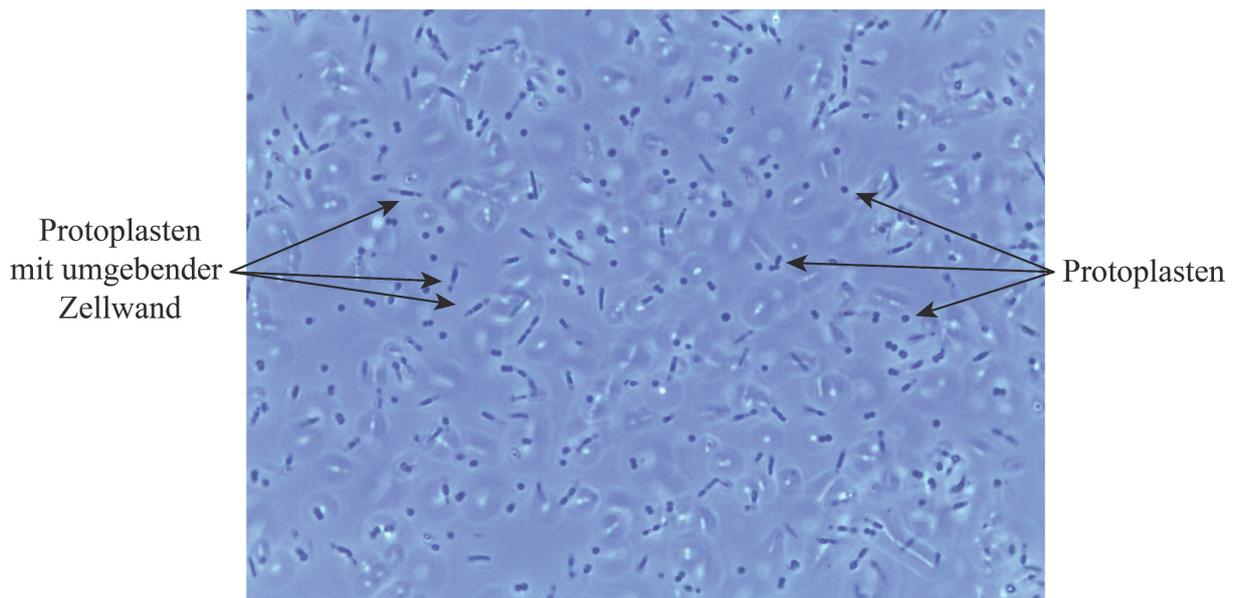


Abb. 46: Phasenkontrast-Mikroskopie der Protoplasten-Generierung in *K. spormannii* nach 22 h.

Die Transformationen wurden mit 2 µg der isolierten Plasmide durchgeführt. Nach einer Regenerationsphase von 24 h wurden die Zellen auf osmotisch-stabilisierten Agarplatten (RR2A_{reg}) mit und ohne Kanamycin ausplattiert. Auf den Platten ohne Kanamycin bildete sich nach ca. 3 Tagen ein Schleim-artiger Rasen, auf dem sich nach ca. 7 Tagen einige distinkte Kolonien bildeten. Die Platten mit Kanamycin zeigten jedoch kein Wachstum.

Sepiolith-basierte Transformation

Für die Sepiolith-basierte Transformation wurden jeweils 1 µg der isolierten Plasmide eingesetzt und die Zellsuspension zusammen mit einer Sepiolith-haltigen Lösung auf Agarplatten mit und ohne Kanamycin unter leichtem Druck ausplattiert. Jedoch konnte auch hier kein Wachstum nach 14 Tagen detektiert werden, sobald Kanamycin als Selektionsmarker verwendet wurde. Auf den Platten ohne Kanamycin konnten nach ca. 5 Tagen die ersten Kolonien beobachtet werden.

IV. Diskussion

Vor dem Hintergrund der heutzutage immer mehr in den gesellschaftlichen Fokus rückenden Auswirkungen des Klimawandels ist die Reduktion der Treibhausgasemissionen eine der größten Herausforderungen unserer Zeit. Daher ist die Entdeckung und Erforschung von Technologien die in der Lage sind diese Emissionen zu verringern von großer Bedeutung. Eine dieser Technologien ist die noch relativ junge mikrobielle Elektrosynthese (MES), bei welcher Biokatalysatoren mithilfe elektrischen Stroms dazu genutzt werden, aus emittiertem CO₂ komplexere Kohlenstoffverbindungen zu synthetisieren. Der 2018 isolierte und als elektroautotroph charakterisierte Mikroorganismus *Kyrpidia spormannii*, vereint dabei viele Eigenschaften die ihn für einen potentiellen Einsatz in einem mikrobiellen Elektrosynthese-Prozess attraktiv machen (Reiner *et al.*, 2020). Es konnte gezeigt werden, dass dieses thermophile Knallgasbakterium in der Lage ist, kathodische Biofilme von beachtlicher Höhe (>100 µm) zu bilden (Hackbarth *et al.*, 2020). Die in dieser Arbeit durchgeführte Adaption zur Optimierung eines elektroautotroph kultivierten kathodischen Biofilms und die anschließende genotypische Beschreibung dieses Stamms sollten dabei Aufschlüsse über die mechanistischen Vorgänge der elektroautotrophen Wachstumseigenschaften von *K. spormannii* geben und mögliche Optimierungsstellen offenlegen. Die Biofilmbildung des adaptierten Stamms konnte im Rahmen dieser Arbeit besonders in Form einer schnelleren initialen Akkumulation und der Homogenität des Biofilms erheblich verbessert werden. Die Analyse der genomischen Variationen im adaptierten Stamm soll im Folgenden mit deren möglichen phänotypischen Auswirkungen diskutiert werden. Außerdem konnten weitere Einblicke in die Polyhydroxybutyrat-Synthese von *K. spormannii* gewonnen und wichtige Schritte hin zu einem genetischen System erfolgreich abgeschlossen werden, die hier noch einmal besprochen werden sollen.

4.1. Generelle Beobachtungen der Variantendetektion

Die Adaption an vorherrschende Umweltbedingungen durch eine natürliche Selektion gilt schon seit dem 19. Jahrhundert, speziell durch die Arbeiten von Charles Darwin, als ein wichtiger Prozess in der Evolution. Eine Adaption geschieht mechanistisch durch die Ausbreitung und den Austausch von Mutationen, welche die Fitness und die Reproduktionsfähigkeit in ihrer Umwelt positiv beeinflussen (Elena und Lenski, 2003). In dieser Arbeit wurde eine Adaption von *K. spormannii* auf elektroautotrophe

Wachstumsbedingungen als kathodischer Biofilm durchgeführt und anschließend die dabei entstandenen genetischen Variationen mit dem Ausgangsstamm (dem Wildtyp) verglichen. Um die natürlich auftretende Mutationsrate dabei weiter zu steigern wurden die Zellen zusätzlich mit UV-Licht, als ein sehr potentes Mutagen, bestrahlt. Unter selektiven Bedingungen, wie in dem hier beschriebenen Adaptionsexperiment, sind hohe Mutationsraten generell von Vorteil, da sie dem Organismus die notwendige genetische Variabilität geben um eine genetische Anpassung zu erleichtern. UV-Licht wird oft eingesetzt, um durch eine zufällige Mutagenese Stämme zu generieren, die beispielsweise toleranter gegenüber toxischen Substanzen sind, oder um die Produktionsrate eines Biokatalysators zu steigern.

Um beurteilen zu können inwieweit UV-induzierte Mutationen zu den beobachteten Basenvariationen beigetragen haben, wurde eine Analyse der Häufigkeit der jeweiligen Basenaustausche gemacht (Abb. 23). Dabei fiel auf, dass die UV-typische Transversion C → T (bzw. G → A, je nach betroffenem Strang), wie sie durch UV-induzierte Pyrimidin-Dimere entstehen, in den beobachteten Mutationen nicht signifikant häufiger vorkamen als andere Basenaustausche (Brash, 2015). Dies war auf diese Art und Weise nicht erwartet worden, könnte jedoch entweder an einer zu geringen UV-Dosis oder an den effizienten Reparaturmechanismen der Zelle gelegen haben. Einen Hinweis auf die Anpassung von Stamm EAD an das höhere Maß an Mutationen (UV-induziert oder natürlich) kann in der Variation des *mfd*- (*mutation frequency decline*) Gens gefunden werden. Als Teil der DNA-Reparaturmechanismen der Zelle löst Mfd die RNA-Polymerase von der DNA, wenn dessen Transkription durch eine DNA-Läsion blockiert wird, woraufhin weitere Proteine der Nukleotidexzisions-Reparatur rekrutiert werden (Selby, 2017). Mfd ist dabei nachweislich wichtig für die Erkennung UV-induzierter DNA-Läsionen, da gezeigt werden konnte, dass Mfd-Mutanten eine höhere Sensivität gegenüber UV-Licht haben (Selby und Sancar, 1993). In *E. coli* führen iterative Bestrahlungen mit UV-Licht zu Mutationen in Proteinen der DNA-Reparatur und damit auch zu einer höheren Resistenz gegenüber UV-Licht (Alcántara-Díaz *et al.*, 2004). Deshalb könnte auch hier die Mutation in Mfd für eine beginnende Anpassung von *K. spormannii* an die UV-Licht Bestrahlungen sprechen. Der spezifischen Mutation in Stamm EAD konnte jedoch anhand von Sequenzanalysen keine spezielle strukturelle Auswirkung zugeordnet werden. Hier müssten weitere Versuche zeigen inwieweit die Mutation einen Einfluss auf die Struktur und die Funktion von Mfd hat.

Eine Beobachtung, die bei der Auswertung der Variationen mit großer Häufigkeit (>33 %) gemacht werden konnte, war neben Variationen die eine Aminosäure-Änderung in einem Protein hervorriefen, das Auftreten von stillen Variationen und Variationen außerhalb von

kodierenden Sequenzen. Die durch synonymen Basenaustausch entstehenden stillen Mutationen galten lange als Mutationen ohne Funktion. In bisherigen Adaptionsversuchen von Mikroorganismen und Phagen konnte jedoch das immer wiederkehrende Auftreten von stillen Mutationen beobachtet werden, die nachgewiesener Weise auch zu einem erhöhten Fitness-Level beitragen (Kashiwagi *et al.*, 2014; Lebeuf-Taylor *et al.*, 2019). Phänotypische Veränderungen durch synonyme Mutationen beruhen dabei meistens auf der Anpassung des Protein-Expressionslevels durch die Stabilität der mRNA oder der Verwendung einer tRNA, die sich in ihrer Abundanz von der vorherigen unterscheidet (Ikemura, 1981; Kudla *et al.*, 2009; Lauring *et al.*, 2012; Kashiwagi *et al.*, 2014). Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil von synonymen Basenaustauschen innerhalb kodierender Sequenzen von 13,6 % deckt sich dabei mit Beobachtungen bisheriger Mutationsexperimente in einigen *E. coli*- oder Hefestämmen (Lang und Desai, 2014). Auch Variationen außerhalb von kodierenden Sequenzen (intergenische Bereiche) konnten in Stamm EAD detektiert werden. Diese wurden schon in früheren Arbeiten als ein wichtiger Teil der Wirts-Adaption von Pathogenen oder der Bildung Antibiotika-resistenterer *Pseudomonas putida* Stämme beschrieben (Hossein Khademi *et al.*, 2019). Dabei spielen sie meist eine Rolle in der Regulation der Genexpression, indem sie regulatorische DNA-Sequenzen, wie Regulatorprotein-Bindestellen, Promotorsequenzen oder Terminatorsequenzen verändern. Zudem können sie auch die 5'- und 3'-UTRs (*untranslated regions*; engl. für untranslatierte Region) der mRNA und damit die Translation beeinflussen.

Neben den Mutationen die jeweils in großer Anzahl in der Population vorkamen, fiel auf, dass die 839 detektierten Variationen mit einer Häufigkeit von über 10 % nur auf 151 Gene verteilt sind. Dabei wurde keine generelle Anhäufung von Mutationen in bestimmten größeren genomischen Bereichen beobachtet, sondern eine punktuelle Häufung in einigen distinkten Genen. Die Einordnung der ermittelten Mutationsraten der hier untersuchten Gene mit den meisten Mutationen pro Gen (Tab. 41; Mutationsraten $2,96 \cdot 10^{-3}$ bis $10,84 \cdot 10^{-3}$) fällt jedoch schwer, da zu diesem Zeitpunkt nicht klar ist, wie viele Generationen Stamm EAD durchlaufen hat. Dieser Wert ist unerlässlich für den Vergleich von Mutationsraten mit vorherigen Experimenten. Die Generationenzahl ist besonders durch das Wachstum als Biofilm schwer zu bestimmen, da eine Abschätzung nur anhand des Biovolumens nicht möglich ist. Die Entstehung von Mutationen in den gleichen Genen innerhalb verschiedener Subpopulationen bildet ein oft beobachtetes, generelles Muster in genetischen Adaptationen an sich verändernde Umweltbedingungen (Barrick *et al.*, 2009; Lang und Desai, 2014; Galen *et al.*, 2015). Da in dieser Arbeit viele der ermittelten Variationen innerhalb dieser Mutations-Hotspots mit einer nahezu identischen Häufigkeit ermittelt werden konnten, deutet dies auf deren Vorhandensein

in der gleichen Subpopulation hin. Ein zufälliges Vorkommen mit der gleichen Häufigkeit kann nahezu ausgeschlossen werden. Oft betreffen solche Mutations-Hotspots nicht direkt funktionelle Aminosäuren, wie solche eines aktiven Zentrums von Enzymen, sondern die strukturellen Domänen eines Proteins, wie Transmembran-, Linker- und Interaktions-Domänen (Sekowska *et al.*, 2016; Lind *et al.*, 2019). Daher akkumulieren solche Mutationen auch meist in spezifischen lokalen Bereichen der kodierenden Sequenz eines Proteins. Diese strukturellen Veränderungen eines Proteins können dessen Funktionen auf vielfältige Weise verändern, von Protein-Protein-Interaktion bis zu Auswirkungen auf katalytische Eigenschaften (Lind *et al.*, 2019). Inwieweit die in dieser Arbeit beobachteten Mutations-Hotspots strukturelle und damit auch funktionelle Auswirkungen auf die Proteine und die jeweilige Subpopulation haben müssen jedoch weitergehende Funktions- und Strukturanalysen der Proteine zeigen.

4.2. Auswirkungen der Varianten auf das elektroautotrophe Biofilmwachstum

In dieser Arbeit wurde das erste Mal die Adaption eines Mikroorganismus an elektroautotrophe Wachstumsbedingungen gezeigt. Hierdurch konnten neue Hinweise für die notwendigen physiologischen Eigenschaften gesammelt werden, die eine optimierte Nutzung eines Biokatalysators in einem mikrobiellen Elektrosynthese-Prozess möglich machen. Die hier erreichte Adaption von *Kyrpidia spormannii* zeigte sich insbesondere an der verbesserten Bildung eines kathodischen Biofilms. Es konnte dabei kein verbessertes Wachstum unter heterotrophen Bedingungen ermittelt werden, weshalb eine Adaption auf die zwischenzeitliche heterotrophe Kultivierung auszuschließen ist (Abb. 20). Speziell in den ersten fünf Tagen der elektroautotrophen Vergleichskultivierung mit dem Wildtyp-Stamm konnte eine ca. 4-fach erhöhte Biofilm Akkumulationsrate festgestellt werden (Abb. 12), zusammen mit einer etwa doppelt so schnellen Bedeckung der Kathodenoberfläche, die in ihrem zeitlichen Verlauf derer der Biovolumenzunahme gleicht (Abb. 11 und Abb. 15). Es muss dabei beachtet werden, dass mit den hier ermittelten Daten die Biovolumenzunahme nicht gleichbedeutend mit dem Biofilmwachstum ist, da ein ausschließlich auf Zellteilung basiertes Wachstum bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Hinweise auf die metabolische Aktivität und damit auf die Zellteilungsfähigkeit des kathodischen Biofilms von *K. spormannii* konnten in dieser Arbeit jedoch durch Live/Dead-Färbungen (Abb. 18 und Abb. 19) und CO₂-Inkorporationsexperimente früherer Arbeiten erbracht werden (Reiner, 2019). Eine weitere Beobachtung, die für beide Biofilme gemacht wurde, war das Erreichen eines ortsspezifischen,

maximalen Biovolumens auf der Kathode (Abb. 11A), das höchstwahrscheinlich den unterschiedlich hohen Strömungsgeschwindigkeiten in der Fließzelle geschuldet ist. Zudem war für beide Biofilme eine Korrelation zwischen der Substratbedeckung und der Biofilm-Akkumulationsrate sichtbar (Abb. 12 und Abb. 15). Diese Beobachtung konnte schon in früheren Arbeiten gemacht werden und wird auf eine Limitation des Elektronentransfers von der Kathode durch den wachsenden Biofilm zurückgeführt (Hackbarth *et al.*, 2020).

4.2.1. Kathodische Biofilmbildung

Bei der Bildung eines Biofilms auf einer Elektrode mit negativer Ladung zeigen sich primär zwei Hauptschwierigkeiten: Zum einen die elektrostatische Abstoßung der Zellen durch ihre ebenfalls negative Oberflächenladung, zum anderen die elektrochemische Produktion von bioziden reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS). Daher wird das Anlegen eines Potentials auch dazu verwendet Biofilme davon abzuhalten Oberflächen zu besiedeln und/oder diese von Oberflächen zu lösen (Sultana *et al.*, 2015). Die kathodische Sauerstoffreduktion zu dem starken Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H_2O_2) stellt in oxischen bioelektrochemischen Systemen daher eine große Herausforderung für die Bildung von Biofilmen dar. Generell sind in elektrochemischen Systemen zwei verschiedene Arten der Sauerstoffreduktion zu beobachten: die 4-Elektronen Reduktion zu H_2O und die 2-Elektronen Reduktion zu H_2O_2 . Aufgrund ihrer elektrokatalytischen Eigenschaften katalysieren in solchen Systemen die häufig – und auch in dieser Arbeit – verwendeten Graphitkathoden vorwiegend die 2-Elektronen Reduktion zu H_2O_2 (Rismani-Yazdi *et al.*, 2008). Babauta und Kollegen konnten eine Entstehung von H_2O_2 schon ab einem Potential von ca. 26 mV vs. SHE messen (Babauta *et al.*, 2013). Obwohl die H_2O_2 -Entstehung in den hier verwendeten Fließzellen nicht eingehend evaluiert wurde, kann unter den verwendeten Parametern (-500 mV vs. SHE) von einer H_2O_2 -Entstehung ausgegangen werden. Ein effizienterer H_2O_2 -Abbau könnte dabei Stamm EAD dazu verholfen haben die Kathode schneller vollständig zu bedecken als der Wildtyp. Ein Indiz für eine Anpassung an oxidativen Stress lieferte die Variation in PerR, dem zentralen Regulatorprotein der oxidativen Stress-Antwort. Dessen Mutation in der strukturell wichtigen Zn^{2+} -Bindestelle könnte eine Auswirkung auf die Effizienz des Abbaus von H_2O_2 haben. Es bleibt jedoch unklar inwieweit der Austausch eines der komplexierenden Cysteine zu einem Phenylalanin hier zur Stabilität des Dimers beigetragen haben könnte. Strukturelle Untersuchungen von PerR in *B. subtilis* zeigen, dass ein Austausch des homologen Cysteins C139 durch Serin zu einem Verlust der Repressorfunktion, ein Austausch durch Aspartat oder Histidin jedoch zu keinem Verlust führt (Mongkolsuk und Helmann, 2002). Im Gegensatz zu

den Aminosäuren Asp und His ist Phe aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften jedoch nicht als typischer Metallligand bekannt (Uversky und Permiakov, 2007). Es sind daher zwei Szenarien denkbar: ein Verlust der Repressorfunktion durch den Verlust des Zn^{2+} -Atoms oder eine verminderte Bindekapazität der PerR-Monomere, was zu einem instabilen Dimer und damit zu einer verminderten Repressoraktivität führen könnte. Gegen den kompletten Verlust der Repressorfunktion spricht jedoch, dass PerR Mutanten von *Bacillus subtilis* zwar resistent gegenüber H_2O_2 sind, aber ein generell verlangsamtes Wachstum zeigen (Faulkner *et al.*, 2012). Diese Beobachtung konnte hier nicht gemacht werden.

Ein weiteres Problem, dass mit der kathodischen Sauerstoffreduktion einhergeht ist die schlechte Beurteilbarkeit der tatsächlichen mikrobiellen Stromdichte, also dem von Zellen aufgenommenem Strom. Ähnlich wie bei Hackbarth und Kollegen, konnte auch hier eine Korrelation zwischen der Bedeckung der Kathode und der beobachteten Stromdichte, sowie $I_{D,mikrobiell}$ ausgemacht werden (Abb. 15 vs. Abb. 16) (Hackbarth *et al.*, 2020). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass ein gewisser Teil der beobachteten Stromdichte, speziell vor der gesamten Bedeckung der Kathode, mit der Reduktion von Sauerstoff erklärt werden kann. Zusammen mit der gesamten Bedeckung und der Bildung eines etwa gleichbleibenden Biovolumens konnte auch hier eine sich stabilisierende Stromdichte verzeichnet werden (Hackbarth *et al.*, 2020). Es besteht jedoch weiterhin die Möglichkeit der – wenn auch langsameren – Diffusion von Sauerstoff durch den Biofilm an die Kathodenoberfläche. Da in diesem Versuch eine verminderte Stromdichte, selbst nach der kompletten Bedeckung der Kathode, für Stamm EAD verzeichnet werden konnte, sollte auch hier die Sauerstoffreduktion mit in die Evaluation der Stromdichten einbezogen werden. Sowohl die Höhenprofile als auch die daraus abgeleiteten Rauheits-Koeffizienten zeigen bei gleichem Biovolumen eine gleichmäßigere Oberfläche des Stamm EAD im Vergleich zum WT (Abb. 11, Abb. 13 und Abb. 14). Eine Erklärung wäre, dass die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs durch den Wildtyp-Biofilm an einigen Stellen geringer ist als in Stamm EAD (Abb. 47). Dies macht die Einordnung der geringeren Stromdichte von Stamm EAD selbst nach der kompletten Bedeckung, auch im Hinblick auf die Evaluation der mikrobiellen Elektronenaufnahme zu einer Herausforderung.

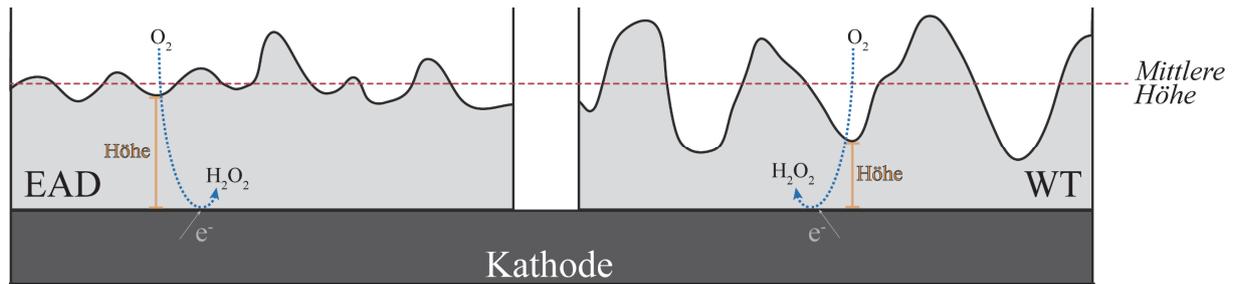


Abb. 47: Schematische Darstellung eines Biofilm-Reliefs von Stamm EAD und dem Wildtyp (WT). Sie zeigt die unterschiedliche kleinste Höhe der Biofilme und die daraus resultierenden Sauerstoff-Diffusionsstrecken.

Eine mögliche Erklärung wie die veränderte Biofilm-Morphologie von Stamm EAD zustande gekommen ist, könnte die veränderte Zusammensetzung der EPS bzw. der Zelloberflächenbeschaffenheit sein. Bisher ist die Zusammensetzung der EPS von *K. spormannii* noch unbekannt. Einzig fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des mit DAPI gefärbten Biofilms lassen das Vorhandensein von extrazellulärer DNA (eDNA) vermuten (Abb. 19). Ein Indiz für eine veränderte EPS in Stamm EAD könnten die Mutationen in *argH* sein, für das in der Variantendetektion die meisten Mutationen pro Gen ermittelt werden konnten. Die Argininosuccinat-Lyase ArgH ist Teil des Harnstoffzyklus und katalysiert dort die Spaltung von Argininosuccinat zu L-Arginin und Fumarat. Sie stellt damit eine wichtige Verbindung des Harnstoffzyklus mit dem Citrat-Zyklus dar. Frühere Arbeiten, die ArgH im Zusammenhang mit der Biofilm-Bildung behandelten, stellten fest, dass Transposon-Mutanten von *argH* in *Staphylococcus aureus* teilweise drastische Auswirkungen auf die Bildung des Biofilms, dessen EPS-Zusammensetzung und die Vitalität der Zellen innerhalb des Biofilms haben (De Backer *et al.*, 2018). Obwohl die genauen mechanistischen Zusammenhänge hier noch nicht geklärt werden konnten, wurde in weiteren Arbeiten gezeigt, dass L-Arginin, als eines der Produkte von ArgH, ebenfalls Auswirkungen auf die Biofilmbildung in *Streptococcus* sp. hat (He *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). L-Arginin ist neben Ornithin, Methionin und Lysin eines der wichtigsten Ausgangssubstrate in der Biosynthese von Polyaminen (PAs), einer Gruppe kleiner Moleküle, die eine Reihe wichtiger zellulärer Aufgaben erfüllen (Miller-Fleming *et al.*, 2015; Michael, 2018). Die häufigsten bakteriellen Polyamine stellen dabei Putrescin und Spermidin dar. Beide spielen eine wichtige Rolle als Signalmolekül für die Regulation zwischen der Bildung eines Biofilms und dem Ausschwärmen einzelner Zellen (engl.: *swarming*). Die Variationen in *argH* könnten daher zu einem veränderten Arginin-Level in Stamm EAD geführt haben und damit die Biofilm-Bildung, die Zusammensetzung der EPS und schlussendlich auch die Morphologie des Biofilms beeinflusst haben.

Eine mögliche Auswirkung auf die Zusammensetzung der EPS bzw. auf die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen in Stamm EAD könnte auch die Variation in MurA2 haben. Die UDP-N-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase MurA katalysiert den ersten Schritt der Peptidoglykan-Biosynthese und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Ausbildung der Zelloberfläche in Gram-positiven Bakterien. MurA hat dabei auch Auswirkungen auf die Biofilmbildung, wie in *Listeria monocytogenes* und *Clostridium difficile* gezeigt werden konnte (Renier *et al.*, 2014; Poquet *et al.*, 2018). In dieser Arbeit konnten *in-vitro* Enzymtests mit den aufgereinigten Protein-Varianten zeigen, dass die Mutation I233N in MurA2 zu einer um 80 % verringerten Aktivität des Enzyms führt (Abb. 31). Dieser Aktivitätsverlust könnte durch die strukturellen und proteinkinetischen Auswirkungen der Mutation I233N, auf die „Scharnier“-Region von MurA2, erklärt werden (Abb. 32). Es bleibt zum jetzigen Zeitpunkt jedoch offen, welche Auswirkungen diese Mutation auf den Biofilm *in-vivo* hat. Es liegt jedoch nahe, dass eine verringerte Dicke der Peptidoglykanschicht um die Zelle zu einer erleichterten Aufnahme gasförmiger Substrate wie CO₂ und O₂ oder anderen Nährstoffen im Biofilm führt. Das würde Zellen die Möglichkeit geben auch in gleichmäßigeren Strukturen noch eine ausreichende Menge an Substraten aufnehmen zu können und die Biofilmoberfläche, wie im Wildtyp beobachtet, nicht weiter erhöhen zu müssen. Die Tatsache, dass dies keinen Wachstumsvorteil bei den getesteten planktonischen heterotrophen und lithoautotrophen (H₂) Wachstumsbedingungen hatte, kann auf eine mehr als ausreichende Substratmenge bzw. den hohen H₂-Partialdruck zurückgeführt werden.

Die in diesem Abschnitt analysierten Variationen, mit potentiellen Auswirkungen auf die kathodische Biofilm-Bildung von *K. spormannii*, zeigen, dass die kathodische Reduktion von Sauerstoff einen wichtigen Punkt in der Optimierung eines MES-Prozesses darstellt. Damit sollte in Zukunft ein Augenmerk auf die H₂O₂-Resistenz von Biokatalysatoren in oxischen MES-Systemen gelegt werden. Eine schnellere Bildung eines Biofilms durch eine effizientere Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies ist dabei nicht nur für den Organismus selbst, sondern auch für die Effizienz des gesamten Prozesses wichtig. So wirkt die schnellere Bedeckung der Kathode wie ein Isolator vor übermäßiger Sauerstoffreduktion und führt damit zu einem geringeren Verluststrom innerhalb des Prozesses (Hackbarth *et al.*, 2020). Außerdem zeigen die Variationen in *argH* und *mutA2*, dass die Bildung und Morphologie des Biofilms auch mit der Anpassung der EPS und der Zellwand an die nicht-natürlichen, elektroautotrophen Bedingungen zusammenhängt. Es könnte sich hier um eine Anpassung an die Diffusionseigenschaften von Substraten, Nährstoffen oder Signalmolekülen innerhalb des Biofilms und durch die Zelloberfläche handeln. Besonders bei Gram-positiven

elektroautotrophen Mikroorganismen mit ihrer dickeren Peptidoglykanschicht könnte solch eine Anpassung von Vorteil sein.

4.2.2. Elektronenaufnahme

Die Elektronenaufnahme elektroautotropher Mikroorganismen kann nach jetzigem Stand in zwei Hauptmechanismen aufgeteilt werden: die direkte und die indirekte Aufnahme von Elektronen. Für die indirekte Aufnahme sind mehrere Elektronenshuttles wie verschiedene Redoxmediatoren oder an der Kathode biotisch oder abiotisch produzierte Stoffe wie H₂ oder Formiat möglich. In *K. spormannii* deuten aktuell mehrere Indizien auf eine Wasserstoffvermittelte Elektronenaufnahme hin. Zum einen scheint eine abiotische Entwicklung von H₂ unter den Kultivierungsparametern (-500 mV vs. SHE; pH 3,5; 60 °C) als sehr wahrscheinlich und zum anderen konnte in Transkriptom-Analysen unter elektroautotrophen Wachstumsbedingungen eine starke Expression der [NiFe]-Hydrogenase nachgewiesen werden (Reiner *et al.*, 2020). Die H₂-Entwicklung wird dabei speziell durch den niedrigen pH-Wert und das potentielle Aufrechterhalten eines niedrigen H₂-Partialdruck angetrieben (Reiner, 2019). Die Kultivierung in den hier verwendeten Fließzellen bietet zudem die Möglichkeit, dass der H₂-Partialdruck durch die hohe Überströmgeschwindigkeit der Kathode am Beginn der Kultivierung weiter verringert wird. Die Involvierung des gasförmigen Substrats H₂ könnte aufgrund seiner Diffusion durch einen Biofilm auch eine Strategie sein, die obersten Schichten des Biofilms (>100 µm) mit einem Elektronendonator zu versorgen.

Inwieweit die elektrochemische Produktion von H₂ in Konkurrenz zur vorher beschriebenen Sauerstoffreduktion zu H₂O₂ an der Kathodenoberfläche steht, ist momentan nicht bekannt. Bei einer gleichzeitigen abiotischen Katalyse von H₂ sowie H₂O₂ könnte ein Wachstumsvorteil für Stamm EAD herrschen, falls die Variation in PerR die postulierte effizientere H₂O₂-Abwehr ermöglicht. Dies könnte auch ein Grund sein, weshalb Stamm EAD in der Lage ist, die Kathode schneller als der Wildtyp und auch schon während des LSVs zu bedecken (Abb. 15). Eine weitere Erklärung dafür könnte die Adaption an wasserstoffoxidierende (hydrogenotrophe) Wachstumsbedingungen bieten, indem *K. spormannii* in der Lage ist bei weitaus niedrigeren H₂-Partialdrücken zu wachsen und damit eine weitere Wasserstoffproduktion, auch für den darüber liegenden Biofilm, antreibt. Dagegen spricht jedoch, dass in dieser Arbeit keine Variationen in dem Hydrogenase-Gencluster oder damit direkt in Verbindung stehenden Genen identifiziert werden konnten. Mögliche Implikationen auf die [NiFe]-Hydrogenase konnten lediglich in potentiellen Ni²⁺-Regulations- und Aufnahmemechanismen gefunden werden. So ist das oben erwähnte PerR auch ein wichtiger Regulator der Metallhomöostase, unter anderem

auch von Nickel, einem der beiden Kofaktoren des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase von *K. spormannii*. Zudem konnte eine stille Mutation in *CVV_14005*, der potentiellen Permease-Untereinheit NikC eines Ni²⁺-Transporters in 99,42 % der Population von Stamm EAD detektiert werden. Obwohl die schlussendlichen Auswirkungen dieser Variationen nicht geklärt werden konnten, sind dies Hinweise auf eine mögliche Unterversorgung des Wildtyps mit Nickel im Biofilm. Da dies eine Biofilm-spezifische Adaption wäre, ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass es keine Auswirkungen auf das rein planktonische hydrogenotrophe Wachstum von Stamm EAD hatte (Abb. 21). Aufgrund seiner guten Redoxaktivität ist Nickel jedoch ein sehr abundanter Kofaktor von Metalloenzymen in der Zelle. Typische Ni²⁺-haltige Enzyme sind Hydrogenasen, CO-Dehydrogenasen, Acetyl-CoA Synthasen und auch Superoxid-Dismutasen (Volbeda und Fontecilla-Camps, 2013). Gerade in *K. spormannii* scheint die Superoxid-Dismutase auch unter elektroautotrophen Bedingungen aufgrund der hohen Belastung mit Sauerstoffradikalen eine wichtige Rolle zu spielen, da sie zu den am höchsten exprimierten Genen zählt (Reiner *et al.*, 2020). Eine mögliche Nickel-Unterversorgung könnte im Biofilm also auch durch dieses Enzym zustande kommen.

Eine weitere Variation, die in dieser Arbeit mit einer hohen Häufigkeit detektiert wurde liegt in dem Gen *CVV_12480*. Dessen Genprodukt scheint Teil eines Heterodisulfid-Reduktase Komplexes in *K. spormannii* zu sein. Lienemann und Kollegen konnten zeigen, dass der gereinigte Heterodisulfid-Reduktase Superkomplex aus dem methanogenen Archaeum *Methanococcus maripaludis* in der Lage ist, Formiat und kleine Mengen H₂ an der Kathodenoberfläche oder in Eisenkorrosions-experimenten zu produzieren (Lienemann *et al.*, 2018). Dieser Superkomplex besteht jedoch aus mehreren Komponenten: dem eigentlichen Heterodisulfid-Reduktase- (HDR-) Komplex, einer Formiat-Dehydrogenase und einer [NiFe]-Hydrogenase. Der Vergleich der [NiFe]-Hydrogenase von *K. spormannii* mit den nächsten homologen bekannten Hydrogenasen verwandter Organismen legt nahe, dass diese nicht in einem solchen Komplex assoziiert ist (Reiner, 2019). Außerdem zeigten Eisenkorrosionsexperimente mit Zellüberstand von *K. spormannii* keinen messbaren Einfluss etwaiger extrazellulärer Enzyme auf die Formiat- oder H₂-Produktion, wie es für *M. maripaludis* gezeigt werden konnte (Lienemann *et al.*, 2018; Reiner, 2019). In dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalysen des HDR-Komplexes legen vielmehr nahe, dass es sich hier um einen eigenständigen cytoplasmatischen Proteinkomplex handelt. Dieser scheint eine Rolle in der Oxidation reduzierter Schwefelspezies zu haben und nicht, wie im Wood-Ljungdahl-Weg methanogener und acetogener Mikroorganismen, mit Wasserstoff als Elektronendonator, die Reduktion von Ferredoxin und den CoB-CoM Heterodisulfid zu katalysieren (Cao *et al.*,

2018; Lienemann *et al.*, 2018). Dieser Hypothese folgend, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *K. spormannii* in der Lage ist mit elementarem Schwefel als reduzierter Schwefelverbindung zu wachsen (Abb. 28). Als möglicher Elektronendonator für *K. spormannii* ist elementarer Schwefel (S^0) selbst in einem mikrobiellen Elektrosynthese Prozess jedoch eher unwahrscheinlich, da schon eine Reduktion des einzigen im Medium enthaltenen Schwefel-Salzes SO_4^{2-} zu Thiosulfat, eine oxidiertere Verbindung als S^0 , eines Potential von etwa -1,7 V vs. SHE bedarf (Salimijazi *et al.*, 2019). Außerdem konnte keine Sulfat-Reduktion zu Sulfid in anderen bioelektrochemischen Systemen bei einem Potential von -400 mV vs. SHE (30 °C, pH 7) nachgewiesen werden (Deutzmann und Spormann, 2017). Es ist bisher jedoch noch unklar, wie die elektrokatalytischen Eigenschaften von SO_4^{2-} in dem hier verwendeten System bei einem Potential von -500 mV vs. SHE (60 °C, pH 3,5) sind. Es könnte sich auch um andere abiotisch oder enzym-katalysierte reduzierte Schwefel-(oxid-) und -Kohlenstoffverbindungen als Elektronen Shuttle handeln. Denn die Substrate des im Cytoplasma lokalisierten HDR-Komplexes sind nicht die eigentlichen Schwefelverbindungen, sondern primär protein-gebundene Sulfan-Schwefelgruppen (RSS_nH) wie Persulfide ($RSSH$), oder Disulfide ($RSSR$), die in bisher noch weitgehend unbekanntem Schritten aus einer Reihe möglicher extrazellulärer Schwefelverbindungen entstehen. Es wird bisher postuliert, dass RSS_nH -Gruppen durch die Reaktion mit extrazellulären Thiolen (z. B. an Cystein-Resten) entstehen und so in die Zelle transportiert werden (Justice *et al.*, 2014). In *Hyphomicrobium denitrificans* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der HDR-Komplex essentiell für die Oxidation von Dimethylsulfid (DMS) ist, dessen Schwefelgruppe protein-gebunden in die Zelle transportiert und dort durch den HDR-Komplex oxidiert wird (Koch und Dahl, 2018). Das postulierte Schema eines solchen möglichen kathodischen Schwefelreduktionsprozesses ist in Abb. 48 dargestellt.

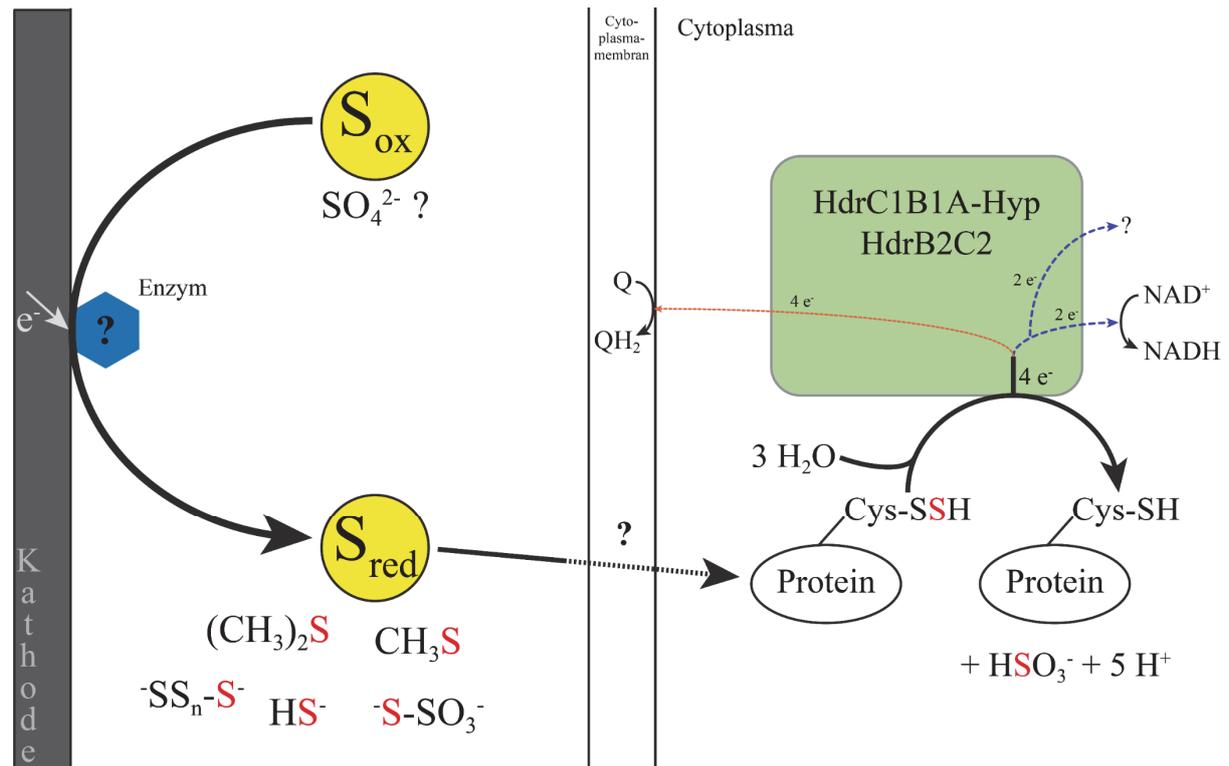


Abb. 48: Schematische Darstellung eines potentiellen schwefel-basierten Elektronenaufnahmemechanismus von *K. spormannii*. Eine oxidierte Schwefelverbindung (S_{ox}) wird mithilfe kathodischer Elektronen zu einer reduzierten Schwefelverbindung (S_{red}) reduziert. Diese werden auf bisher noch unbekannte Weise als Persulfid-Gruppe (-SSH) an den Cysteinrest eines cytoplasmatischen Proteins übertragen. Das Persulfid wird durch den HDR-Komplex zu einer Sulfid-Gruppe (-SH) und Sulfid oxidiert. Der Elektronenakzeptor des HDR-Komplexes ist momentan noch nicht genau geklärt, jedoch wird von NAD^+ oder dem Quinonpool ($Q \rightarrow QH_2$) ausgegangen. Nach Cao *et al.*, 2018.

Die genaue Aufklärung der Rolle der Variation in *CVV_12480* stellt eine weitere Herausforderung dar. Aufgrund von Analysen in *Acidithiobacillus* spp. und *Aquifex aeolicus* wird davon ausgegangen, dass der HDR-Komplex aus fünf Proteinkomponenten (HdrA, HdrB1, HdrC1, HdrB2 und HdrC2) besteht, der an der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. In dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalysen legen dafür die Beteiligung der Genprodukte von *CVV_12500-12480* sowie *CVV12465* an diesem Komplex nahe. Die dazwischen befindlichen potentiellen elektronentransferierenden Flavoproteine (ETFs) *CVV_12475/12470* könnten Teil eines Etf-Quinon Oxidoreduktase Komplexes sein, der Teile der Elektronen aus der Reaktion des HDR-Komplexes in den Quinonpool überträgt (Abb. 48, orangene gestrichelte Linie). Weiterhin wird auch eine potentielle Elektronenbifurkationsreaktion des HDR-Komplexes aufgrund seiner Interaktion mit einem Lipoat-Kofaktor, der spezifisch an diesen Komplex zu binden scheint, angenommen. Durch diesen Kofaktor wird angenommen, dass der HDR-Komplex auch an Reduktion von NAD^+ zu $NADH$ ($E^{0'} = -320$ mV) beteiligt sein könnte. Hierfür wäre dann aufgrund des Redoxpotentials des HSO_3^-/HS^- Redoxpaares ($E^{0'} = -116$ mV)

die Reduktion eines weiteren unidentifizierten Elektronenakzeptors mit einem höheren Potential nötig (Abb. 48, blaue gestrichelte Linie) (Thauer *et al.*, 1977). Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des HDR-Komplexes unter elektroautotrophen Bedingungen kann in den vergleichenden Transkriptomdaten früherer Experimente erkannt werden: so sind die Gene *CVV_12500-12465* unter elektroautotrophen Bedingungen mit einem *log2-fold change* von 0,3-1,7 im Vergleich mit lithoautotrophen Bedingungen mit H₂ als alleinigen Elektronendonator bzw. 3-4,5 unter heterotrophen Bedingungen höher exprimiert (Reiner *et al.*, 2020).

Der bisher am häufigsten beschriebene indirekte Elektronenaufnahmemechanismus für Mikroorganismen in einem MES-Prozess stellt H₂ dar, wobei auch weitere Elektronenshuttle wie Fe²⁺ und Ammonium diskutiert werden. Die in dieser Arbeit postulierte Elektronenaufnahme unter der Beteiligung von Schwefelverbindungen als Elektronenshuttle konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Jedoch konnte der Interspezies-Elektronentransport durch Polysulfid-Verbindungen oder Cystein als Shuttlemoleküle nachgewiesen werden (Tremblay *et al.*, 2017). Zur Oxidation anorganischer Schwefelverbindungen sind neben *K. spormannii* auch weitere potentiell elektrotroph wachsende Mikroorganismen wie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus denitrificans* oder *Sulfurimonas denitrificans* in der Lage. Diese besitzen teilweise ebenfalls den hier für *K. spormannii* beschriebenen HDR-Komplex (Carbajosa *et al.*, 2010; de Campos Rodrigues und Rosenbaum, 2014). So bildet diese Häufung von Schwefeloxidierern ein auffälliges Muster innerhalb der elektrotrophen Mikroorganismen und legt damit auch eine potentielle Beteiligung von Schwefelverbindungen in der Elektronenaufnahme nahe. Zusätzlich ist die Beteiligung von Thiolen wie Cystein denkbar. Das Cystin/Cystein Redoxpaar bietet mit einem Standard-Redoxpotential E⁰ von -348 mV vs. SHE ein elektrochemisch passendes Elektronenshuttle für die meisten MES-Systemen (Kaden *et al.*, 2002). Dabei sind zum einen extrazelluläre Cysteine als Interspezies-Elektronenshuttle, wie sie schon in syntrophischen Gemeinschaften nachgewiesen werden konnten, denkbar (Kaden *et al.*, 2002). Zum anderen ist auch die Beteiligung zelloberflächengebundener Cysteine möglich, wie sie in einer Reihe verschiedener Organismen wie *Listeria monocytogenes* vorhanden sind (Aubry *et al.*, 2009; Pillot *et al.*, 2018).

4.2.3. Kohlenstoffassimilation

Die autotrophe Kohlenstoffassimilation von *K. spormannii* erfolgt über den Calvin-Zyklus. Die dafür notwendigen Proteine und ihre Funktion konnten schon in vorausgehenden Arbeiten identifiziert und ihre Transkription unter litho- und elektroautotrophen Wachstumsbedingungen bestätigt werden (Reiner *et al.*, 2020). Experimente mit ^{13}C -markiertem CO_2 zeigten dessen Einbau in die Biomasse und belegten damit, zusammen mit den Transkriptomdaten, die aktive Rolle des Calvin-Zyklus in der Kohlenstoffassimilation von *K. spormannii*. Bei der Auswertung der Variationen von Stamm EAD in dieser Arbeit wurde das Transketolase-Gen *CVV_14375*, welches unter autotrophen Bedingungen stark hochreguliert ist, als eins der Gene mit der höchsten Mutationsrate identifiziert. Als Teil des reduktiven Pentose-Phosphat-Wegs im Calvin-Zyklus könnten diese Mutationen auch Auswirkungen auf die CO_2 -Fixierungsleistung in Stamm EAD und damit auf sein Wachstum haben. Die Regulation des Calvin-Zyklus und der CO_2 -Assimilationsrate ist eng mit dem Pentose-Phosphat-Weg verknüpft, da dieser in verschiedenen Zuckelumformungsreaktionen schlussendlich Ribulose-5-Phosphat synthetisiert, die Vorstufe des RuBisCO-Akzeptormoleküls Ribulose-1,5-Bisphosphat. Weiterhin spielen Intermediate des reduktiven Pentose-Phosphat-Wegs eine wichtige Rolle als Ausgangspunkt für die Synthese verschiedener Aminosäuren und Nukleotide (Antonovsky *et al.*, 2016). Bei der heterologen Expression der Enzyme des Calvin-Zyklus in *E. coli* konnte in Adaptionsexperimenten an autotrophes Wachstum gezeigt werden, dass erst die Einführung einiger Mutationen in Teilen des Pentose-Phosphat-Wegs eine effiziente CO_2 -Fixierung möglich machten (Antonovsky *et al.*, 2016; Herz *et al.*, 2017; Gleizer *et al.*, 2019). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Feineinstellungen in der Kontrolle des Pentose-Phosphat-Wegs essentiell für eine effiziente CO_2 -Fixierung sind. Daher wird auch für die in dieser Arbeit ermittelten Variationen der Transketolase von einer Auswirkung auf die Regulation des reduktiven Pentose-Phosphat-Wegs ausgegangen. Dies könnte einen effizienteren Calvin-Zyklus und damit eine effizientere CO_2 -Fixierung von Stamm EAD bewirkt haben.

4.3. Die PHB-Biogenese in *Kyrpidia spormannii*

Das Biopolymer Polyhydroxybutyrat stellt ein interessantes Produkt eines mikrobiellen Elektrosyntheseprozesses dar, der allein auf den kostengünstigen Ressourcen CO₂ und elektrischem Strom beruht. Dabei ist es unabdingbar die einzelnen Komponenten und die Regulation der PHB-Biogenese des Biokatalysators zu analysieren. Für *K. spormannii* konnte bisher über einen visuellen Nachweis die Bildung intrazellulärer PHB-Granula gezeigt werden, welche dieser unter den bisher getesteten heterotrophen, wie auch autotrophen, Wachstumsbedingungen bildet. Anhand von Sequenzanalysen konnten auch die an der PHB-Synthese beteiligten Gene, *phaA* sowie *phaRBC*, identifiziert werden. Vergleichende Transkriptomdaten zeigten außerdem, dass diese unter elektroautotrophen Bedingungen höher exprimiert sind, als unter heterotrophen oder lithoautotrophen Bedingungen mit H₂ (Reiner *et al.*, 2020). Aufgrund der Tatsache, dass der Energie- und Kohlenstoffspeicher PHB besonders unter nährstofflimitierenden Bedingungen synthetisiert wird, wurde daher auch von einer Nährstoffunterversorgung des Biofilms bzw. einzelner Bereiche davon ausgegangen (Reiner, 2019). In Stamm EAD konnten ebenfalls intrazelluläre Granula in den Zellen mithilfe von Nilrot-Färbungen des Biofilms nachgewiesen werden (Abb. 18). Die Variantenanalyse zeigte jedoch keine Variationen in den beteiligten PHB-Synthesegenen. Es scheint also kein oder ein zu geringer evolutionärer Druck geherrscht zu haben, diese Gene an die elektroautotrophen Bedingungen anzupassen. Ob dies nun aufgrund einer verbesserten Nährstoffversorgung des adaptierten Biofilms oder durch Variationen des generellen Stoffwechsels nicht detektiert werden konnte, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

In dieser Arbeit sollten noch weitere potentielle Gene der PHB-Biogenese detektiert werden, um ein besseres Verständnis über den Aufbau von PHB in *K. spormannii* zu erhalten. Durch Sequenz- und Strukturanalysen kodierender Sequenzen vor den PHB-Synthesegenen *phaRBC* konnten zwei weitere potentielle Gene der PHB-Biogenese identifiziert werden: das Gen des Regulatorproteins PhaQ und des Strukturproteins PhaP. Während *phaQ* (CVV_08505) noch über Sequenzanalysen identifiziert werden konnte, zeigte das Strukturprotein PhaP (CVV_08500) keine Sequenzhomologien zu bisher bekannten Phasinen. Generell haben Phasine teilweise nur eine geringe Sequenzähnlichkeit untereinander (Mezzina und Pettinari, 2016). Im Gegensatz dazu besitzen sie sehr distinkte Sekundärstrukturen, die von einer Vielzahl von α -Helices gekennzeichnet sind, wie sie auch für PhaP aus *K. spormannii* ermittelt werden konnten (Abb. 37). Außerdem zeigten vorhergesagte 3D-Rekonstruktionen von CVV_08500 eine phasin-typische Tertiärstruktur mit einer homologen hydrophoben Oberflächen-

beschaffenheit zu dem bereits strukturell analysierten PhaP aus *Aeromonas hydrophila* (Abb. 38). Der Aufbau des ermittelten Genclusters gleicht in seinen Bestandteilen dem aus *B. subtilis*, jedoch mit einer unterschiedlichen Anordnung. So sind die beiden mutmaßlich bi- bzw. polycistronischen Genabschnitte für *phaQP* und *phaRBC* nicht in entgegengesetzte Richtungen (*B. subtilis*), sondern in die gleiche Richtung orientiert (Abb. 36 und Abb. 39, siehe unten). Ein solcher Aufbau eines PHB-Synthese-Genclusters wurde bisher noch nicht beschrieben. Ob, und wenn ja, welche Auswirkungen diese veränderte Gen-Anordnung auf die PHB-Biogenese hat, kann hier jedoch nicht beantwortet werden. Da die beiden regulatorischen DNA-Sequenzen, die sich meist vor den jeweiligen Genen befinden, in *K. spormannii* nicht in der gleichen nicht-kodierenden Sequenz liegen, könnte dies Auswirkungen auf die Regulation der Transkription der Gene haben.

PHB-Synthese Gencluster *K. spormannii*



Abb. 39: Schematische Darstellung des potentiellen PHB-Synthese Genclusters in *K. spormannii*. *phaP* – Phasin; *phaQ* – Regulatorprotein; *phaR* – Regulatorprotein und Teil der PHA-Synthaseeinheit; *phaB* – Acetoacetyl-CoA Reduktase; *phaC* – PHA-Synthase. Die jeweiligen Gennummern sind als CVV_XXXXX aus *K. spormannii* angegeben.

Da bisher zudem noch keine sichere Aussage über die tatsächliche Funktionalität der Gene in der Bildung von PHB gemacht werden konnte, wurde das gesamte Gencluster, zusammen mit dem potentiellen Gen für PhaA (*CVV_10615*), heterolog in *E. coli* exprimiert. Durch eine Nilrot-Färbung zeigten sich in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen klare intrazelluläre Granula (Abb. 40). Diese intrazellulären Strukturen konnten durch eine PHB-Aufreinigung und eine anschließende HPLC-basierte Nachweismethode des PHB-Monomers Crotonsäure, eindeutig als Polyhydroxybutyrat identifiziert werden. Der ermittelte PHB-Anteil an der Zelltrockenmasse von 9,6 % liegt dabei teilweise deutlich unter den bereits erreichten Werten die bei der Expression anderer PHB-Synthesegene aus Gram-positiven Organismen wie *Bacillus* oder *Streptomyces* sp. in *E. coli* nachgewiesen werden konnten (24-83 % (w/w) PHB in der Zelltrockenmasse) (Balakrishna Pillai *et al.*, 2018). Jedoch muss beachtet werden, dass im Gegensatz zu dieser Arbeit, in den dortigen Experimenten die Gene aus anderen mesophilen Organismen verwendet wurden und stark optimierte Wachstumsbedingungen zu diesen

Ergebnissen geführt haben. Dazu zählen Anpassungen wie die verbesserte Nährstoffzusammensetzung des Mediums, die Kohlenstoffquelle und die Sauerstoffzufuhr. Nichtsdestotrotz konnte das Hauptaugenmerk dieses Teils der Arbeit, mit dem Beweis der Funktionalität der ermittelten PHB-Synthesegene in *E. coli*, erfolgreich abgeschlossen werden. Dies stellt eine wichtige Grundlage zur weiteren Erforschung des Genclusters in *K. spormannii* dar. Hier wäre speziell das Wissen über die exakte Aufgabe jeder einzelnen Komponente von Vorteil, um ein besseres Verständnis der PHB-Synthese in *K. spormannii* zu erhalten. Weiterhin ist es nicht gelungen die PHB-Depolymerase zu identifizieren, welche für den Abbau des PHBs verantwortlich ist. Dies stellt eine Herausforderung dar, da sie, ähnlich wie Phasine, keine typischen sequenzspezifischen Homologien zu anderen beschriebenen PHB-Depolymerase besitzen müssen und auch in ihren Proteindomänen anderen α/β -Hydrolasen der Zelle gleichen (Tseng *et al.*, 2006; Jendrossek *et al.*, 2013). Speziell für einen späteren PHB-Syntheseprozess sind PHB-Depolymerase Mutanten von großem Interesse, da sie, wohl aufgrund des fehlenden Abbauenzym, einen vielfach höheren PHB-Anteil erreichen können.

4.4. Evaluation der Transformations-Experimente

Die Entwicklung eines genetischen Systems wird als ein unerlässlicher Schritt zur Verbesserung eines Biokatalysators angesehen. So können damit Aufschlüsse über die zugrundeliegenden Mechanismen der Substrataufnahme und -Umsetzung gewonnen, aber auch eine Erweiterung des Produktspektrums erreicht werden. Speziell für die momentan erforschten, potentiellen Biokatalysatoren für mikrobielle Elektrosyntheseprozesse fehlt oftmals solch ein System, weswegen nur für einige wenige davon funktionelle Studien einen Einblick in die mikrobiellen Mechanismen der Elektrosynthese geben konnten (Gregory *et al.*, 2004; Lohner *et al.*, 2014). Hinzu kommt, dass in keinem dieser Mikroorganismen bisher durch genetische Manipulation das Produktspektrum erweitert werden konnte. Dies liegt jedoch auch an der Verwendung vieler acetogener und methanogener Organismen, deren starke Verknüpfung des Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels eine Weiterentwicklung hin zu gänzlich anderen Produkten als kurzkettige Kohlenstoffverbindungen, wie Methan, Acetat oder Butyrat, fast unmöglich erscheinen lässt. In dieser Arbeit sollte ein genetisches System für den elektroautotrophen Mikroorganismus *K. spormannii* entwickelt werden. Damit sollten die gewonnenen Erkenntnisse des Adaptionsexperiments über mögliche Substrataufnahmemechanismen und die Produktbildung dazu genutzt werden, sowohl ein Verständnis dafür zu bekommen, was *K. spormannii* dazu befähigt elektroautotroph zu wachsen, aber auch zu

verstehen wie die PHB-Synthese genau von statten geht. Außerdem ist es in *K. spormannii* verhältnismäßig einfach die Produktpalette neben PHB zu erweitern, da in dessen elektroautotrophen Metabolismus die Kohlenstoffassimilation (Calvin-Zyklus) weitestgehend entkoppelt ist vom Energiestoffwechsel (oxidative Phosphorylierung) (Reiner *et al.*, 2020).

Wie in Abschnitt 3.4 bereits erwähnt, kann die Entwicklung eines genetischen Systems eine große Herausforderung darstellen. So muss für die meisten Organismen ein zugeschnittenes System entwickelt werden, das auf deren genetischen Gegebenheiten und die Wachstumsbedingungen angepasst ist. Dazu zählen die Verwendung bevorzugter tRNA-Codons (*codon usage*), der Schutz vor dem R/M-System, die Kompatibilität der Replikationsursprünge, die Transformationsmethode und die Funktionalität aller Komponenten bei den Wachstumsbedingungen des Ziel-Organismus. In dieser Arbeit wurden all diese möglichen Probleme für die Entwicklung eines genetischen Systems in *K. spormannii* versucht zu adressieren. So wurde eine für *K. spormannii* codon-optimierte Version des Kanamycin-Resistenzgens (*kanR*) *TK101* verwendet, welches bis zu einer Temperatur von 70 °C funktional ist (Liao und Kanikula, 1990). Es handelt sich dabei um eine thermostabile Variante des mesophilen *kanR* aus pUB110. Um mögliche Komplikationen mit dem potentiell nicht-funktionalen nativen *TK101*-Promotors (P_{Nat}) zu umgehen, wurde mit dem Promotor der Methionin-tRNA Synthetase (P_{Met}) zudem ein konstitutiv exprimierender Promotor aus *K. spormannii* verwendet. Eine Kopplung dieses Promotors an das Fluoreszenzprotein FFTS-YFP und die anschließende Expression dieses Konstruktes in *E. coli* konnte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen die Konstitutivität des Promotors belegen (Abb. 41). Weiterhin konnten auch Wachstumskurven beider Promotoren mit *TK101* in *E. coli* deren generelle Funktionalität bei einer Selektion auf Kanamycin zeigen, wobei $P_{\text{Met}}\text{-TK101}$ sogar zu einem besseren Wachstum in *E. coli* führte (Abb. 42). Die drei Vektoren, die für die Herstellung der Transformationsplasmide dienten, wurden anhand ihrer verschiedenen Replikationsursprünge (Oris) ausgewählt. Die stabile Replikation des pBST1- (pG1AE), des pUB110- (pG2AE), sowie auch des pBC1- (pNW33N) Oris konnten in anderen thermophilen Firmicutes, speziell der Gattung *Geobacillus*, nachgewiesen werden (Kananavičiute und Čitavičius, 2015). Da diese die phylogenetisch am nächsten verwandte Gruppe von *K. spormannii* darstellen, für die ein genetisches System etabliert ist, wurden diese Oris in dieser Arbeit verwendet. Die Entwicklung des *host-mimicking*-Plasmids pMET-MS, auf der Basis des identifizierten Typ I R/M-Systems, konnte ebenfalls erfolgreich abgeschlossen werden. So zeigte der Dot-Blot Test mit einem α -m6A-Antikörper von *in-vivo* methylierten und isolierten Plasmiden eine deutliche Signalsteigerung im Vergleich zu der nicht-methylierten

DNA der Kontrollen. Diese Beobachtung könnte zwar noch über einen HPLC-basierten Nachweis der einzelnen methylierten Nukleotide erfolgen, wurde in dieser Arbeit jedoch als Beweis für die korrekte Methylierung angenommen. Damit sollten die Plasmide nicht durch das R/M-System von *K. spormannii* abgebaut werden.

Die durchgeführten Transformationsversuche mit den methylierten Transformationsplasmiden führten jedoch nicht zu der Bildung distinkter Kolonien während der Selektion auf Kanamycin-Platten und damit mutmaßlich auch nicht zu einer stabilen Replikation der transformierten Plasmide. Die Herausforderung in der Bestimmung der Ursache liegt vor allem darin, dass bei der Entwicklung eines solchen Systems eine Reihe an Gründen in Frage kommt. Durch die vorhergehenden Versuche können jedoch ein funktionsunfähiges Kanamycin-Resistenzgen, sowie ein Abbau der Fremd-DNA in *K. spormannii* nahezu ausgeschlossen werden. Es könnte jedoch eine Inkompatibilität der verwendeten Oris vorliegen. Hier sollten in Zukunft auch andere Oris oder eine direkte genomische Integration der Fremd-DNA in Betracht gezogen werden. Weiterhin sollten auch die verwendeten Transformationsmethoden weiter optimiert bzw. weitere, wie die Transformation mittels Konjugation, getestet werden. Generell gelten thermophile Gram-positive Mikroorganismen als eher schwer transformierbar, was besonders auf ihre dicke Peptidoglykanschicht und die niedrige Plasmamembran-Permeabilität zurückzuführen ist (Kananavičiute und Čitavičius, 2015). Daher ist hier besonders viel Optimierung nötig um eine verlässliche Transformationsmethode zu entwickeln. Aufgrund der Variation in *murA2* und einer damit einhergehenden potentiellen dünneren Zellwand, würde sich auch der hier generierte *K. spormannii* Stamm EAD für zukünftige Transformationsversuche anbieten.

4.5. Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführte Adaption von *Kyrpidia spormannii* an elektroautotrophe Wachstumsbedingungen zeigt das Potential auf, welches dieser Biokatalysator für einen biotechnologischen Prozess besitzt. So konnte eine um ein Vielfaches schnellere Biofilm-Akkumulation und komplette Bedeckung der Kathode durch den adaptierten Stamm beobachtet werden. Diese Beobachtung schließt auch die Tatsache ein, dass *K. spormannii* mutmaßlich in der Lage wäre, selbst bei höheren Potentialen zu wachsen, womöglich aufgrund der schon früh (während des LSVs) einsetzenden H₂-Entstehung oder anderer, bisher unbeachteter Elektronenaufnahmemechanismen, wie dem hier postulierten Mechanismus, der auch Schwefelverbindungen als Redoxshuttle miteinbezieht. Bisher könnte diese frühe Bedeckung der Kathode für den Wildtyp aufgrund der zusätzlichen Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies ein Problem gewesen sein. Das Wachstum bei einem höheren Arbeitspotential würde auch den Energieverbrauch und damit die Kosten des Prozesses in Zukunft senken. Durch die Wahl eines geeigneteren Kathodenmaterials oder durch Oberflächenmodifikationen könnte hier eine Optimierung der Sauerstoffreduktion hin zu einer 4-Elektronen-Reduktion zu Wasser erfolgen. Diese stellt im Gegensatz zu der Entstehung von H₂O₂ kein Wachstumshindernis für Mikroorganismen dar.

Weiterhin ist es für einen mikrobiellen Elektrosynthese-Prozess mit *K. spormannii* bei dem PHB das Endprodukt darstellt wichtig, die PHB-Biogenese noch besser aufzuklären, nachdem hier weitere wichtige Proteine identifiziert und die Funktionalität des *phaPQRBC*-Genclusters experimentell bestätigt werden konnte. Dazu gehören vor allem die Aufklärung der PHB-Regulationsmechanismen, aber auch die Identifikation der PHB-Depolymerase.

Ein essentieller Punkt für zukünftige Experimente mit *K. spormannii* stellt die Entwicklung eines genetischen Systems dar. In dieser Arbeit konnten zwar wichtige Vorarbeiten, wie die Konstruktion eines funktionalen *host-mimicking*-Systems, erbracht werden, jedoch kein endgültiger Transformations-Nachweis. Hierfür stellt in Zukunft die Optimierung der Transformationsmethoden die womöglich größte Herausforderung dar. Durch ein genetisches System würden sich jedoch mehrere Möglichkeiten im Hinblick auf die Erweiterung des Produktspektrums von *K. spormannii* und die Aufklärung der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen des Prozesses sowie deren Optimierung eröffnen.

Aufgrund der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse können mehrere Bereiche mit Optimierungsbedarf adressiert werden. So kann davon ausgegangen werden, dass eine gewisse

Limitation von Substraten und Nährstoffen innerhalb des Biofilms herrscht. Hier könnten eine optimierte Nährstoffzusammensetzung oder die Entwicklung einer dem Biofilm angepassten EPS bzw. Zellwand, wie sie sich potentiell in Stamm EAD gebildet hat, einen Vorteil bringen. Außerdem könnten genetische Manipulationen die Möglichkeit eröffnen die Elektronenaufnahmemechanismen in elektroautotrophen Mikroorganismen und im speziellen von *K. spormannii* weiter aufzuklären. Beispielsweise würde eine *knock-out* Mutante der Hydrogenase einen wichtigen Hinweis darauf geben, ob die H₂-Oxidation der einzige Elektronenaufnahmeweg ist oder ob weitere Mechanismen eine Rolle spielen. Schlussendlich könnte auch die Überexpression wichtiger Schlüsselenzyme der Substratumsetzung und der Produktbildung, wie der Hydrogenase, der RuBisCO oder der PHB-Synthesegene, dazu führen *K. spormannii* zu einem noch produktiveren Biokatalysator für einen potentiellen mikrobiellen Elektrosyntheseprozess zu machen.

V. Literaturverzeichnis

- Aiken, D.C., Curtis, T.P., and Heidrich, E.S. (2019) Avenues to the financial viability of microbial electrolysis cells [MEC] for domestic wastewater treatment and hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* **44**: 2426–2434.
- Alcántara-Díaz, D., Breña-Valle, M., and Serment-Guerrero, J. (2004) Divergent adaptation of *Escherichia coli* to cyclic ultraviolet light exposures. *Mutagenesis* **19**: 349–354.
- Aliye, N., Fabbretti, A., Lupidi, G., Tsekoa, T., and Spurio, R. (2015) Engineering color variants of green fluorescent protein (GFP) for thermostability, pH-sensitivity, and improved folding kinetics. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 1205–1216.
- Alves, M.I., Macagnan, K.L., Rodrigues, A.A., De Assis, D.A., Torres, M.M., De Oliveira, P.D., et al. (2017) Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. *Ind Biotechnol* **13**: 192–208.
- Amils, R. (2011) Chemoautotroph. In, *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 288–289.
- Antonovsky, N., Gleizer, S., Noor, E., Zohar, Y., Herz, E., Barenholz, U., et al. (2016) Sugar Synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*. *Cell* **166**: 115–125.
- Aresta, M., Dibenedetto, A., and Angelini, A. (2014) Catalysis for the valorization of exhaust carbon: From CO₂ to chemicals, materials, and fuels. technological use of CO₂. *Chem Rev* **114**: 1709–1742.
- Arinda, T., Philipp, L.-A., Rehnlund, D., Edel, M., Chodorski, J., Stöckl, M., et al. (2019) Addition of Riboflavin-Coupled Magnetic Beads Increases Current Production in Bioelectrochemical Systems via the Increased Formation of Anode-Biofilms. *Front Microbiol* **10**: 126.
- Aryal, N., Tremblay, P.-L., Lizak, D.M., and Zhang, T. (2017) Performance of different *Sporomusa* species for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide. *Bioresour Technol* **233**: 184–190.
- Aubry, S., Burlina, F., Dupont, E., Delaroche, D., Joliot, A., Lavielle, S., et al. (2009) Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. *FASEB J* **23**: 2956–2967.
- Aulenta, F., Catapano, L., Snip, L., Villano, M., and Majone, M. (2012) Linking bacterial metabolism to graphite cathodes: Electrochemical insights into the H₂-producing capability of *Desulfovibrio* sp. *ChemSusChem* **5**: 1080–1085.
- Babauta, J.T., Nguyen, H.D., Istanbulu, O., and Beyenal, H. (2013) Microscale gradients of oxygen, hydrogen peroxide, and pH in freshwater cathodic biofilms. *ChemSusChem* **6**: 1252–1261.
- De Backer, S., Sabirova, J., De Pauw, I., De Greve, H., Hernalsteens, J.-P., Goossens, H., and Malhotra-Kumar, S. (2018) Enzymes Catalyzing the TCA- and Urea Cycle Influence the Matrix Composition of Biofilms Formed by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Microorganisms* **6**: 113.
- Bajracharya, S., ter Heijne, A., Dominguez Benetton, X., Vanbroekhoven, K., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B., and Pant, D. (2015) Carbon dioxide reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel

- as a cathode. *Bioresour Technol* **195**: 14–24.
- Bajracharya, S., Srikanth, S., Mohanakrishna, G., Zacharia, R., Strik, D.P., and Pant, D. (2017) Biotransformation of carbon dioxide in bioelectrochemical systems: State of the art and future prospects. *J Power Sources* **356**: 256–273.
- Bajracharya, S., Vanbroekhoven, K., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B., and Pant, D. (2017) Bioelectrochemical conversion of CO₂ to chemicals: CO₂ as a next generation feedstock for electricity-driven bioproduction in batch and continuous modes. *Faraday Discuss* **202**: 433–449.
- Balakrishna Pillai, A., Jaya Kumar, A., and Kumarapillai, H. (2018) Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* and EDTA–microwave-assisted cell lysis for polymer recovery. *AMB Express* **8**: 230–241.
- Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N.E., and Milo, R. (2010) Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 8889–8894.
- Bar-Even, A., Noor, E., and Milo, R. (2012) A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens. *J Exp Bot* **63**: 2325–2342.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. (2001) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2nd edition), New York: Wiley.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 168–207.
- Barrick, J.E., Yu, D.S., Yoon, S.H., Jeong, H., Oh, T.K., Schneider, D., et al. (2009) Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**: 1243–1247.
- Bauer, A., Wagner, M., Saravia, F., Bartl, S., Hilgenfeldt, V., and Horn, H. (2019) In-situ monitoring and quantification of fouling development in membrane distillation by means of optical coherence tomography. *J Memb Sci* **577**: 145–152.
- Beese-Vasbender, P.F., Grote, J.-P., Garrelfs, J., Stratmann, M., and Mayrhofer, K.J.J. (2015) Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon. *Bioelectrochemistry* **102**: 50–55.
- Beese-Vasbender, P.F., Nayak, S., Erbe, A., Stratmann, M., and Mayrhofer, K.J.J. (2015) Electrochemical characterization of direct electron uptake in electrical microbially influenced corrosion of iron by the lithoautotrophic SRB *Desulfopila corrodens* strain IS4. *Electrochim Acta* **167**: 321–329.
- Berg, I.A. (2011) Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1925–1936.
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W.H., Say, R.F., Zarzycki, J., Hügler, M., et al. (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol* **8**: 447–460.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2013) Der Calvin-Zyklus und der Pentosephosphatweg. In, *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 592–618.
- Bergel, A., Féron, D., and Mollica, A. (2005) Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem Commun* **7**: 900–904.
- Blanche, F., Couder, M., Debussche, L., Thibaut, D., Cameron, B., and Crouzet, J. (1991)

- Biosynthesis of vitamin B12: Stepwise amidation of carboxyl groups b, d, e, and g of cobyrinic acid a,c-diamide is catalyzed by one enzyme in *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol* **173**: 6046–6051.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Brandon, A.M. and Criddle, C.S. (2019) Can biotechnology turn the tide on plastics? *Curr Opin Biotechnol* **57**: 160–166.
- Brash, D.E. (2015) UV signature mutations. *Photochem Photobiol* **91**: 15–26.
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2016) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Sci Rep* **6**: 1–13.
- De Bruijn, F.J. (2016) Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Buckel, W. and Thauer, R.K. (2018) Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review. *Front Microbiol* **9**: 401.
- Caizán-Juanarena, L., Borsje, C., Sleutels, T., Yntema, D., Santoro, C., Ieropoulos, I., et al. (2019) Combination of bioelectrochemical systems and electrochemical capacitors: Principles, analysis and opportunities. *Biotechnol Adv* **39**: 107456.
- Call, D. and Logan, B.E. (2008) Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environ Sci Technol* **42**: 3401–3406.
- de Campos Rodrigues, T. and Rosenbaum, M.A. (2014) Microbial Electroreduction: Screening for New Cathodic Biocatalysts. *ChemElectroChem* **1**: 1916–1922.
- Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., and Lloyd, J.R. (2008) Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl Environ Microbiol* **74**: 615–623.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., and Logan, B.E. (2009) A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environ Sci Technol* **43**: 7148–7152.
- Cao, X., Koch, T., Steffens, L., Finkensieper, J., Zigann, R., Cronan, J.E., and Dahl, C. (2018) Lipoate-binding proteins and specific lipoate-protein ligases in microbial sulfur oxidation reveal an atypical role for an old cofactor. *Elife* **7**: e37439.
- Carbajosa, S., Malki, M., Caillard, R., Lopez, M.F., Palomares, F.J., Martín-Gago, J.A., et al. (2010) Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosens Bioelectron* **26**: 877–880.
- Chang, R., Bird, L., Barr, C., Osburn, M., Wilbanks, E., Neilson, K., and Rowe, A. (2018) *Thioclava electrotropha* sp. Nov., a versatile electrode and sulfur-oxidizing bacterium from marine sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 1652–1658.
- Chen, L., Tremblay, P.L., Mohanty, S., Xu, K., and Zhang, T. (2016) Electrosynthesis of acetate from CO₂ by a highly structured biofilm assembled with reduced graphene oxide-tetraethylene pentamine. *J Mater Chem A* **4**: 8395–8401.

- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., and Logan, B.E. (2009) Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environ Sci Technol* **43**: 3953–3958.
- Choi, O. and Sang, B.-I. (2016) Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production. *Biotechnol Biofuels* **9**: 11.
- Claassens, N.J. (2017) A warm welcome for alternative CO₂ fixation pathways in microbial biotechnology. *Microb Biotechnol* **10**: 31–34.
- Claassens, N.J., Sousa, D.Z., Dos Santos, V.A.P.M., De Vos, W.M., and Van Der Oost, J. (2016) Harnessing the power of microbial autotrophy. *Nat Rev Microbiol* **14**: 692–706.
- Corbella, C., Hartl, M., Fernandez-Gatell, M., and Puigagut, J. (2019) MFC-based biosensor for domestic wastewater COD assessment in constructed wetlands. *Sci Total Environ* **660**: 218–226.
- Cordas, C.M., Guerra, L.T., Xavier, C., and Moura, J.J.G. (2008) Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. *Electrochim Acta* **54**: 29–34.
- Dawes, E.A. (1988) Polyhydroxybutyrate: An intriguing biopolymer. *Biosci Rep* **8**: 537–547.
- Debuy, S., Pecastaings, S., Bergel, A., and Erable, B. (2015) Oxygen-reducing biocathodes designed with pure cultures of microbial strains isolated from seawater biofilms. *Int Biodeterior Biodegrad* **103**: 16–22.
- Deutzmann, J.S., Sahin, M., and Spormann, A.M. (2015) Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis. *MBio* **6**: 1–8.
- Deutzmann, J.S. and Spormann, A.M. (2017) Enhanced microbial electrosynthesis by using defined co-cultures. *ISME J* **11**: 704–714.
- Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L.F., and Orsat, V. (2017) Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. *Sustain Prod Consum* **9**: 58–70.
- Dutta, P.K., Keller, J., Yuan, Z., Rozendal, R.A., and Rabaey, K. (2009) Role of sulfur during acetate oxidation in biological anodes. *Environ Sci Technol* **43**: 3839–3845.
- Edel, M., Horn, H., and Gescher, J. (2019) Biofilm systems as tools in biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**: 5095–5103.
- El-Naggar, M.Y., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., et al. (2010) Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 18127–18131.
- Elena, S.F. and Lenski, R.E. (2003) Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet* **4**: 457–469.
- Erb, T.J. and Zarzycki, J. (2018) A short history of RubisCO: the rise and fall (?) of Nature's predominant CO₂ fixing enzyme. *Curr Opin Biotechnol* **49**: 100–107.
- Europäische Kommission (2015) *Pressemitteilung* - Den Kreislauf schließen: Kommission verabschiedet ehrgeiziges neues Maßnahmenpaket zur Kreislaufwirtschaft, um die Wettbewerbsfähigkeit zu steigern, Arbeitsplätze zu schaffen und ein nachhaltiges Wachstum zu erreichen. *Zu erreichen unter: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/IP_15_6203*. Zugriff am 05.01.2020
- Faulkner, M.J., Ma, Z., Fuangthong, M., and Helmann, J.D. (2012) Derepression of the *Bacillus*

- subtilis* peroxide stress response leads to iron deficiency. *J Bacteriol* **194**: 1226–1235.
- FCCC (2015) Report of the Conference of the Parties on its twenty-first session, held in Paris from 30 November to 13 December 2015. *Zu erreichen unter: <https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement/the-paris-agreement>*. Zugriff am 06.02.2020
- Ferry, J.G. (2010) How to Make a Living by Exhaling Methane. *Annu Rev Microbiol* **64**: 453–473.
- Fischedick, M., Görner, K., and Thomeczek, M. eds. (2015) CO₂: Abtrennung, Speicherung, Nutzung: Ganzheitliche Bewertung im Bereich von Energiewirtschaft und Industrie, 1. Aufl. Berlin: Springer Vieweg.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563–575.
- France, L.J., Edwards, P.P., Kuznetsov, V.L., and Almegren, H. (2015) The Indirect and Direct Conversion of CO₂ into Higher Carbon Fuels. In, *Carbon Dioxide Utilisation: Closing the Carbon Cycle: First Edition*. Elsevier Inc., pp. 161–182.
- Friedlingstein, P., Jones, M.W., O’Sullivan, M., Andrew, R.M., Hauck, J., Peters, G.P., et al. (2019) Global carbon budget 2019. *Earth Syst Sci Data* **11**: 1783–1838.
- Fuchs, G., Eitinger, T., Heider, J., Börries, K., Kothe, E., Overmann, J., et al. (2017) Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlegel, 10. Aufl. Fuchs, G. (ed) Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Galen, S.C., Natarajan, C., Moriyama, H., Weber, R.E., Fago, A., Benham, P.M., et al. (2015) Contribution of a mutational hot spot to hemoglobin adaptation in high-Altitude Andean house wrens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 13958–13963.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**: 343–345.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319–326.
- Gleizer, S., Ben-Nissan, R., Bar-On, Y.M., Antonovsky, N., Noor, E., Zohar, Y., et al. (2019) Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO₂. *Cell* **179**: 1255-1263.e12.
- 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.
- Götz, M., Lefebvre, J., Mörs, F., McDaniel Koch, A., Graf, F., Bajohr, S., et al. (2016) Renewable Power-to-Gas: A technological and economic review. *Renew Energy* **85**: 1371–1390.
- Gregory, K.B., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004) Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ Microbiol* **6**: 596–604.
- Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J.E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A., and Wagner, M. (2020) Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chem Eng J* **390**: 124604.

- Halan, B., Buehler, K., and Schmid, A. (2012) Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol* **30**: 453–465.
- Hasvold, Ø., Henriksen, H., Melvær, E., Citi, G., Johansen, B., Kjøningsen, T., and Galetti, R. (1997) Sea-water battery for subsea control systems. *J Power Sources* **65**: 253–261.
- He, J., Hwang, G., Liu, Y., Gao, L., Kilpatrick-Liverman, L.T., Santarpi, P., et al. (2016) L-arginine modifies the exopolysaccharide matrix and thwarts *Streptococcus mutans* outgrowth within mixed-species oral biofilms. *J Bacteriol* **198**: 2651–2661.
- Herring, C.D., Glasner, J.D., and Blattner, F.R. (2003) Gene replacement without selection: Regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* **311**: 153–163.
- Herz, E., Antonovsky, N., Bar-On, Y., Davidi, D., Gleizer, S., Prywes, N., et al. (2017) The genetic basis for the adaptation of *E. coli* to sugar synthesis from CO₂. *Nat Commun* **8**: 1–10.
- Hofmann, D.J., Butler, J.H., Dlugokencky, E.J., Elkins, J.W., Masarie, K., Montzka, S.A., and Tans, P. (2006) The role of carbon dioxide in climate forcing from 1979 to 2004: Introduction of the Annual Greenhouse Gas Index. In, *Tellus, Series B: Chemical and Physical Meteorology.*, pp. 614–619.
- Holmes, D.E., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004) Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and Graphite Electrodes. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1234–1237.
- Hossein Khademi, S.M., Sazinas, P., and Jelsbak, L. (2019) Within-host adaptation mediated by intergenic evolution in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol Evol* **11**: 1385–1397.
- Hu, G., Li, Y., Ye, C., Liu, L., and Chen, X. (2019) Engineering microorganisms for enhanced CO₂ sequestration. *Trends Biotechnol* **37**: 532–547.
- Huang, X., Zhang, K., Deng, M., Exterkate, R.A.M., Liu, C., Zhou, X., et al. (2017) Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Arch Oral Biol* **82**: 256–262.
- Ikemura, T. (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol* **151**: 389–409.
- IPCC (2013) 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., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., et al. (eds) Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- IPCC (2014) Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Pachauri, R.K. and Meyer, L.A. (eds) IPCC, Geneva, Switzerland.
- Jendrossek, D. (2009) Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol* **191**: 3195–3202.
- Jendrossek, D., Hermawan, S., Subedi, B., and Papageorgiou, A.C. (2013) Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 muteins reveal the PHB binding site and details of substrate-enzyme interactions. *Mol Microbiol* **90**: 649–664.
- Jendrossek, D. and Pfeiffer, D. (2014) New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate

- granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ Microbiol* **16**: 2357–2373.
- Jiang, Y., May, H.D., Lu, L., Liang, P., Huang, X., and Ren, Z.J. (2019) Carbon dioxide and organic waste valorization by microbial electrosynthesis and electro-fermentation. *Water Res* **149**: 42–55.
- Jourdin, L., Freguia, S., Donose, B.C., Chen, J., Wallace, G.G., Keller, J., and Flexer, V. (2014) A novel carbon nanotube modified scaffold as an efficient biocathode material for improved microbial electrosynthesis. *J Mater Chem A* **2**: 13093–13102.
- Jourdin, L., Raes, S.M.T., Buisman, C.J.N., and Strik, D.P.B.T.B. (2018) Critical Biofilm Growth throughout Unmodified Carbon Felts Allows Continuous Bioelectrochemical Chain Elongation from CO₂ up to Caproate at High Current Density. *Front Energy Res* **6**: 7.
- Jürgensen, L., Ehimen, E.A., Born, J., and Holm-Nielsen, J.B. (2014) Utilization of surplus electricity from wind power for dynamic biogas upgrading: Northern Germany case study. *Biomass and Bioenergy* **66**: 126–132.
- Justice, N.B., Norman, A., Brown, C.T., Singh, A., Thomas, B.C., and Banfield, J.F. (2014) Comparison of environmental and isolate *Sulfobacillus* genomes reveals diverse carbon, sulfur, nitrogen, and hydrogen metabolisms. *BMC Genomics* **15**: 1107.
- Kaden, J., S. Galushko, A., and Schink, B. (2002) Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol* **178**: 53–58.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., and Xu, J. (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* **7**: 1511–1522.
- Kananavičiute, R. and Čitavičius, D. (2015) Genetic engineering of *Geobacillus* spp. *J Microbiol Methods* **111**: 31–39.
- Karbelkar, A.A., Rowe, A.R., and El-Naggar, M.Y. (2019) An electrochemical investigation of interfacial electron uptake by the sulfur oxidizing bacterium *Thioclava electrotopha* ElOx9. *Electrochim Acta* **324**: 10.26434/chemrxiv.8163293.v1.
- Karthikeyan, R., Singh, R., and Bose, A. (2019) Microbial electron uptake in microbial electrosynthesis: a mini-review. *J Ind Microbiol Biotechnol* **46**: 1419–1426.
- Kashiwagi, A., Sugawara, R., Sano Tsushima, F., Kumagai, T., and Yomo, T. (2014) Contribution of Silent Mutations to Thermal Adaptation of RNA Bacteriophage Q. *J Virol* **88**: 11459–11468.
- Kato, S. (2015) Biotechnological Aspects of Microbial Extracellular Electron Transfer. *Microbes Environ* **30**: 133–139.
- Kelly, G.J. (2018) Fischer-Tropsch synthesis - carbon monoxide hydrogenation, 1. Aufl. Jackson, S.D. (ed) Berlin: De Gruyter.
- Koch, T. and Dahl, C. (2018) A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *ISME J* **12**: 2479–2491.
- Koch, T., Scheelhaase, T., Jonas, N., Hungsberg, M., and Osswald, D. (2016) Evaluation zur Nutzung von Kohlendioxid (CO₂) als Rohstoff in der Emscher-Lippe-Region - Erstellung einer Potentialanalyse, Hamburg / Herten.

- Kracke, F., Vassilev, I., and Krömer, J.O. (2015) Microbial electron transport and energy conservation - The foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Front Microbiol* **6**: 1–18.
- Kracke, F., Wong, A.B., Maegaard, K., Deutzmann, J.S., Hubert, M.K.A., Hahn, C., et al. (2019) Robust and biocompatible catalysts for efficient hydrogen-driven microbial electrosynthesis. *Commun Chem* **2**: 45.
- Kruse, D., Kiep, K., and Schäffner, B. (2015) CO₂-Abtrennung und -Nutzung. In, *CO₂: Abtrennung, Speicherung, Nutzung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 511–567.
- Kudla, G., Murray, A.W., Tollervey, D., and Plotkin, J.B. (2009) Coding-sequence determinants of expression in *Escherichia coli*. *Science (80-)* **324**: 255–258.
- Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C., and Thakur, I.S. (2018) Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresour Technol* **247**: 1059–1068.
- Kuramochi, T., den Elzen, M., and Peters, G. (2019) Emissions Gap Report 2019, United Nations Environment Programme.
- Kutralam-Muniasamy, G., Corona-Hernandez, J., Narayanasamy, R.K., Marsch, R., and Pérez-Guevara, F. (2017) Phylogenetic diversification and developmental implications of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate gene cluster assembly in prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* **364**: fnx135.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lang, G.I. and Desai, M.M. (2014) The spectrum of adaptive mutations in experimental evolution. *Genomics* **104**: 412–416.
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., and Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* **100**: 95–97.
- Lauring, A.S., Acevedo, A., Cooper, S.B., and Andino, R. (2012) Codon usage determines the mutational robustness, evolutionary capacity, and virulence of an RNA virus. *Cell Host Microbe* **12**: 623–632.
- Leang, C., Malvankar, N.S., Franks, A.E., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2013) Engineering *Geobacter sulfurreducens* to produce a highly cohesive conductive matrix with enhanced capacity for current production. *Energy Environ Sci* **6**: 1901–1908.
- Lebeuf-Taylor, E., McCloskey, N., Bailey, S.F., Hinz, A., and Kassen, R. (2019) The distribution of fitness effects among synonymous mutations in a gene under directional selection. *Elife* **8**: e45952.
- Lee, M.J. and Zinder, S.H. (1988) Hydrogen Partial Pressures in a Thermophilic Acetate-Oxidizing Methanogenic Coculture. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1457–1461.
- Lee, R.P., Keller, F., and Meyer, B. (2017) A concept to support the transformation from a linear to circular carbon economy: net zero emissions, resource efficiency and conservation through a coupling of the energy, chemical and waste management sectors. *Clean Energy* **1**: 102–113.
- Lee, R.P., Wolfersdorf, C., Keller, F., and Meyer, B. (2017) Towards a closed carbon cycle and achieving a circular economy for carbonaceous resources - Net zero emissions, resource

- efficiency and resource conservation through coupling of the energy, chemical and recycling sectors. *Oil Gas Eur Mag* **43**: 76–77.
- Lee, T.R., Lin, J.S., Wang, S.S., and Shaw, G.C. (2004) PhaQ, a New Class of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB)-Responsive Repressor, Regulates *phaQ* and *phaP* (Phasin) Expression in *Bacillus megaterium* through Interaction with PHB. *J Bacteriol* **186**: 3015–3021.
- Li, H., Zhou, Y., Wang, N., Xin, Y., Tang, L., and Ma, Y. (2012) Identification and characterization of a MurA, UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase from cariogenic *Streptococcus mutans*. *J Hard Tissue Biol* **21**: 17–24.
- Liang, F., Lindberg, P., and Lindblad, P. (2018) Engineering photoautotrophic carbon fixation for enhanced growth and productivity. *Sustain Energy Fuels* **2**: 2583–2600.
- Liao, H.H. and Kanikula, A.M. (1990) Increased efficiency of transformation of *Bacillus stearothermophilus* by a plasmid carrying a thermostable kanamycin resistance marker. *Curr Microbiol* **21**: 301–306.
- Liebergessell, M., Sonomoto, K., Madkour, M., Mayer, F., and Steinbüchel, A. (1994) Purification and Characterization of the Poly(Hydroxyalkanoic Acid) Synthase from *Chromatium vinosum* and Localization of the Enzyme at the Surface of Poly(Hydroxyalkanoic Acid) Granules. *Eur J Biochem* **226**: 71–80.
- Lienemann, M., Deutzmann, J.S., Milton, R.D., Sahin, M., and Spormann, A.M. (2018) Mediator-free enzymatic electrosynthesis of formate by the *Methanococcus maripaludis* heterodisulfide reductase supercomplex. *Bioresour Technol* **254**: 278–283.
- Liew, F.M., Martin, M.E., Tappel, R.C., Heijstra, B.D., Mihalcea, C., and Köpke, M. (2016) Gas Fermentation-A flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks. *Front Microbiol* **7**: 694.
- Lin, Jianqiang, Liu, W., Lin, Jianqun, Pang, X., Mi, S., and Cui, S. (2013) Increases of ferrous iron oxidation activity and arsenic stressed cell growth by overexpression of Cyc2 in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC19859. *Biotechnol Appl Biochem* **60**: 623–628.
- Lind, P.A., Libby, E., Herzog, J., and Rainey, P.B. (2019) Predicting mutational routes to new adaptive phenotypes. *Elife* **8**: e38822.
- Liu, W., Lin, Jianqun, Pang, X., Cui, S., Mi, S., and Lin, Jianqiang (2011) Overexpression of rusticyanin in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC19859 increased Fe(II) oxidation activity. *Curr Microbiol* **62**: 320–324.
- Logan, B.E. (2009) Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 375–381.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., et al. (2006) Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* **40**: 5181–5192.
- Logan, B.E. and Rabaey, K. (2012) Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science (80-)* **337**: 686–690.
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., and Saikaly, P.E. (2019) Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nat Rev Microbiol* **17**: 307–319.
- Lohner, S.T., Deutzmann, J.S., Logan, B.E., Leigh, J., and Spormann, A.M. (2014) Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *ISME J* **8**: 1673–1681.

- Lovley, D.R. and Nevin, K.P. (2013) Electrobiocommodities: powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity. *Curr Opin Biotechnol* **24**: 385–390.
- Lu, L. and Ren, Z.J. (2016) Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: A state of the art review. *Bioresour Technol* **215**: 254–264.
- Mall, A., Sobotta, J., Huber, C., Tschirner, C., Kowarschik, S., Bačnik, K., et al. (2018) Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science* **359**: 563–567.
- Malvankar, N.S. and Lovley, D.R. (2014) Microbial nanowires for bioenergy applications. *Curr Opin Biotechnol* **27**: 88–95.
- Malvankar, N.S., Mester, T., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012) Supercapacitors based on *c*-type cytochromes using conductive nanostructured networks of living bacteria. *ChemPhysChem* **13**: 463–468.
- De Marco, A., Casatta, E., Savaresi, S., and Geerlof, A. (2004) Recombinant proteins fused to thermostable partners can be purified by heat incubation. *J Biotechnol* **107**: 125–133.
- Marlin, D.S., Sarron, E., and Sigurbjörnsson, Ó. (2018) Process Advantages of Direct CO₂ to Methanol Synthesis. *Front Chem* **6**: 446.
- McCool, G.J. and Cannon, M.C. (2001) PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* **183**: 4235–43.
- Mezzina, M.P. and Pettinari, M.J. (2016) Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Appl Environ Microbiol* **82**: 5060–5067.
- Michael, A.J. (2018) Polyamine function in archaea and bacteria. *J Biol Chem* **293**: 18693–18701.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., and Ralser, M. (2015) Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol* **427**: 3389–3406.
- Molenaar, S.D., Sleutels, T., Pereira, J., Iorio, M., Borsje, C., Zamudio, J.A., et al. (2018) *In situ* biofilm quantification in bioelectrochemical systems by using optical coherence tomography. *ChemSusChem* **11**: 2171–2178.
- Mongkolsuk, S. and Helmann, J.D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol Microbiol* **45**: 9–15.
- Możejko-Ciesielska, J. and Kiewisz, R. (2016) Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiol Res* **192**: 271–282.
- Mukhopadhyay, M., Patra, A., and Paul, A.K. (2013) Phototrophic Growth and Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodospseudomonas palustris* SP5212. *J Polym* **2013**: 1–6.
- Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., et al. (2011) Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2882–2886.
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., and Lovley, D.R. (2010) Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *MBio* **1**: e00103-10.

- Okamoto, A., Hashimoto, K., and Nealson, K.H. (2014) Flavin redox bifurcation as a mechanism for controlling the direction of electron flow during extracellular electron transfer. *Angew Chemie - Int Ed* **53**: 10988–10991.
- Olhoff, A. and Christensen, J. (2019) Emissions Gap Report 2019, United Nations Environment Programme.
- Peteranderl, R., Shotts, E.B., and Wiegel, J. (1990) Stability of antibiotics under growth conditions for thermophilic anaerobes. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1981–1983.
- Peterson, M. (2004) *Cradle to Cradle: Remaking the Way We Make Things*, 1st ed. New York: North Point Press.
- Philips, J. (2020) Extracellular Electron Uptake by Acetogenic Bacteria: Does H₂ Consumption Favor the H₂ Evolution Reaction on a Cathode or Metallic Iron? *Front Microbiol* **10**: 2997.
- Philips, J., Monballyu, E., Georg, S., De Paepe, K., Prévosteau, A., Rabaey, K., and Arends, J.B.A. (2019) An Acetobacterium strain isolated with metallic iron as electron donor enhances iron corrosion by a similar mechanism as *Sporomusa sphaeroides*. *FEMS Microbiol Ecol* **95**: 35.
- Philips, J., Verbeeck, K., Rabaey, K., and Arends, J.B.A. (2016) Electron Transfer Mechanisms in Biofilms. In, *Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications*. Elsevier Inc., pp. 67–113.
- Pillot, G., Brillet-viel, A., Prévost, H., Secalim, U.M.R., and Bretagne-loire, U. (2018) Implication of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Listeria monocytogenes*. *bioRxiv* 353409.
- Pons, L., Délia, M.L., and Bergel, A. (2011) Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes. *Bioresour Technol* **102**: 2678–2683.
- Poquet, I., Saujet, L., Canette, A., Monot, M., Mihajlovic, J., Ghigo, J.M., et al. (2018) *Clostridium difficile* Biofilm: Remodeling metabolism and cell surface to build a sparse and heterogeneously aggregated architecture. *Front Microbiol* **9**: 2084.
- Pötter, M., Müller, H., Reinecke, F., Wieczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., et al. (2004) The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: Four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* **150**: 2301–2311.
- Pötter, M. and Steinbüchel, A. (2005) Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* **6**: 552–560.
- Potter, M.C. (1911) Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proc R Soc B Biol Sci* **84**: 260–276.
- Prakash, D., Chauhan, S.S., and Ferry, J.G. (2019) Life on the thermodynamic edge: Respiratory growth of an acetotrophic methanogen. *Sci Adv* **5**: eaaw9059.
- Prévosteau, A., Carvajal-Arroyo, J.M., Ganigué, R., and Rabaey, K. (2020) Microbial electrosynthesis from CO₂: forever a promise? *Curr Opin Biotechnol* **62**: 48–57.
- Prokhorova, A., Sturm-Richter, K., Doetsch, A., and Gescher, J. (2017) Resilience, dynamics, and interactions within a model multispecies exoelectrogenic-biofilm community. *Appl Environ Microbiol* **83**: 10.1128/AEM.03033-16.

- Puigbò, P., Guzmán, E., Romeu, A., and Garcia-Vallvé, S. (2007) OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **35**: W126-31.
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., and Verstraete, W. (2005) Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ Sci Technol* **39**: 3401–3408.
- Rabaey, K. and Rozendal, R.A. (2010) Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Microbiol* **8**: 706–716.
- Rajan, K.P., Thomas, S.P., Gopanna, A., and Chavali, M. (2018) Polyhydroxybutyrate (PHB): A Standout Biopolymer for Environmental Sustainability. In, *Handbook of Ecomaterials*. Springer International Publishing, pp. 1–23.
- Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* **49**: 1–7.
- Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., and Lovley, D.R. (2006) Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7345–7348.
- Reiner, J.E. (2019) Untersuchungen zur Nutzung von Knallgasbakterien als Biokatalysator in einem aeroben Elektrosyntheseprozess zur stofflichen Nutzung von CO₂; *Doktorarbeit am Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Biowissenschaften*.
- Reiner, J.E., Geiger, K., Hackbarth, M., Fink, M., Lapp, C.J., Jung, T., et al. (2020) From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: identifying a novel Knallgas bacterium as cathodic biofilm biocatalyst. *ISME J* **14**: 1125-1140.
- Reiner, J.E., Jung, T., Lapp, C.J., Siedler, M., Bunk, B., Overmann, J., and Gescher, J. (2018) *Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at São Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 3735–3740.
- Reiner, J.E., Lapp, C.J., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., and Gescher, J. (2018) Complete Genome Sequence of *Kyrpidia* sp. Strain EA-1, a Thermophilic Knallgas Bacterium, Isolated from the Azores. *Genome Announc* **6**: e01505--17.
- Reis, A. and Da Silva, T.L. (2016) Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae. In, *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*. Springer International Publishing, pp. 125–149.
- Ren, J., Lee, H., Yoo, S.M., Yu, M.S., Park, H., and Na, D. (2017) Combined chemical and physical transformation method with RbCl and sepiolite for the transformation of various bacterial species. *J Microbiol Methods* **135**: 48–51.
- Renier, S., Chagnot, C., Deschamps, J., Caccia, N., Szlavik, J., Joyce, S.A., et al. (2014) Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition. *Environ Microbiol* **16**: 1176–1192.
- Richter, K., Schicklberger, M., and Gescher, J. (2012) Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**: 913–921.
- Rismani-Yazdi, H., Carver, S.M., Christy, A.D., and Tuovinen, O.H. (2008) Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview. *J Power Sources* **180**: 683–694.
- Roberts, J. and Park, J.S. (2004) Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: Translocation, repair and termination. *Curr Opin Microbiol* **7**: 120–125.

- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015) REBASE-a database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **43**: D298–D299.
- Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Pantión, A.A., and Alonso-Fariñas, B. (2018) Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J Environ Manage* **205**: 215–230.
- Rodriguez-Valera, F. and Lillo, J.G. (1992) Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol Lett* **103**: 181–186.
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., and Angenent, L.T. (2011) Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour Technol* **102**: 324–333.
- Rosenbaum, M.A. and Franks, A.E. (2014) Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 509–518.
- 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**: e16649.
- Rowe, A.R., Rajeev, P., Jain, A., Pirbadian, S., Okamoto, A., Gralnick, J.A., et al. (2018) Tracking electron uptake from a cathode into *Shewanella* cells: Implications for energy acquisition from solid-substrate electron donors. *MBio* **9**: e02203--17.
- Rowe, A.R., Xu, S., Gardel, E., Bose, A., Girguis, P., Amend, J.P., and El-Naggar, M.Y. (2019) Methane-linked mechanisms of electron uptake from cathodes by *Methanosarcina barkeri*. *MBio* **10**: e02448-18.
- Saini, R., Kapoor, R., Kumar, R., Siddiqi, T.O., and Kumar, A. (2011) CO₂ utilizing microbes - A comprehensive review. *Biotechnol Adv* **29**: 949–960.
- Salimijazi, F., Parra, E., and Barstow, B. (2019) Electrical energy storage with engineered biological systems. *J Biol Eng* **13**: 10.1186/s13036-019-0162-7.
- Schröder, U., Harnisch, F., and Angenent, L.T. (2015) Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ Sci* **8**: 513–519.
- Schröder, U., Nießen, J., and Scholz, F. (2003) A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angew Chemie - Int Ed* **42**: 2880–2883.
- Schuchmann, K. and Müller, V. (2014) Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **12**: 809–821.
- Schwander, T., von Borzyskowski, L.S., Burgener, S., Cortina, N.S., and Erb, T.J. (2016) A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science (80-)* **354**: 900–904.
- Sekowska, A., Wendel, S., Fischer, E.C., Nørholm, M.H.H., and Danchin, A. (2016) Generation of mutation hotspots in ageing bacterial colonies. *Sci Rep* **6**: 10.1038/s41598-016-0005–4.
- Selby, C.P. (2017) Mfd Protein and Transcription–Repair Coupling in *Escherichia coli*. *Photochem Photobiol* **93**: 280–295.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1993) Molecular mechanism of transcription-repair coupling.

- Science* (80-) **260**: 53–58.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1995) Structure and function of transcription-repair coupling factor: I. Structural domains and binding properties. *J Biol Chem* **270**: 4882–4889.
- Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2007) Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem *c*-type cytochromes. *Mol Microbiol* **65**: 12–20.
- Siebert, M., Yates, M.D., Spormann, A.M., and Logan, B.E. (2015) Methanobacterium Dominates Biocathodic Archaeal Communities in Methanogenic Microbial Electrolysis Cells. *ACS Sustain Chem Eng* **3**: 1668–1676.
- Simonte, F., Sturm, G., Gescher, J., and Sturm-Richter, K. (2017) Extracellular electron transfer and biosensors. In, *Bioelectrosynthesis*. Springer, pp. 15–38.
- Skoczinski, P., Chinthapalli, R., Carus, M., Baltus, W., de Guzman, D., Käb, H., et al. (2020) Bio-based Building Blocks and Polymers – Global Capacities, Production and Trends 2019 – 2024, Hürth, Germany.
- Spencer, W.F., Cliath, M.M., van den Oever, M., Molenveld, K., van der Zee, M., and Bos, H. (2017) Bio-based and biodegradable plastics : facts and figures : focus on food packaging in the Netherlands.
- Straub, K.L. and Schink, B. (2004) Ferrihydrite-dependent growth of *Sulfurospirillum deleyianum* through electron transfer via sulfur cycling. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5744–5749.
- Strycharz, S.M., Woodard, T.L., Johnson, J.P., Nevin, K.P., Sanford, R.A., Löffler, F.E., and Lovley, D.R. (2008) Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5943–5947.
- Sultana, S.T., Babauta, J.T., and Beyenal, H. (2015) Electrochemical biofilm control: A review. *Biofouling* **31**: 745–758.
- Summers, Z.M., Gralnick, J. a, and Bond, D.R. (2013) Cultivation of an Obligate Fe(II)-Oxidizing Lithoautotrophic Bacterium Using Electrodes. *MBio* **4**: 1–5.
- Sun, J.Z., Kingori, G.P., Si, R.W., Zhai, D.D., Liao, Z.H., Sun, D.Z., et al. (2015) Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: A review. *Water Sci Technol* **71**: 801–809.
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., and Holtmann, D. (2014) Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8481–8495.
- Sznajder, A., Pfeiffer, D., and Jendrossek, D. (2015) Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* **81**: 1847–1858.
- Takors, R., Kopf, M., Mampel, J., Bluemke, W., Blombach, B., Eikmanns, B., et al. (2018) Using gas mixtures of CO, CO₂ and H₂ as microbial substrates: the do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. *Microb Biotechnol* **11**: 606–625.
- Teo, A.C.K. and Roper, D.I. (2015) Core steps of membrane-bound peptidoglycan biosynthesis: Recent advances, insight and opportunities. *Antibiotics* **4**: 495–520.

- Thakur, I.S., Kumar, M., Varjani, S.J., Wu, Y., Gnansounou, E., and Ravindran, S. (2018) Sequestration and utilization of carbon dioxide by chemical and biological methods for biofuels and biomaterials by chemoautotrophs: Opportunities and challenges. *Bioresour Technol* **256**: 478–490.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**: 100–180.
- Tian, S., Wang, H., Dong, Z., Yang, Y., Yuan, H., Huang, Q., et al. (2019) Mo2C-induced hydrogen production enhances microbial electrosynthesis of acetate from CO₂ reduction. *Biotechnol Biofuels* **12**: 71.
- Tirapelle, E.F., Müller-Santos, M., Tadra-Sfeir, M.Z., Kadowaki, M.A.S., Steffens, M.B.R., Monteiro, R.A., et al. (2013) Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. *PLoS One* **8**: e75066.
- Traoré, D.A.K., El Ghazouani, A., Ilango, S., Dupuy, J., Jacquamet, L., Ferrer, J.L., et al. (2006) Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **61**: 1211–1219.
- Tremblay, P.-L., Faraghiparapari, N., and Zhang, T. (2019) Accelerated H₂ Evolution during Microbial Electrosynthesis with *Sporomusa ovata*. *Catalysts* **9**: 166.
- Tremblay, P.L., Angenent, L.T., and Zhang, T. (2017) Extracellular Electron Uptake: Among Autotrophs and Mediated by Surfaces. *Trends Biotechnol* **35**: 360–371.
- Tremblay, P.L. and Zhang, T. (2015) Electrifying microbes for the production of chemicals. *Front Microbiol* **6**: 201.
- Troschl, C., Meixner, K., and Drosig, B. (2017) Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years’ Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering* **4**: 26.
- Tseng, C.L., Chen, H.J., and Shaw, G.C. (2006) Identification and characterization of the *Bacillus thuringiensis* phaZ gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase. *J Bacteriol* **188**: 7592–7599.
- TWI2050 (2019) The Digital Revolution and Sustainable Development: Opportunities and Challenges. Report prepared by The World in 2050 initiative, Laxenburg, Austria: International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA).
- Tyo, K.E.J., Fischer, C.R., Simeon, F., and Stephanopoulos, G. (2010) Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metab Eng* **12**: 187–195.
- Ucar, D., Zhang, Y., and Angelidaki, I. (2017) An overview of electron acceptors in microbial fuel cells. *Front Microbiol* **8**: 643.
- Ueki, T., Nevin, K.P., Woodard, T.L., Aklujkar, M.A., Holmes, D.E., and Lovley, D.R. (2018) Construction of a *Geobacter* strain with exceptional growth on cathodes. *Front Microbiol* **9**: 1512.
- United Nations Treaty Collection (2019) *Paris Agreem. Zu erreichen unter: https://treaties.un.org/Pages/ViewDetails.aspx?src=TREATY&mtdsg_no=XXVII-7-d&chapter=27&clang=_en*. Zugriff am 06.02.2020
- Uversky, V.N. and Permiakov, E.A. (2007) Methods in Protein Structure and Stability

- Analysis: Conformational stability, size, shape, and surface of protein molecules, Nova Biomedical Books.
- Vasu, K. and Nagaraja, V. (2013) Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 53–72.
- Venzlaff, H., Enning, D., Srinivasan, J., Mayrhofer, K.J.J., Hassel, A.W., Widdel, F., and Stratmann, M. (2013) Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. *Corros Sci* **66**: 88–96.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., et al. (2012) Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl Chem* **84**: 377–410.
- Volbeda, A. and Fontecilla-Camps, J.C. (2013) Nickel-Binding Proteins, Overview. In, *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer New York, pp. 1521–1528.
- Wagner, M. and Horn, H. (2017) Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnol Bioeng* **114**: 1386–1402.
- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J.P., Yi, S.M., Yalcin, S.E., Srikanth, V., et al. (2019) Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell* **177**: 361-369.e10.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**: 296–303.
- Zaybak, Z., Pisciotta, J.M., Tokash, J.C., and Logan, B.E. (2013) Enhanced start-up of anaerobic facultatively autotrophic biocathodes in bioelectrochemical systems. *J Biotechnol* **168**: 478–485.
- Zhang, T. and Tremblay, P.-L. (2019) Possible Industrial Applications for Microbial Electrosynthesis From Carbon Dioxide. In, *Microbial Electrochemical Technology*. Elsevier, pp. 825–842.
- Zhao, H., Wei, H., Liu, X., Yao, Z., Xu, M., Wei, D., et al. (2016) Structural Insights on PHA Binding Protein PhaP from *Aeromonas hydrophila*. *Sci Rep* **6**: 1–13.
- Zheng, Y., Zhang, W., Li, Y., Chen, J., Yu, B., Wang, J., et al. (2017) Energy related CO₂ conversion and utilization: Advanced materials/nanomaterials, reaction mechanisms and technologies. *Nano Energy* **40**: 512–539.

VI. Anhang

Zu 3.1.1.2. Makroskopische Analysen des kathodischen Biofilms

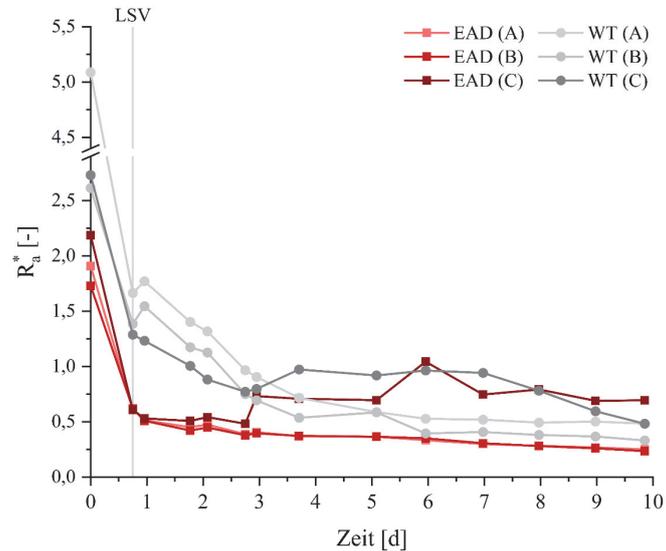


Abb. 49: Verlauf der ermittelten Rauheitskoeffizienten R_a^* von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung für die einzelnen Messstellen A, B und C. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist gekennzeichnet.

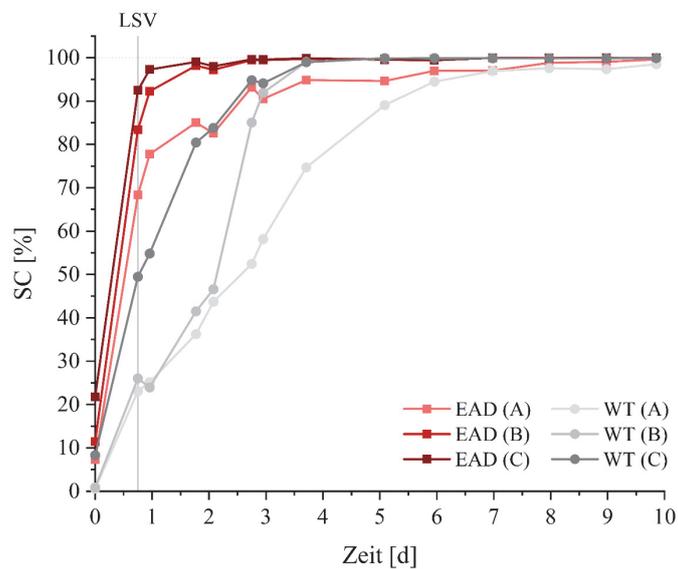


Abb. 50: Verlauf der ermittelten Substratbedeckung SC von Stamm EAD und des Wildtyps (WT) während der Fließzellen-Kultivierung für die einzelnen Messstellen A, B und C. Der Zeitpunkt des LSV-Endes ist gekennzeichnet.

Zu 3.2.2.5. Mutation in CVV_12480Tab. 43: Ergebnis der Blast-Analyse der Gene des HDR-Komplexes aus *K. spormannii*. Es sind die ersten zwei signifikanten Treffer gezeigt.

Gennummer	Blast-Ergebnis	Nächste Verwandte (Proteinidentität)
CVV65_RS12500	heterodisulfide reductase subunit C	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,13 %) <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (82,27 %)
CVV65_RS12495	heterodisulfide reductase subunit B	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,50 %) <i>Sulfobacillus benefaciens</i> (81,33 %)
CVV65_RS12490	CoB--CoM heterodisulfide reductase iron-sulfur subunit	<i>Kyrpidia tusciae</i> (98,03 %) <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (83,53 %)
CVV65_RS12485	hypothetical protein	<i>Kyrpidia tusciae</i> (92,24 %) <i>Sulfobacillus acidophilus</i> (41,88 %)
CVV65_RS12480	(Fe-S)-binding protein	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,01 %) <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (79,11 %)
CVV65_RS12475	electron transfer flavoprotein subunit beta	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,61 %) <i>Sulfobacillus benefaciens</i> (46,46 %)
CVV65_RS12470	electron transfer flavoprotein subunit alpha	<i>Kyrpidia tusciae</i> (98,12 %) Chloroflexi bacterium GWC2 (48,57 %)
CVV65_RS12465	4Fe-4S dicluster domain-containing protein	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,16 %) Calditrichaeota bacterium (51,07 %)
CVV65_RS12460	glycine cleavage system protein H	<i>Kyrpidia tusciae</i> (97,92 %) <i>Sulfobacillus benefaciens</i> (73,57 %)
CVV65_RS12455	glycine cleavage system protein H	<i>Kyrpidia tusciae</i> (98,72 %) <i>Sulfobacillus benefaciens</i> (60 %)
CVV65_RS12450	lipoate--protein ligase family protein	<i>Kyrpidia tusciae</i> (98,57 %) <i>Sulfobacillus benefaciens</i> (56,03 %)
CVV65_RS12445	sulfurtransferase TusA family protein	<i>Kyrpidia tusciae</i> (98,27 %) <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (59,72 %)
CVV65_RS12440	sulfur reduction protein DsrE	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,21 %) <i>Sulfobacillus benefaciens</i> (82,26 %)
CVV65_RS12500	GAF domain-containing protein	<i>Kyrpidia tusciae</i> (99,44 %) <i>Vibrio</i> sp. JCM 19236 (37,84 %)

Zu 3.2.2.6. Mutation in murA2

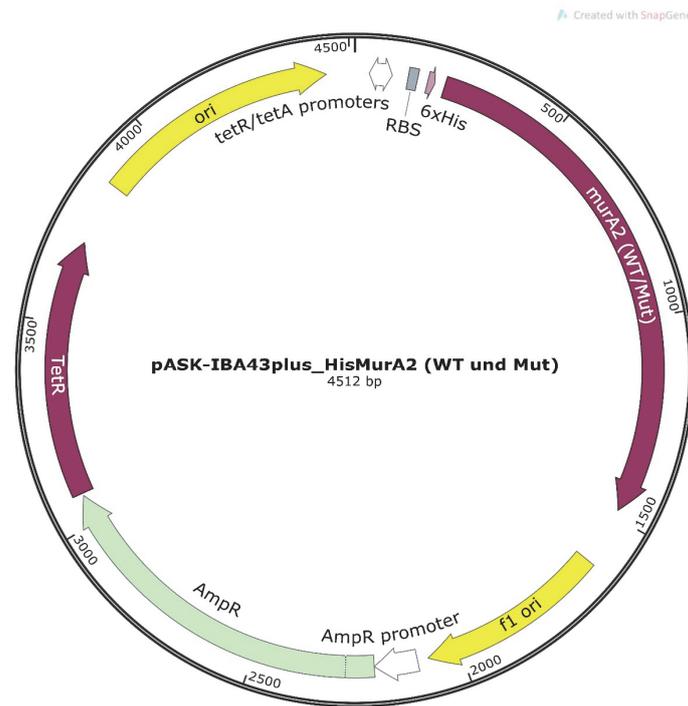


Abb. 51: Plasmidkarte von pASK-IBA43plus_his-murA (WT/Mut).

Zu 3.2.3: Analyse der Gene mit hoher Mutationsrate

Tab. 44: Ergebnis der Analyse konservierter Proteindomänen in Genen, die eine hohe Mutationsrate aufweisen. Die ersten zwei Treffer der konservierten Proteindomänen mit ihren Bezeichnungen und der dazugehörigen *accession*-Nummer sind gezeigt. Es sind lediglich Treffer mit e-Werten unter e^{-5} aufgeführt.

Gen-Nr.	Proteindomäne (<i>accession</i> -Nr.)	Beschreibung	e-Wert
<i>argH</i>	PRK00855	<i>Argininosuccinate lyase</i>	$4,51 * e^{-180}$
	ArgH (COG0165)	<i>Argininosuccinate lyase</i>	$1,22 * e^{-172}$
<i>CVV65_10770</i>	DUF3048 (pfam11258)	<i>Protein of unknown function (DUF3048) N-terminal domain</i>	$3,51 * e^{-31}$
<i>CVV65_10610</i>	AAMH_A (cd01057)	<i>Aromatic and Alkene Monooxygenase Hydroxylase, subunit A, ferritin-like diiron-binding domain</i>	$3,71 * e^{-93}$
	Phenol_hydrox (pfam03223)	<i>Methane/Phenol/Toluene Hydroxylase</i>	$1,66 * e^{-28}$
<i>CVV65_08360</i>	ATPgrasp_YheCD (pfam14398)	<i>YheC/D like ATP-grasp; predicted to be involved in the modification/biosynthesis of spore-wall and capsular proteins</i>	$3,42 * e^{-29}$
<i>CVV65_03605</i>	PRK00784	<i>cobyric acid synthase</i>	$4,05 * e^{-172}$
	CobQ (COG1492)	<i>Cobyric acid synthase</i>	$2,97 * e^{-153}$

<i>tkt</i> (CVV65_14375)	TktA (COG0021) tktlase_bact (TIGR00232)	Transketolase <i>transketolase, bacterial and yeast</i>	0 0
CVV65_02760	InsQ (CPG0675)	Transposase [<i>Mobilome: prophages, transposons</i>]	1,16*e ⁻⁷

Zu 3.3.2. Heterologe Expression potentieller PHB-Synthesegene in *E. coli*

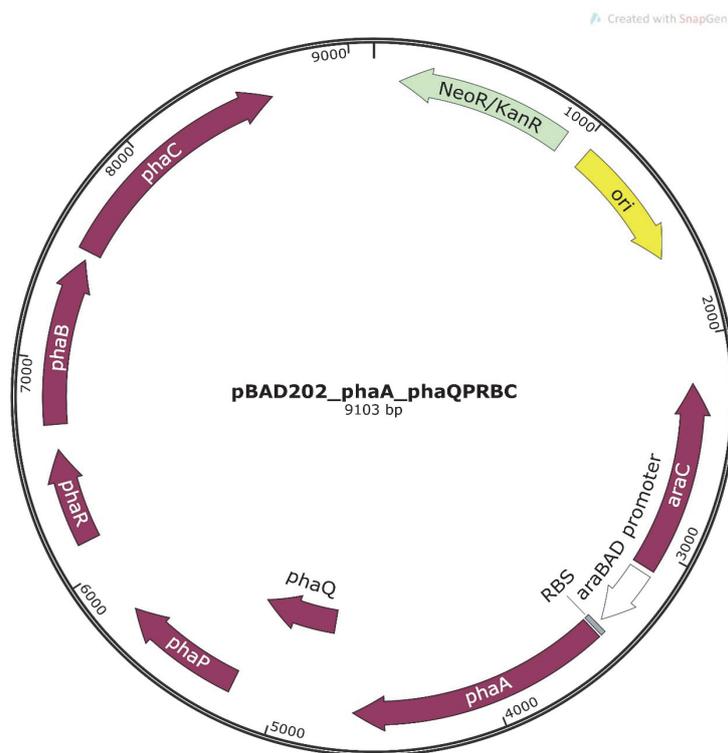


Abb. 52: Plasmidkarte von pBAD202_phaA_phaQRBC.

Zu 3.4.1. Das Selektionssystem

```

TTGGTTTAAACGAAGATTAGATGCTATAATTGTTATTTAAAAGGATTGAAGGATGCTTAGGAAGA
CGAGTTATTAATAGCTGAATAAGAACGGTGCTCTCCAAATATTCTTATTTAGAAAAGCAAATCT
AAAATTATCTGAAAAGGGAATGCGGATCGTGAATGGTCCCATTATCATGACCCGAGAGGAGCG
GATGAAAATCGTGCATGAGATCAAAGAGCGGATTTTGGACAAGTATGGGGATGACGTGAAGGC
GATCGGTGTCTATGGATCGCTGGGCCGACAAACCGATGGTCCGTACAGCGACATCGAGATGAT
GTGCGTGATGTCTACGGAGGAAGCCGAGTTCTCCACGAATGGACCACGGGCGAGTGGAAGGT
GGAGGTGAACTTTTATTCGGAAGAAATCTTGTTAGACTACGCCAGTCAGGTCGAATCGGATTGG
CCCTTGACGCACGGGCAATTTTTTAGCATTCTCCCCATTTACGACAGTGGTGGTTACTTGAAAA
AAGTGTATCAAACAGCCAAATCCGTGGAGGCCAGAAATTCACGATGCGATCTGTGCCCTTAT
CGTCGAAGAGTTGTTGAGTACGCCGGGAAATGGAGAAATATCCGCGTGCAAGGGCCGACCAC
ATTCCTGCCCTCCCTGACCGTCCAGGTGGCCATGGCGGGGGCCATGCTTATTGGCTTGCATCAC
CGCATCTGCTATAACCACATCTGCCTCCGTGTTGACCGAAGCCGTTAAACAGAGCGACCTGCCCT
CGGGGTACGACCATCTCTGCCAATTCGTGATGTGCGGGTCAGTTAAGTGACTCCGAAAAACTCTT
GAAAAGCTTGGAGAACTTTTGAACGGAATCAAGAATGGACCGAGCGGCACGGATATATCGT
TGATGTGTCTAAGAGGATCCCGTTTTGATAA
    
```

Abb. 53: Sequenz von $P_{\text{Nat}}\text{-TK101}_{Ksp}$. Die Sequenz von P_{Nat} ist grau hinterlegt. Die restliche Sequenz bildet die codon-optimierte Sequenz von *TK101*.

```

ACTACCATAACAGTCAACCCAGTTTTAGAAAAATAGGGCGAAAGTCCTAGTCGACGGTAGAAA
GCGGAAACTCCGGCGCGAAGGTGCGAATTTCTTGACCTGTTCTTTTCGGGGCATGGTAAAATTTT
GAGAACAGGACAATCGCTCCCTCTCGTCTGGGGACGAGGGGTTTTTTGTATGGGATCCCAGG
AGGTGCGATATGAGAAAAGGGGAAGAACTGTTACCGGGGTGGTCCCCATTCTGGTGGAAATTA
GATGGCGATGTGAATGGGCACAAATTTAGCGTCAGTGGGGAGGGCGAAGGCGATGCCACCAAC
GGGAAACTGACCCTGAAATTTATTTGCACCACCGGAAACTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTGG
TCACCACCTTGACCTATGGCGTGCAATGCTTTGCGAGATACCCCGATCATATGAAACAGCATGA
CTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCCAAGGCTATGTGCAGGAAAGAACCATCAGCTTCAAAGATGA
CGGGACCTACAAGACCAGAGCCGAAGTCAAGTTTGAAGGCGATACCCTGGTGAATAGAATCGA
GTTAAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGGAACATTCTGGGGCACAAATTGGAATACAATT
TAACAGCCACAATGTGTACATCACGGCCGACAAACAAAAGAATGGGATCAAAGCCAACTTCAA
AATTAGACACAACGTGGAAGATGGGAGCGTGAACACTGGCCGACCATTATCAACAAAATACCCC
CATTGGCGATGGCCCGTCTGTTACCCGACAACCATTACCTGTCCTATCAAAGCGCCCTGTCG
AAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTGCTGGAGTTTGTGACCGCCGCGGGATT
ACCCATGGCATGGATGAACTGTACAAAAGGCCCGCCGCAACGACGAAAACACTACGCCGCCAGC
GTGTGATAA
    
```

Abb. 54: Sequenz von $P_{\text{Met}}\text{-FFTS-YFP}_{Ksp}$. Die Sequenz von P_{Met} ist grau hinterlegt. Die restliche Sequenz bildet die codon-optimierte Sequenz von *FFTS-YFP*.

Zu 3.4.2. Klonierung der Transformationsplasmide

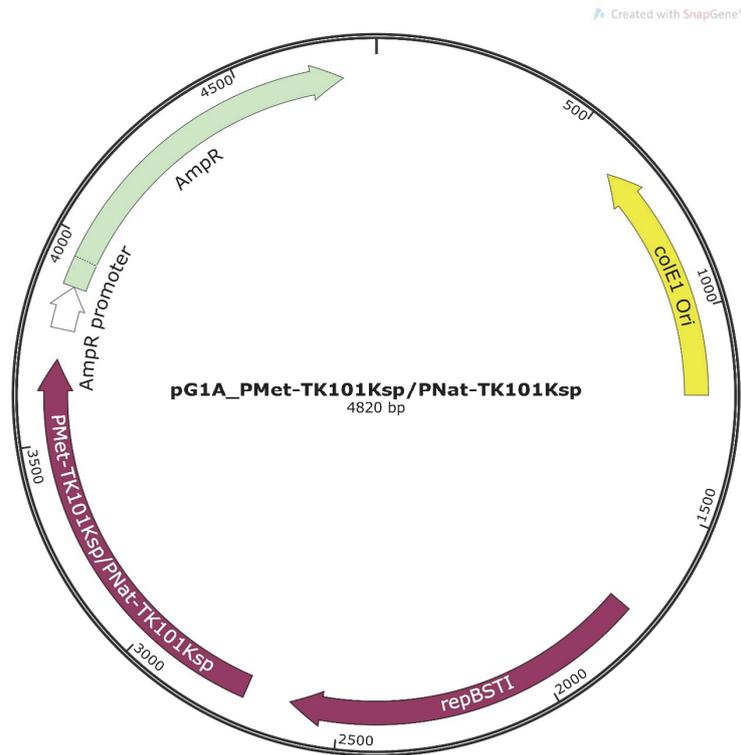


Abb. 55: Plasmidkarte von pG1A_PMet-TK101Ksp bzw. _PNat-TK101Ksp.

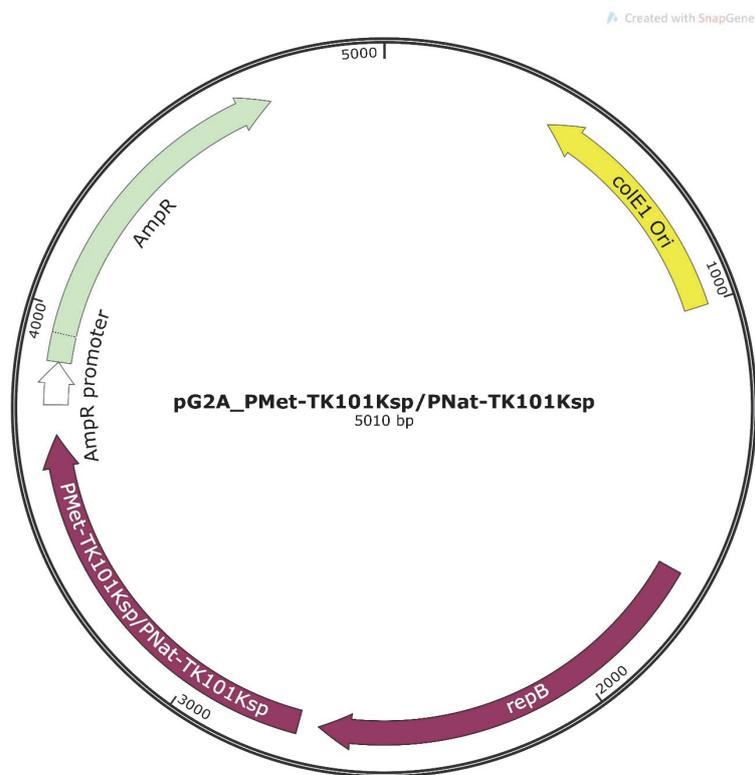


Abb. 56: Plasmidkarte von pG2A_PMet-TK101Ksp bzw. _PNat-TK101Ksp.

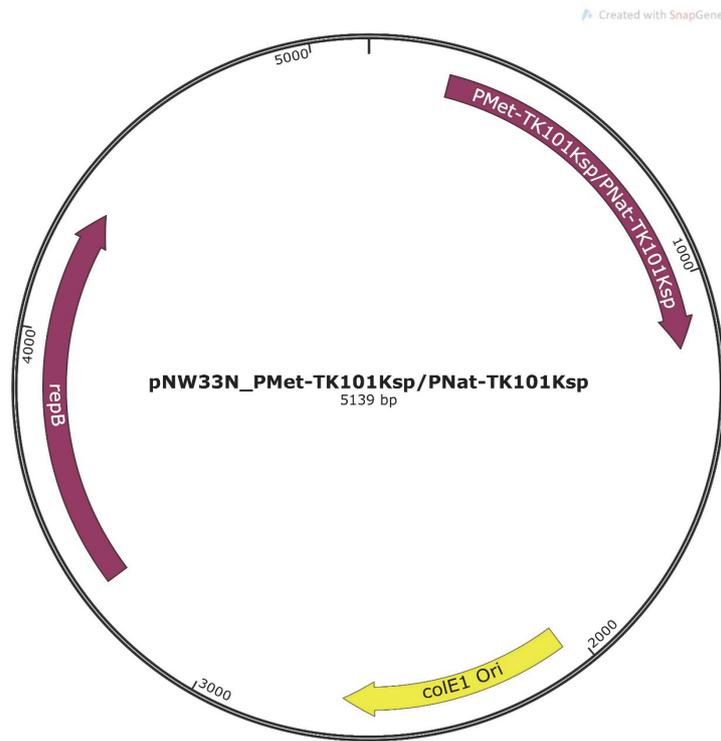


Abb. 57: Plasmidkarte von pNW33N_PMet-TK101Ksp bzw. _PNat-TK101Ksp.