

**Etablierung mobiler genetischer Elemente zur Transplantation
extrazellulärer Elektronentransportketten**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

DISSERTATION

von

Laura-Alina Philipp

1. Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2021

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen

Beblawy, S.; Philipp, L.-A.; Gescher, J. (2020) Accelerated Electro-Fermentation of Acetoin in *Escherichia coli* by Identifying Physiological Limitations of the Electron Transfer Kinetics and the Central Metabolism. *Microorganisms* 2020, 8, 1843.

Philipp, L.-A., Edel, M., Gescher, J. (2020). Genetic engineering for enhanced productivity in bioelectrochemical systems. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 111.

Arinda, T., Philipp, L.-A., Rehnlund, D., Edel, M., Chodorski, J., Stöckl, M., Holtmann, D., Ulber, R., Gescher, J., Sturm-Richter, K. (2019). Addition of Riboflavin-Coupled Magnetic Beads Increases Current Production in Bioelectrochemical Systems via the Increased Formation of Anode-Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 126.

Costa N. L., Clarke T. A., Philipp, L.-A., Gescher J., Louro R. O., Paquete C. M. (2018). Electron transfer process in microbial electrochemical technologies: the role of cell-surface exposed conductive proteins. *Bioresource Technology*, Vol 255, P. 308-317

Konferenzbeiträge

- 10/2019 ISMET7, International society for microbial electrochemistry and technology, global conference, Okinawa (JP) – Posterpräsentation “Improving electrode-assisted fermentation of platform chemicals in *Escherichia coli*”.
- 07/2019 3rd MEEP Symposium, Microbial and Enzymatic Electrochemistry Platform, European Fuel Cell Forum, Luzern (CH) – Vortrag “Improving electrode-assisted fermentation of platform chemicals in *Escherichia coli*”.
- 03/2019 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Wolfsburg – Posterpräsentation „Electrode-assisted Fermentation of Platform Chemicals in *Escherichia coli* and *Shewanella oneidensis*”.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
I. Einleitung.....	1
1. Grundlagen des extrazellulären Elektronentransports.....	1
1.1. Extrazellulärer Elektronentransport in <i>Shewanella oneidensis</i>	3
2. Transplantation extrazellulärer Elektronentransferketten	8
2.1. Möglichkeiten zur Optimierung transplantiertter EET-Ketten durch Adressierung assoziierter Faktoren.....	11
3. Anoden-gestützte Fermentationen	20
4. <i>Escherichia coli</i> als Produktionsorganismus.....	22
5. Zielsetzung der Arbeit.....	24
II. Material und Methoden	26
1. Verwendete Mikroorganismen.....	26
2. Verwendete Chemikalien und Enzyme	28
3. Kulturmedien, -bedingungen und allgemeine Handhabung	28
3.1. Medien zur Kultivierung.....	30
3.2. Zellernte.....	33
3.3. Stammkonservierung	33
4. Molekularbiologische Methoden.....	33
4.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....	35
4.2. Synthese von cDNA	36
4.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	36
4.4. Sanger-Sequenzierung	39
4.5. Brückensynthese-Sequenzierung (Illumina).....	40
4.6. Restriktion und Ligation	40

4.7. <i>Agarosegelelektrophorese</i>	42
4.8. <i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	43
4.9. <i>Klonierungsmethoden</i>	43
4.10. <i>Herstellung kompetenter Zellen und Transformation</i>	44
4.11. <i>Herstellung einer Fosmid-Bibliothek</i>	45
5. <i>Protein-biochemische Methoden</i>	46
5.1. <i>Zellfraktionierung</i>	46
5.2. <i>Protein-Quantifizierung</i>	47
5.3. <i>Sodium dodecyle sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>	47
<i>(SDS-PAGE)</i>	47
5.4. <i>Proteinfärbung</i>	49
5.5. <i>Western-Blotting</i>	49
5.6. <i>Immunodetektion</i>	50
5.7. <i>Ganzzell pull-down Assay</i>	51
6. <i>Funktionsanalyse</i>	52
6.1. <i>Anthraquinon-2,6-disulfonat-Reduktionsassay</i>	52
6.2. <i>Eisen-Reduktionsassay</i>	53
6.3. <i>Methylenblau-Reduktionsassay</i>	53
6.4. <i>Anoden-gestützte Fermentation</i>	54
7. <i>Chemische Analytik</i>	56
7.1. <i>Quantifizierung von Acetoin</i>	56
7.2. <i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i>	56
7.3. <i>Hämquantifizierung</i>	57
7.4. <i>Quantifizierung isoprenoider Chinone</i>	58
III. <i>Ergebnisse</i>	59
1. <i>Systematische Untersuchungen des Minimalsetups sowie EET-assoziiertes Faktoren im Hinblick auf die Funktionalität einer transplantierten EET-Kette</i>	59
1.1. <i>Steigerung der AQDS-Reduktionsraten in E. coli</i>	59
1.2. <i>Heterologe Synthese von Menachinon-7</i>	62
1.3. <i>Heterologe Expression der ccm-Gene</i>	66
1.4. <i>Heterologe Expression der TISS-Gene</i>	72
1.5. <i>Integration aller untersuchter Module in einen E. coli-Stamm</i>	79
1.6. <i>Erstellung, Expression und Selektion einer Fosmid-Bibliothek</i>	80

2.	Evaluierung des Einflusses der Elektronentransferraten im Bezug auf die Limitierung eines <i>E. coli</i> -Produktionsstamms in Anoden-gestützten Fermentationen.....	88
IV.	Diskussion	93
1.	Analyse des Einflusses heterolog exprimierter Proteine des EETs	93
2.	Analyse des Einflusses von MK-7 in <i>E. coli</i>	95
3.	Analyse des Einflusses des heterolog exprimierten <i>ccm</i> -Operons.....	99
4.	Analyse des Einflusses des heterolog exprimierten <i>gsp</i> -Operons.....	101
5.	Analyse des Einflusses einer Kombination aller untersuchten Module	104
6.	Evaluierung eines <i>gain-of-fuction</i> Screenings nach weiteren Faktoren des EETs.....	106
7.	Evaluierung möglicher Limitierungen der Leistungsfähigkeit eines Produktionsstamms.....	112
8.	Zusammenfassung und Ausblick.....	114
V.	Literatur	117
VI.	Danksagung	140

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AHT	Anhydrotetrazyklin
AK	Antikörper
BES	Bioelektrochemisches System
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CE	Coulomb-Effizienz
DMSO	Dimethylsulfoxid
EET	Extrazellulärer Elektronentransfer
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl--D-thiogalactopyranosid
MB	Methylenblau
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
OD ₆₀₀	Optische Dichte mit $\lambda = 600$
RT	Raumtemperatur
SHE	Standard-Wasserstoff-Elektrode
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Forschung im Bereich der Bioelektrochemie stellt neue einzigartige Möglichkeiten zur Untersuchung und Nutzung mikrobieller Physiologie bereit. Dabei eröffnet sie Anwendungen im Bereich nachhaltiger Fermentationsroutinen, dezentraler Mediation von Umweltkontaminationen sowie im Bereich der Biosensorik. Im Zentrum steht dabei stets die Interaktion zwischen Mikrobe und Elektrode. In Elektroden-gestützten Fermentationen katalysieren Mikroorganismen unter anoxischen Bedingungen den Elektronentransfer auf die Anode eines bioelektrochemischen Systems (BES). So können Produktionsroutinen zur Synthese von Plattformchemikalien mit der Gewinnung elektrischer Energie einhergehen. Außerdem profitieren diese Prozesse von dem typischerweise hohen Verhältnis kataboler zu anaboler Substratnutzung. Ein grundlegendes Verständnis des extrazellulären Elektronentransfers (EET) ist notwendig, um Stämme zu etablieren, die den industriellen Anforderungen entsprechen. Durch schrittweise Transplantation der EET-Kette des nativen exoelektrogenen Modellorganismus *Shewanella oneidensis* (*S. oneidensis*) in den Wirtsorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden in dieser Arbeit die Elektronentransferschritte individuell analysiert und der Einfluss assoziierter Faktoren ermittelt. Dazu konnte das putative minimale Proteinsset, bestehend aus den *c*-Typ Cytochromen CymA, STC, MtrA und MtrC sowie dem β -barrel-Protein MtrB, in unterschiedlichen Ausbaustufen heterolog exprimiert und diese hinsichtlich ihrer Reduktionsraten mit *S. oneidensis*-Stämmen mit ähnlichen relevanten Proteinsets verglichen werden. Daraus wurde ersichtlich, dass die Transplantation heterologer EET-Ketten mit enorm verringerten Elektronentransferraten im Vergleich zu denen nativer exoelektrogener Mikroorganismen einhergeht. Davon ausgehend wurden weitere genetische Elemente identifiziert und integriert, welchen durch Protein-Maturation, -Lokalisation und -Funktionalität eine mutmaßliche indirekte Beteiligung am EET zugeschrieben wird. Insbesondere ging es dabei um das hochkomplexe Cytochrom *c*-Reifungssystem, die Biosynthese von Menachinon-7 sowie das Typ-II-Sekretionssystem. Letzteres ermöglichte erstmalig die korrekte Lokalisation der terminalen Reduktase MtrC durch Sekretion auf die Zelloberfläche. Dennoch waren die dadurch gesteigerten Reduktionsraten nicht kompetitiv mit Reduktionsraten in *S. oneidensis*. Diese Daten deuten darauf hin, dass die EET-Prozesse weitaus komplexer sind als bisher angenommen. Aus diesem Grund wurde anschließend ein *gain-of-function* Screen auf Basis einer *S. oneidensis* Fosmid-Bibliothek

etabliert, über den weitere putative Faktoren für einen verbesserten EET identifiziert werden konnten.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Übersicht über beschriebene Elektronentransfermechanismen.....	2
Abb. 2: Theoretisches Minimalset des EETs in <i>Shewanella oneidensis</i>	6
Abb. 3: Schematische Darstellung der Reifung von <i>c</i> -Typ Cytochromen über das Cytochrom <i>c</i> -Reifungssystem..	13
Abb. 4: Schematische Darstellung der Sekretion von Proteinen über das TIISS.....	16
Abb. 5: Prinzip der konventionellen und Anoden-gestützten Fermentation.....	17
Abb. 6: Schematische Darstellung des <i>E. coli</i> Produktionsstamms zur Anoden-gestützten Acetoin-synthese.....	19
Abb. 7: Maximale AQDS-Reduktionsraten verschiedener <i>E. coli</i> - (a) und <i>S. oneidensis</i> -Sämme (b).....	52
Abb. 8: Übersicht über den Chinongehalt der Stämme JG1359 und JG1673.....	60
Abb. 9: Untersuchungen zu Wachstum und AQDS-Reduktion in Abhängigkeit von MK-7.....	55
Abb. 10: Relative AQDS-Rate eines <i>E. coli</i> MK-7-Stamms	56
Abb. 11: Hämgruppen-Färbung und Bestimmung des Hämgehalts der Periplasma- und Membranfraktionen von JG1359 und JG1679.....	58
Abb. 12: Immunodetektion den Membranfraktionen von JG1359 und JG12.....	59
Abb. 13: Immunodetektion und Quantifizierung in den Membranfraktionen von JG1359 und JG1679.....	60
Abb. 14: Relative AQDS-Rate eines <i>E. coli ccmS.oneidensis</i> -Stamms.....	61
Abb. 15: Ergebnis der analytischen PCR zur Untersuchung der Transkription der TIISS-Gene heterolog aus <i>S. oneidensis</i> in <i>E. coli</i> exprimiert.....	63
Abb. 16: Untersuchung der Expression und der Funktionalität von MtrC _{snap}	64
Abb. 17: Verhältnis der Stämme nach pull-down mittels <i>SNAP-Capture Magnetic Beads</i>	66
Abb. 18: Relative AQDS-Rate eines <i>E. coli</i> TIISS _{<i>S.oneidensis</i>} -Stamms	67
Abb. 19: Relative AQDS-Rate eines <i>E. coli</i> MK-7, <i>ccmS.oneidensis</i> , TIISS _{<i>S.oneidensis</i>} -Stamms.....	69
Abb. 20: Leistungsfähigkeit der selektierten Fosmid-Konsortien im BES.....	72
Abb. 21: Coulomb-Effizienz der Elektroden-gestützten Fermentationen der Fosmid-Konsortien und der entsprechenden Kontrollen.....	73
Abb. 22: Ergebnisse des Methylenblau-Reduktionsassays mit 273 µM Methylenblau.....	75
Abb. 23: Chronoamperometrische Messung von JG1295 und JG1397.....	76
Abb. 24: Auswertung der Elektroden-gestützten Fermentation von JG1295 und JG1397.....	77
Abb. 25: Übersicht über die Struktur unterschiedlicher MK- und UK-Spezies.....	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.....	24
Tab. 2: Liste verwendeter Komplementationslösungen.....	27
Tab. 3: Zusammensetzung verwendeter Komplexmedien (LB-/ SOC-Medium) zur Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>S. oneidensis</i>	28
Tab. 4: Zusammensetzung des M9-Mediums.....	29
Tab. 5: Zusammensetzung des M4-Mediums.....	29
Tab. 6: Zusammensetzung des 100x Konzentrats der Spurenelemente.....	29
Tab. 7: Zusammensetzung des MOPS-gepufferten Mediums.....	30
Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	31
Tab. 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und abgeleiteten Oligonukleotide.....	33
Tab. 10: Zusammensetzung der 5x konzentrierten Stammlösung der isothermalen in-vitro-Ligation.....	37
Tab. 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der isothermalen in-vitro-Ligation.....	37
Tab. 13: Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers.....	38
Tab. 14: Komponenten des Trenngels für 1 Gel, 12 % Acrylamid (w/v).....	43
Tab. 15: Komponenten des Sammelgels für 1 Gel, 4 % Acrylamid (w/v).....	43
Tab. 16: Komponenten des SDS-Laufpuffers (pH 5,8).....	43
Tab. 17: Komponenten des 6x SDS-Ladepuffers.....	44
Tab. 18 Wasch- und Fixierschritte zur spezifischen Hämgruppenfärbung.....	44
Tab. 19: Komponenten des Blotting-Puffers.....	45
Tab. 20: Behandlungsschritte der Trägermembran zur Proteindetektion.....	46
Tab. 21: Komponenten der verwendeten Waschlösung (pH 7,5) für die Immunodetektion.....	47
Tab. 22: Komponenten der Ferrozine-Lösung zum quantitativen Eisen(II)-Nachweis.....	49
Tab. 23: Komponenten des Reaktionsmix zur Quantifizierung von Acetoin.....	51
Tab. 24: Auf den Fosmiden kodierte Gene mit deren annotierter Funktion.....	85
Tab. 25: Genomisch auftretende Mutationen des adaptierten Konsortiums mit Häufigkeit und Funktion.....	87

I. Einleitung

Eine Verlagerung von petrochemischer hin zu einer biobasierten Wirtschaft ist unabdingbar für die Gestaltung einer nachhaltigen Zukunft (BMBF und BMEL, 2020). Ein zentraler Pfeiler dieses Wandels ist eine Umstrukturierung der chemischen Industrie bzw. deren Rohstoffbasis. Um diese langfristig unabhängig von endlichen fossilen Ressourcen zu gestalten, stellt ein zentrales Element die biotechnologische Produktion von Plattformchemikalien dar (Shafiee und Topal, 2009; Martins *et al.*, 2019; Prognos AG und Verband der Chemischen Industrie e. V., 2017). Unter diesem Gesichtspunkt sind BES ein neuartiges, hoch interessantes Werkzeug im Bereich der Biotechnologie. In BES können Mikroorganismen als Biokatalysatoren für die Produktion von Biokraftstoffen, Plattformchemikalien und anderen wertschöpfenden Verbindungen verwendet werden (Flynn *et al.*, 2010). Dabei ist ein Vorteil gegenüber herkömmlichen Fermentationsroutinen die Gewinnung elektrischer Energie als Nebenprodukt.

Entscheidend für diese Art der Prozessführung ist die Interaktion des fermentierenden Organismus mit der Elektrode. Grundlage für Anwendungen mit direkter Interaktion zwischen Elektrode und Mikroorganismus, unabhängig von der Zugabe weiterer Mediatoren, ist die Fähigkeit zum EET. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde in den vergangenen Jahren eingehend untersucht, sodass ein weitgehendes Verständnis sowie Möglichkeiten zur Verbesserung von EET-Prozessen vorhanden sind. Obwohl die generelle Machbarkeit bioelektrochemischer Prozesse in den letzten Jahren demonstriert werden konnte, ist die Weiterentwicklung der entsprechenden Biokatalysatoren, sowie des fundamenalen Verständnisses der zugrundeliegenden biochemischen Prozesse ein wichtiger Aspekt aktueller Forschung (Bursac *et al.*, 2017; Förster *et al.*, 2017).

1. Grundlagen des extrazellulären Elektronentransports

Die Fähigkeit zum EET bezeichnet das Vermögen, respiratorisch anfallende Elektronen auf lösliche oder unlösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren zu transferieren. Dieser Mechanismus ist für eine Reihe von Mikroorganismen beschrieben. Um terminale

Elektronenakzeptoren im Extrazellularraum zu reduzieren, entwickelten diese sogenannten exoelektrogenen Mikroorganismen unterschiedliche Strategien (Logan, 2009; Richter *et al.*, 2012). Im Falle Gram-negativer Organismen werden Elektronen dazu über die innere Membran, durch den periplasmatischen Raum sowie die äußere Membran transportiert (Hernandez und Newman, 2001). Der Elektronentransfer erfolgt typischerweise über mehrere membrangebundene und periplasmatisch vorliegende *c*-Typ Cytochrome (Coursolle und Gralnick, 2010; Richter *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2015; Beblawy *et al.*, 2018). Die Fähigkeit zum EET ist jedoch nicht ausschließlich auf Gram-negative Organismen beschränkt, sondern wurde auch für Gram-positive Organismen, Archaea, Mikroalgen und Pilze beschrieben (Logan, 2009; Koch und Harnisch, 2016; Salar-García *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2018; Light *et al.*, 2018).

Dabei ermöglichen diejenigen Atmungsprozesse, welche einen Elektronentransfer zur Zelloberfläche voraussetzen, die Besiedelung anoxischer Lebensräume, in denen unlösliche bzw. nicht-membrangängige terminale Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen. Bei diesen Elektronenakzeptoren handelt es sich häufig um mineralische Metalloxide wie Fe(III) oder Mn(IV), die von exoelektrogenen Mikroorganismen als Substrat der Atmungskette genutzt werden können (Lovley und Phillips, 1988).

Die initiale Beobachtung, dass Mikroorganismen in der Lage sind, unlösliche Elektronenakzeptoren zu reduzieren, war außerdem Ausgangspunkt für Untersuchungen hin zur Nutzung dieses Potenzials in angewandten Prozessen – in sogenannten BES. Hier übertragen diese Organismen respiratorische Elektronen auf zur Verfügung gestellte Elektroden (Rabaey und Verstraete, 2005). Derzeit gelten fast 100 Mikroorganismen aus den Domänen der Bakterien und Archaea, aufgrund ihrer Fähigkeit mit einer Elektrode als terminaler Elektronenakzeptor zu interagieren bzw. Elektronen von einer Elektrode zu beziehen als elektroaktiv (Costa *et al.*, 2018). Elektroaktive Mikroorganismen haben unterschiedliche Elektronentransfer-mechanismen etabliert, welche schematisch in Abbildung 1 dargestellt sind und sich prinzipiell in drei Gruppen unterteilen lassen. (I) Einige Organismen sind in der Lage, Elektronen direkt auf eine Elektrode zu übertragen (Clarke *et al.*, 2011). Dazu darf der Abstand zwischen terminaler Reduktase und unlöslichem Elektronenakzeptor nur ca. 10 Å betragen (Neal *et al.*, 2003; Kerisit *et al.*, 2007). (II) Darüber hinaus sind einige Organismen in der Lage, leitfähige Biofilme zu bilden. In diesen Biofilmen findet der Elektronentransfer mit Hilfe von löslichen Cytochromen, leitfähigen Zellappendizes (engl. *nanowires*) oder anderen Elektronen-

shuttling-Molekülen, welche in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind, statt (Reguera *et al.*, 2005; Sure *et al.*, 2016; Lovley und Walker, 2019; Lies *et al.*, 2005; Gorby *et al.*, 2006; El-Naggar *et al.*, 2010; Pirbadian *et al.*, 2014). (III) Eine dritte Möglichkeit ist die Synthese und Sekretion löslicher Redox-*shuttles*, wie beispielsweise Riboflavin, oder die Verwendung exogener *shuttle*-Moleküle (Gralnick und Newman, 2007; Marsili *et al.*, 2008; Velasquez-Orta *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Kotloski und Gralnick, 2013). Darüber hinaus können Metalle über die Sekretion von Metallchelatoren gelöst und der chelatisierte, gelöste Akzeptor anschließend an der Zelloberfläche reduziert werden (Jones *et al.*, 2010; Kouzuma *et al.*, 2012).

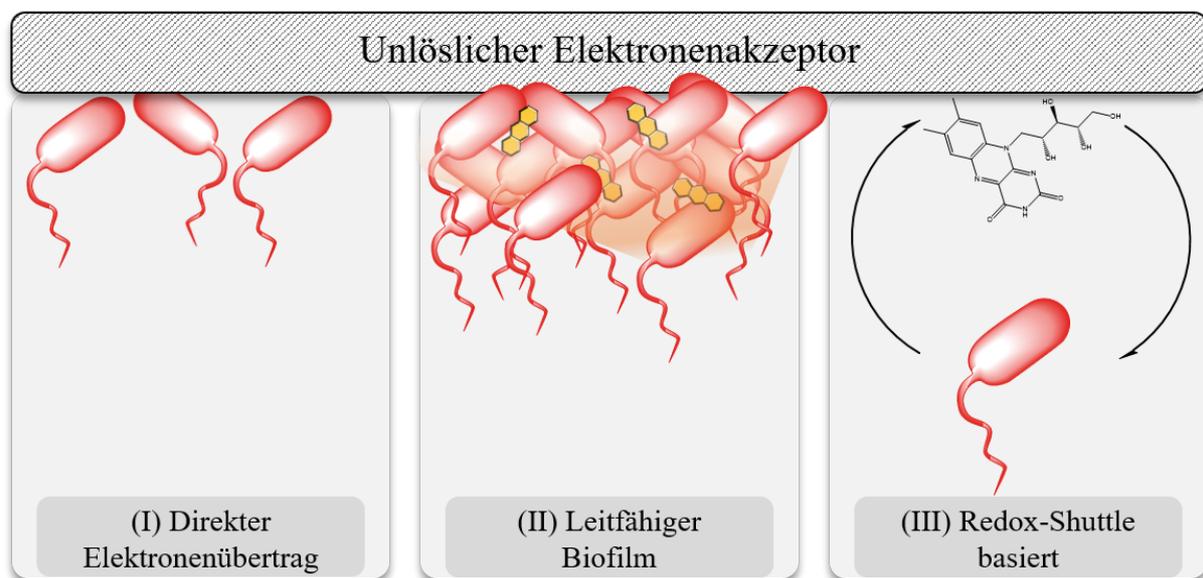


Abb. 1: Schematische Übersicht über beschriebene Elektronentransfermechanismen: (I) Direkter Elektronenübertrag, bei dem die Mikroorganismen (rot) in räumlicher Nähe zum entsprechenden Akzeptor sein müssen. (II) Mikroorganismen im leitfähigen Biofilm. In der extrazellulären Matrix (orange) können *shuttle*-Moleküle (gelb) eingebettet sein, welche die Leitfähigkeit erhöhen. (III) Mikroorganismen, welche über endogene (hier Riboflavin) oder exogene *shuttle*-Moleküle Elektronen auf den jeweiligen Akzeptor übertragen.

1.1. Extrazellulärer Elektronentransport in *Shewanella oneidensis*

Ein Organismus, in dem die dargelegten unterschiedlichen Elektronentransfermechanismen besonders detailliert untersucht wurden, ist *S. oneidensis* MR-1. Der Modellorganismus ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes γ -Proteobakterium (Tikhonova und Popov, 2014). Als Mangan-Reduzierer wurde der obligat respiratorische Organismus erstmals aus dem Oneida-

See in den USA isoliert (Myers und Nealson, 1988). *S. oneidensis* verfügt über ein außerordentlich vielseitiges Repertoire an anaeroben Elektronentransferwegen. Neben Sauerstoff, Fumarat, Nitrat, Nitrit, Dimethylsulfoxid (DMSO), Sulfid, Trimethylamin-N-oxid (TMAO) kann *S. oneidensis* unlösliche Metalloxide wie Fe(III) und Mn(IV) reduzieren (Myers und Nealson, 1988; Nealson und Saffarini, 1994; Venkateswaran *et al.*, 1999; Beliaev *et al.*, 2001; Heidelberg *et al.*, 2002; Bretschger *et al.*, 2007). Als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle nutzt *S. oneidensis* kurzkettige Carboxylsäuren wie Lactat, Pyruvat, Succinat und Fumarat (Myers und Nealson, 1988; Venkateswaran *et al.*, 1999; Scott und Nealson, 1994). Um extrazelluläre Elektronenakzeptoren zu reduzieren, ist *S. oneidensis* auf ein Netzwerk von *c*-Typ Cytochromen angewiesen, welches das Periplasma sowie innere und äußere Membran durchspannt. Insgesamt finden sich im Genom von *S. oneidensis* 41 Gene welche potentiell *c*-Typ Cytochrome kodieren. Davon sind mutmaßlich 14 membrangebunden (neun in der Cytoplasmamembran, fünf in der äußeren Membran) und 27 im Periplasma lokalisiert (Meyer *et al.*, 2004; Romine *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010). Durch Expressions- bzw. Deletionsstudien konnte die Redundanz einiger *c*-Typ Cytochrome gezeigt, unterschiedliche Elektronentransportketten/-routen identifiziert, sowie ein mutmaßliches Minimalset an Proteinen beschrieben werden (Abbildung 2), welches *S. oneidensis* zum EET bzw. zur Anodeninteraktion befähigt (Beliaev und Saffarini, 1998; Myers und Myers, 2000; Beliaev *et al.*, 2001; Myers und Myers, 2001; Myers und Myers, 2002; Bretschger *et al.*, 2007 Hartshorne *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2015).

Demnach werden Elektronen aus dem Menachinonpool zunächst über das 20,8 kDa große, **cytoplasmatische Membranprotein A (CymA)**, ein tetrahäm *c*-Typ Cytochrom der Gruppe der QH₂-Dehydrogenasen aus der NapC/NirT-Familie ins Periplasma übertragen (Schwalb *et al.*, 2003; McMillan *et al.*, 2012). Dabei ist CymA nicht nur am Elektronenübertrag auf Fe(III) oder eine Anode beteiligt, sondern stellt darüber hinaus den Hauptknotenpunkt für die Verteilung respiratorischer Elektronen an diverse Elektronentransportketten dar. Über diese werden anschließend beispielsweise Fumarat, DMSO, Nitrat oder Nitrit reduziert (Myers und Myers, 2000; Schwalb *et al.*, 2002a; Schwalb *et al.*, 2002b; Schwalb *et al.*, 2003). CymA ist dazu über einen N-terminalen, α -helikalen Transmembrananker in der Cytoplasmamembran lokalisiert und ragt mit der globulären Tetrahäm-domäne in den periplasmatischen Raum. In *S. oneidensis* wird CymA konstitutiv basal exprimiert, wobei die Expression unter anoxischen

Bedingungen zunehmen kann. Frühe Untersuchungen konnten zeigen, dass die Abwesenheit von CymA zu einem Verlust der Fähigkeit zur Eisen-, Fumarat- und Nitrat-Atmung führt. Außerdem ist CymA für das Wachstum mit DMSO (Dimethylsulfoxid) oder Nitrit als Elektronenakzeptor notwendig. (Myers und Myers 1997; Myers und Myers 2000; Gescher *et al.*, 2008; Schuetz *et al.*, 2009; Marritt *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2012).

Da der Abstand von 235 Å zwischen innerer und äußerer Membran zu groß ist, um einen direkten Elektronentransfer zwischen den beiden Membranen zu ermöglichen, ist *S. oneidensis* auf lösliche periplasmatische *c*-Typ Cytochrome, wie **STC** (*small tetraheme cytochrome*) mit einem Molekulargewicht von nur 12,9 kDa und/oder FccA (*fumarate reductase*) (65 kDa) als periplasmatische Elektronen-*shuttles* angewiesen (Leys *et al.*, 2002; Schütz *et al.*, 2009; Dohnalkova *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2015). Das tetrahäm *c*-Typ Cytochrom STC liegt gelöst im Periplasma vor und kann dort Elektronen von CymA aufnehmen und an eine große Anzahl von terminalen Oxidoreduktasen verteilen (Alves *et al.*, 2015). Dabei können FccA und STC aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung nicht miteinander interagieren, jedoch konkurrieren die beiden Cytochrome gemäß Strukturanalysen um die Bindestelle an MtrA (Fonseca *et al.*, 2013). FccA weist gegenüber STC zwar eine stärkere Affinität zum gemeinsamen Interaktionspartner MtrA auf, allerdings resultierte eine Deletion von *fccA*, in einem Phänotyp mit gesteigerten Fe(III)-Reduktionsraten relativ zu denen des Wildtyps (Schuetz *et al.*, 2009). Möglicherweise ist durch die höhere Affinität von FccA zu MtrA auch die Stabilität des resultierenden Komplexes erhöht wodurch eine Dissoziation nach Elektronenübertrag verlangsamt und somit die Quantität des Elektronentransfers eingeschränkt sein könnte (Fonseca *et al.*, 2013).

Der Elektronentransfer durch die äußere Membran wird über einen trimeren Porin-Cytochrom-Komplex vermittelt, welcher die äußere Membran durchspannt und die Elektronen von den periplasmatischen *c*-Typ Cytochromen STC und FccA auf terminale Elektronenakzeptoren transferiert. Dieser sogenannte **MtrCAB-Komplex** (*metall reducing*) besteht aus den beiden *c*-Typ Cytochromen MtrC (83 kDa) und MtrA (32 kDa) sowie dem β -barrel Protein MtrB (76 kDa), das mutmaßlich eine Pore in der äußeren Membran bildet und so die Interaktion zwischen MtrA auf der periplasmatischen Seite und MtrC auf der Zelloberfläche ermöglicht (Myers und Myers, 1997; Beliaev und Saffarini 1998; Pitts *et al.*, 2003; Hartshorne *et al.*, 2009;

Edwards *et al.*, 2018; Edwards *et al.*, 2020). Auch genomisch sind *mtrCAB* in *S. oneidensis* unter einem Promotor in einem polycistronischen Operon organisiert, was für ein enges Zusammenspiel ebendieser Proteine spricht (Beliaev *et al.*, 2001; Pitts *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2007; Hartshorne *et al.*, 2009). Das decahäm Cytochrom MtrA kann *in vivo* sowohl gebunden an MtrB als auch dissoziiert im Periplasma vorliegen, wobei MtrA zwar *in vitro* von CymA reduziert werden kann, *in vivo* jedoch lediglich eine Reduktion in Anwesenheit von STC oder FccA stattfindet (Beliaev *et al.*, 2001; Pitts *et al.*, 2003; Bretschger *et al.*, 2007; Hartshorne *et al.*, 2007; Schuetz *et al.*, 2009; Schicklberger *et al.*, 2013; White *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2015). Da in *mtrA*- Deletionsmutanten kein MtrB detektiert werden kann, wird MtrA außerdem eine Chaperon-Rolle zugesprochen, mittels derer das β -barrel Protein MtrB bei der Maturation und Integration in die äußere Membran unterstützt wird (Hartshorne *et al.*, 2009; Schicklberger *et al.*, 2011; Stephan, 2015; Marin, 2020). MtrB ist ein β -barrel Protein, das über 28 Transmembrandomänen verfügt, wobei die Kristallstruktur von MtrB aus *Shewanella baltica* nahelegt, dass von den 28 nur 26 der Transmembrandomänen die äußere Membran durchspannen und so eine Pore bilden (Beliaev und Saffarini, 1998; Shi *et al.*, 2012; Edwards *et al.*, 2020). Diese Kristallstruktur zeigt außerdem, dass sich die durch MtrB gebildete Pore Richtung Zelloberfläche von 30 Å auf der periplasmatischen Seite zu 15 Å an der Zelloberfläche verjüngt, wodurch MtrA zwar in MtrB eindringen, jedoch nicht in den Extrazellularraum diffundieren kann. An der Zelloberfläche wird MtrA von den extrazellulären *loops* von MtrB weitestgehend abgeschirmt, sodass nur die Aminosäure-Reste AS284 - AS306 und eines der zehn Häme mit MtrC interagieren (Edwards *et al.*, 2020). Die terminale Reduktase MtrC ist ebenfalls ein decahäm *c*-Typ Cytochrom. MtrC verfügt über einen Lipidanker, über den es nach erfolgter Sekretion durch das Typ-II-Sekretionssystem in der Außenseite der äußeren Membran verankert ist (Shi *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich bei MtrC um eines von fünf äußeren Membrancytochromen (OMCs; *outer membrane cytochromes*) mit teils redundanten Aktivitäten. So ist beispielsweise die Fähigkeit, Eisen- und Manganoxide zu reduzieren, bei *mtrC*-Deletionsmutanten lediglich um ca. 85-90 % verringert (Myers und Myers, 2002; Bücking *et al.*, 2010; Coursolle und Gralnick, 2012).

OmcA ist als zweite terminale Reduktase lose an MtrC auf der Zelloberfläche lokalisiert. (Shi *et al.*, 2006). Beide *c*-Typ Cytochrome enthalten Flavin-Cofaktoren, welche den terminalen Elektronentransferschritt beschleunigen und über die Bildung von Semichinonen einen Ein-Elektronentransport ermöglichen (Okamoto *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2014 a; Okamoto

et al., 2014 b; Xu *et al.*, 2016; Babanova *et al.*, 2017). OmcA scheint jedoch vor allem für die Manganoxid-Reduktion von Bedeutung zu sein, da der Deletions-Phänotyp bei anderen extrazellulären Elektronenakzeptoren minimal ist (Myers und Myers, 2001; Coursolle und Gralnick, 2010; Neto *et al.*, 2017; Beblawy *et al.*, 2018).

In *S. oneidensis* Mutanten mit Deletionen in Genen aller OMCs konnte außerdem eine Suppressormutante identifiziert werden, welche den Phänotyp des Verlusts äußerer Membrancytochrome partiell kompensieren kann. In dieser Mutante trat jeweils ein Aminosäureaustausch in MtrA (AS869 C→A) und MtrB (AS656 C→A) auf. Dies führt mutmaßlich zu einer veränderten Konformation beider Proteine, sodass MtrA^s weiter durch MtrB^s in den extrazellulären Raum ragen kann. Reduktionsassays mit der entsprechenden Mutante zeigten, dass lösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren wieder reduziert werden können. Im Falle von Fe(III)-Citrat findet die Reduktion sogar auf annähernd wildtypischem Niveau (84 %) statt (Bücking *et al.*, 2012).

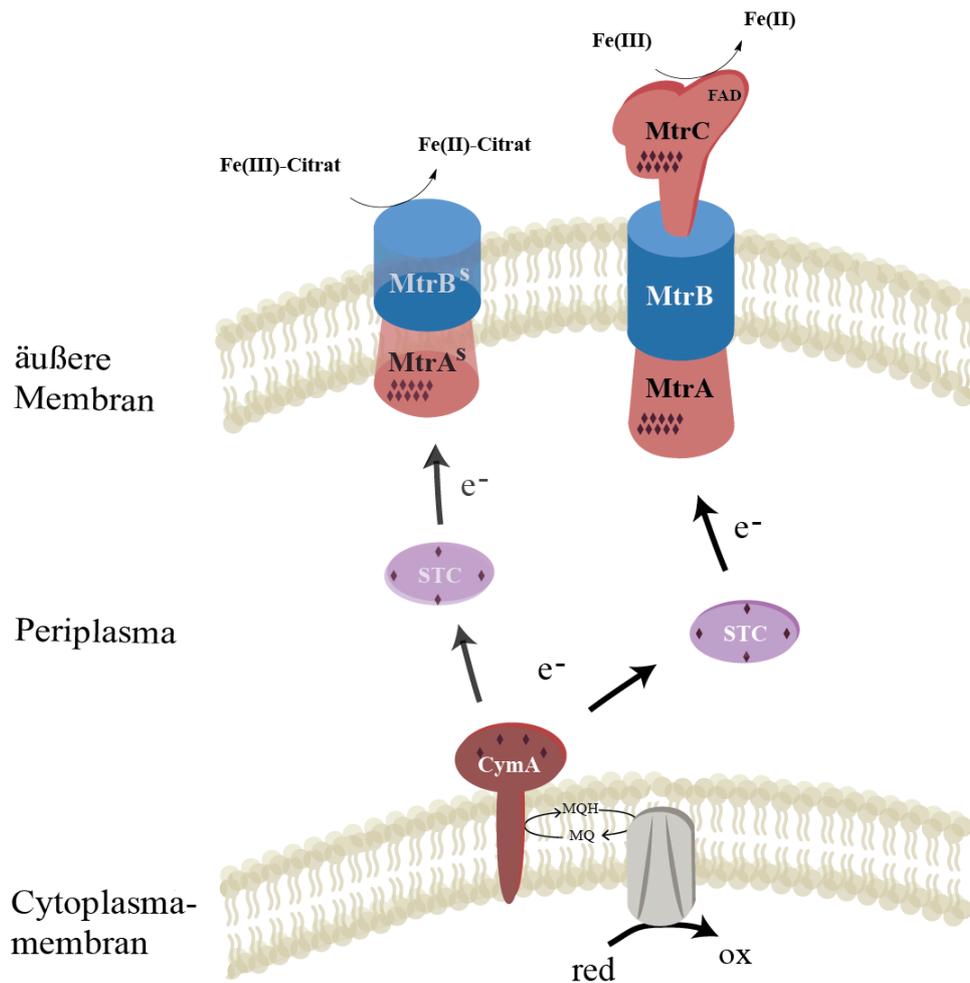


Abb. 2: Theoretisches Minimalset des EETs in *S. oneidensis*: Respiratorisch anfallende Elektronen werden in den Menachinonpool eingespeist und von dort über CymA auf STC übertragen. Anschließend werden die Elektronen über den MtrCAB-Komplex auf die Oberfläche der äußeren Membran transferiert und dort auf (un)lösliche Elektronenakzeptoren übertragen. Eine Suppressormutante, MtrAB^s, kompensiert den Verlust von MtrC partiell und lösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren wie Fe(III)-Citrat können ohne Anwesenheit äußerer Membancytochrome reduziert werden. Rauten stellen die Hämgruppen der *c*-Typ Cytochrome dar. Abbildung nach Fonseca *et al.*, (2013) und Bücking *et al.*, (2012).

2. Transplantation extrazellulärer Elektronentransferketten

Neben dem theoretischen Minimalset des EETs gibt es unzählige weitere Elektronentransferrouten, die nur zum Teil beschrieben sind. Erschwert wird eine vollständige Aufklärung dadurch, dass einige Proteine im *c*-Typ Cytochrom-Netzwerk von *S. oneidensis*

partiell überlappende Funktionen aufweisen, weshalb Deletionsmutanten oft keine oder nur geringe phänotypische Auswirkungen im Bezug auf den EET zeigen. Dies erschwert eine vollständige Aufklärung der Grundlagen des EETs maßgeblich (Bretschger *et al.*, 2008). Indem EET-Ketten Stück für Stück transferiert werden, können weitere Funktionen einzelner Proteine aufgeklärt werden. Neben grundlegenden Fragestellungen sind diese Transferansätze aber auch anwendungsorientiert: Durch die hohe Flexibilität und Plasizität des EET-Netzwerks ist *S. oneidensis* einer der vielseitigsten Organismen im Hinblick auf die Nutzung terminaler Elektronenakzeptoren. Trotz dieser außerordentlich großen respiratorischen Vielfältigkeit schränken das begrenzte Substratspektrum sowie relativ geringe Stromdichten dessen Nutzbarkeit als Biokatalysator in bioelektrochemischen Anwendungen stark ein. Gleiches gilt für die meisten anderen exoelektrogenen (Modell-)Organismen. Dies ist ein weiterer Grund, weshalb sich in der Literatur Beispiele finden, in denen Elektronentransportketten aus nativen exoelektrogenen Mikroorganismen in andere Organismen transplantiert werden sollten (TerAvest und Ajo-Franklin, 2015; Philipp *et al.*, 2020). Viele dieser Studien zielen auf die Rekonstruktion der EET-Kette aus *S. oneidensis* in *E. coli* ab, mit dem Ziel, durch Rekonstruktion einer funktionalen Elektronentransportkette das minimale Proteinset für den Elektronentransfer zur Zelloberfläche zu identifizieren und gleichzeitig neuartige Produktionsstämme für Anwendungen in bioelektrochemischen Anwendungen zu etablieren. *E. coli* bietet sich dabei als hervorragender Rezipient an: Der Mikroorganismus wird als Biokatalysator bereits in vielen biotechnologischen Produktions-Routinen eingesetzt, da der Organismus durch die gute genetische Zugänglichkeit einfach auf das entsprechende Anwendungsgebiet angepasst werden kann (Blattner *et al.*, 1997; Schächter, 2001; Liu und Khosla, 2010; Chen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016).

Erste Versuche zeigten, dass eine heterologe Expression von *CymA* in *E. coli* den Organismus dazu befähigt, das Membran-permeable Eisen-Chelat Fe-NTA zu reduzieren (Gescher *et al.*, 2008). Eine Expression von *CymA* und *FccA* führte außerdem zu einer heterologen Komplementierung einer Mutante mit einer Deletion der Fumarat-Reduktase. Anschließend konnte durch Co-Expression von *STC* und *MtrA* die Elektronentransportkette weiter ins Periplasma verlängert werden. Um die äußere Membran zu überbrücken, wurde Methylenblau (MB) als Membran-permeables Redox-*shuttle* zugegeben, wodurch eine Anodeninteraktion ermöglicht wurde (Sturm-Richter *et al.*, 2015). Jensen *et al.* (2010) exprimierten *MtrA* sowie den *MtrCAB*-Komplex in je einem *E. coli*-Stamm. Die Autor:innen konnten zeigen, dass der

Phänotyp eines MtrA-exprimierenden Stamms Fe(III)-Citrat schneller reduzierte als der Wildtyp und der MtrCAB-exprimierende Stamm. Da Fe(III)-Citrat nicht membran-permeabel ist, muss Fe(III)-Citrat dazu zunächst aktiv in die Zelle transportiert werden (Wagegg und Braun, 1981; Bücking *et al.*, 2012). Die höchste Reduktionsrate mit Eisenoxid als Elektronenakzeptor zeigte der Stamm, welcher das gesamte MtrCAB-Gencluster exprimiert gefolgt von Wildtyp und dem Stamm, der lediglich MtrA exprimiert. Dennoch war der Stamm im Vergleich zu *S. oneidensis* bezogen auf die Fe(III)-Citrat-Reduktion um mindestens das 30-fache langsamer, obwohl die Autor:innen zeigen konnten, dass MtrB und MtrC in der Membranfraktion und MtrA im Periplasma lokalisiert war, was darauf hindeutet, dass wichtige Teile der Elektronentransportkette fehlen oder nicht funktionell exprimiert werden. TerAvest *et al.* (2014) integrierten CymA und MtrCAB aus *S. oneidensis* als synthetisches Modul in einem *E. coli*-Stamm. Dieser Ansatz ermöglichte EET in *E. coli* und die Autor:innen erreichten eine 8-fach höhere Stromdichte als in einem *E. coli*-Stamm ohne die entsprechenden heterolog exprimierten Proteine (TerAvest *et al.*, 2014). Die generierten Stromdichten waren jedoch ca. 10-fach niedriger als Stromdichten, die mit *S. oneidensis* erreicht werden können (TerAvest *et al.*, 2014; TerAvest und Ajo-Franklin, 2015). Auch war die Aktivität des *E. coli*-Stammes offenbar nicht von STC oder FccA abhängig, welche wichtige Faktoren für den Elektronentransfer in *S. oneidensis* sind. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass die Expression von *c*-Typ Cytochromen aus *S. oneidensis* in *E. coli* nur zu einer teilweisen Rekonstruktion der Elektronentransferkette auf die Zelloberfläche führt. Bislang ist nicht klar, welche Faktoren zusätzlich notwendig sein könnten, um einen *E. coli*-Stamm mit konkurrenzfähigen Elektronentransferraten bzw. Stromdichten im Vergleich zu *S. oneidensis* zu erhalten.

Es könnte zum einen sein, dass obligate Faktoren der Elektronentransportkette bisher nicht identifiziert wurden, oder aber, dass heterolog exprimierte Proteine entweder nicht funktional oder nicht korrekt lokalisiert sind. Bis *dato* wurden alle transplantierten Gene bzw. Proteine in *loss-of-function Screens* in *S. oneidensis* identifiziert. Sollten jedoch Faktoren unabdingbar für einen funktionalen EET sein, deren Verlust letal für *S. oneidensis* ist, so könnten diese nicht mittels *loss-of-function Screens* identifiziert werden.

Neben der Identifizierung obligater Faktoren für einen funktionalen EET fehlen bislang quantitative Daten zu Menge und Verhältnis synthetisierter *c*-Typ Cytochrome in *E. coli* im Vergleich zu *S. oneidensis*. Dies sollte jedoch unbedingt berücksichtigt werden, denn für einen funktionalen EET, insbesondere in nicht-natvieni exoelektrogenen Mikroorganismen, scheint

eine sorgfältige Steuerung der Überexpression von *c*-Typ Cytochromen eine wichtige Stellschraube zu sein, um Fehlregulationen und Leistungseinbußen zu vermeiden (Goldbeck *et al.*, 2013). Außerdem gibt es Hinweise, dass Teile des bereits identifizierten Minimalsets möglicherweise nicht korrekt lokalisiert bzw. maturiert werden können (Richter, 2014; Stephan, 2015). Obwohl beispielsweise bekannt ist, dass MtrC in *E. coli* exprimiert wird, ist bislang unklar, ob und zu welchem Teil das *E. coli* eigene Typ-II-Sekretionssystem MtrC erkennt und sekretiert oder ob MtrC misslokalisiert ist. Auch in MtrB scheint es einen Faltungsunterschied zwischen nativem MtrB und heterolog in *E. coli* exprimiertem MtrB zu geben (Stephan, 2015; Marin, 2020).

In nicht-nativen exoelektrogenen Mikroorganismen wie beispielsweise *E. coli* ist es bislang nicht möglich, EET-Ketten zu transplantieren bzw. zu rekonstruieren, ohne dass enorme Verluste hinsichtlich der Elektronentransferraten einhergehen. Dies deutet darauf hin, dass das fundamentale Verständnis über die Funktionalität des EETs sowie von Faktoren, die notwendig sind, um die volle Aktivität der beteiligten EET-Komponenten zu gewährleisten, noch immer unzureichend ist.

2.1. Möglichkeiten zur Optimierung transplantierter EET-Ketten durch Adressierung assoziierter Faktoren

Ein Grund für die Verluste hinsichtlich der EET-Raten könnten bisher nicht adressierte Proteine, Proteinkomplexe sowie andere Faktoren, welche für Maturation, Lokalisierung und Funktionalität der bis *dato* identifizierten EET-Proteine verantwortlich sind, sein. Deshalb ist – neben einer Identifizierung des minimalen Proteinsets des EETs – eine Aufklärung über die Beteiligung möglicherweise assoziierter Proteine, die unter Umständen nicht durch homologe Proteine im Zielorganismus kompensiert werden können, unabdingbar.

Maturation von *c*-Typ Cytochromen

Die Reifung von *c*-Typ Cytochromen wird in Prokaryoten über das Cytochrom *c*-Reifungssystem (*cytochrome c maturation, ccm*) vermittelt. Während der Reifung werden Cytochrome transloziert, extracytoplasmatisch maturiert und kovalent mit den entsprechenden Hämgruppen verknüpft. In Gram-negativen Organismen wie *E. coli* und *S. oneidensis* werden zunächst alle Apocytochrome im Cytoplasma synthetisiert und anschließend über das Sec-

Translokon (engl. *secretory*) ins Periplasma transloziert (Thöny-Meyer 1997; Kranz *et al.*, 2002; Facey und Kuhn, 2010; Stevens *et al.*, 2011). Die eigentliche Reifung der *c*-Typ Cytochrome findet durch drei hochkonservierte Module statt und ist in Abbildung 3 dargestellt. Zwei der Module bereiten und liefern Häm und Apoprotein an ein drittes Modul, welches die Häm-Apoprotein-Ligation katalysiert (Verissimo und Daldal, 2014).

Der CcmABCD-Komplex transportiert Häm b ins Periplasma und belädt dort das Häm-Chaperon CcmE. Dabei ist CcmA ein peripheres Membranprotein mit einer typischen ATP-Bindestelle. CcmB und CcmC sind integrale Membranproteine mit je sechs Transmembranhelices. CcmC gehört zur Familie der *heme handling proteins* und ist als einziges Protein obligat für die Beladung des Apocytochroms CcmE mit Häm b zur Synthese des Holocytochroms CcmE. CcmA sorgt anschließend mit CcmB für eine Dissoziation des Holocytochroms CcmE aus dem CcmCDE-Komplex. (Schulz *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007). Zusammen mit CcmC ist CcmB für die Membranlokalisierung von CcmA erforderlich (Page *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 1997; Goldman und Kranz, 2001). CcmD ist ein kleines Polypeptid mit einer Transmembranhelix und einem hydrophilen C-Terminus, welches die Aktivität von CcmC potenziert, weshalb CcmC und CcmD auch als CcmE-spezifische Häm-Lyase bezeichnet werden (Ahuja und Thöny-Meyer, 2005; Feissner *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2007; Richard-Fogal *et al.*, 2008).

Nachdem Apocytochrome durch die innere Membran ins Periplasma transloziert wurden, werden sie über den DsbA-DsbB-Weg der oxidativen Proteinfaltung oxidiert um die naszenten Proteine vor Proteolyse zu schützen (Sanders *et al.*, 2010; Bonnard *et al.*, 2012). Zur Reifung der Apocytochrome muss jedoch jede dabei entstehende intramolekulare Disulfidbrücke an den Häm-Bindemotiven reduziert werden, damit eine kovalente Häm-Ligation stattfinden kann. Diese Aufgabe wird CcmG und CcmH zugeschrieben. Die Thiol-Oxidoreduktase CcmG reduziert vermutlich zusammen mit CcmH die Apocytochrome und hält sie so ligationskompetent. CcmH ist außerdem Bestandteil des Häm-Ligationskomplexes CcmFHI. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von exogenen Thiolverbindungen der Phänotyp von Deletionsmutanten in *ccmG* teilweise revertiert werden konnte, was die Rolle bei der Aufrechterhaltung der reduzierten Thiolgruppen an der Apozyt-c-Häm-Bindungsstelle impliziert (Deshmukh *et al.*, 2000; Bardischewsky und Friedrich, 2001; Erlendsson und Hederstedt, 2002; Turkarslan *et al.*, 2008).

Die tatsächliche kovalente Ausbildung von Thioetherbindungen der Hämgruppen an die jeweiligen Apocytochrome wird durch den CcmFH-Komplex katalysiert. In *S. oneidensis* besteht dieser Komplex aus einem weiteren Ccm-Protein, CcmI, welches über eine N-terminale membranständige Domäne mit zwei Transmembranhelices und eine C-terminale periplasmatische Domäne mit Protein-Protein-Interaktionsmotiven verfügt. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Apocytochrom c-Chaperon, das essentiell für die Reifung von c-Typ Cytochromen mit dem kanonischen Häm-Bindemotiv CxxCH und für die Reifung der Nitritreduktase NrfA mit einem CxxCK-Motiv ist (Grovc *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 2008; Verissimo *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2014).

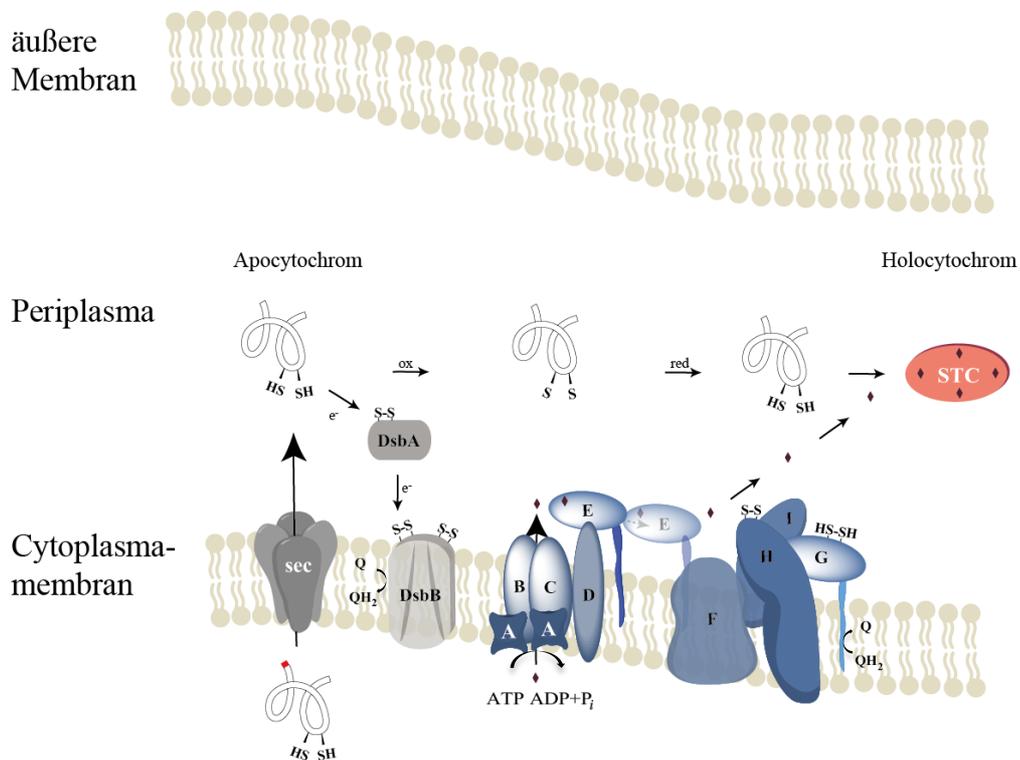


Abb. 3: Schematische Darstellung der Reifung von c-Typ Cytochromen über das Cytochrom c-Reifungssystem. Drei hochkonservierte Protein-Module bereiten und liefern Häm und Apoprotein und katalysieren anschließend die Häm-Apocytochrom-Ligation. Die detaillierten Abläufe des Reifungsprozesses sind dem Text zu entnehmen. Abbildung abgeändert nach Verissimo *et al.* 2017.

Durch Überexpression der *E. coli*-eigenen *ccm*-Gene, *ccmABCDEFGH*, konnte die Quantität der in *E. coli* exprimierten c-Typ Cytochrome auch unter oxischen Bedingungen gesteigert werden (Thöny-Meyer *et al.*, 1995; Arslan *et al.*, 1998). Obwohl das *ccm*-System ein hochkonserviertes System darstellt, ist in *S. oneidensis* im Vergleich zu *E. coli* ein zusätzliches *ccm*-Gen, *ccmI*,

kodiert. Es bildet zusammen mit CcmF und H den CcmFHI-Komplex. Außerdem sind die *ccm*-Gene in *S. oneidensis* in drei unterschiedlichen Operons orientiert, während die *ccm*-Gene in *E. coli* in nur einem Operon vorliegen. In *E. coli* konnte kürzlich eine verbesserte CymA-Maturation durch Zufallsmutagenese in *ccmH* gezeigt werden (Su *et al.*, 2020 b). Außerdem konnte eine Hybridversion mit CcmH-Domänen aus beiden Organismen die Cytochromexpression in *E. coli* sowie dessen Leistungsfähigkeit im BES optimieren. Interessanterweise zeigte der Phänotyp neben einer reinen Steigerung der Cytochromquantität außerdem eine Verschiebung der Stöchiometrie der heterolg exprimierten Cytochrome hin zu CymA (Su *et al.*, 2020 a). Bislang wurde jedoch weder untersucht, ob auch andere Faktoren des *ccm*-Systems aus *S. oneidensis* einen Einfluss auf die Reifung *S. oneidensis*-eigener *c*-Typ Cytochrome in *E. coli* haben, noch, mit welcher Konfiguration des *ccm*-Systems optimale Cytochromstöchiometrien erreicht werden können. Da MtrA als Chaperon wichtig für eine korrekte Maturation von MtrB ist, wäre ebenfalls denkbar, dass die Wahl der *ccm*-Gene indirekt die Maturation des β -barrel Proteins MtrB in *E. coli* beeinflusst (Schicklberger *et al.*, 2011, Marin, 2020).

Typ-II-Sekretionssystem

Zur Sekretion von Proteinen in den Extrazellularraum müssen die entsprechenden Proteine sowohl die innere als auch die äußere Membran Gram-negativer Organismen passieren. Dazu sind sechs verschiedene Sekretionssysteme beschrieben, wobei das Typ-II-Sekretionssystem (TISS) die Sekretion von Multi-Proteinkomplexen und komplexen Proteinen mit Co-Faktoren, wie beispielsweise *c*-Typ Cytochromen, vermittelt (Filloux *et al.*, 1998). In *S. oneidensis* werden unter anderem die äußeren Membrancytochrome MtrC und OmcA nach ihrer Reifung im Periplasma über das TISS sekretiert.

Das TISS besteht je nach Organismus aus 12 bis 15 verschiedenen Proteinen, die von den sogenannten *gsp*-Genen kodiert werden (*general secretion pathway*). Diese sind meist in einem Operon (mindestens *gspCDEFGHIJKLMN*) orientiert (Sandkvist, 2001). In manchen Organismen sind außerdem *gspAB*, *gspO* und/oder *gspS* bzw. entsprechende Homologe beschrieben. Im Fall von *E. coli* ist für diese Gene eine regulatorische Funktion postuliert (Francetic *et al.*, 2000). Für *S. oneidensis* konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten in *gspD*, *gspE* oder *gspG* defizient in der Sekretion von OMCs sind und dadurch ihre Fähigkeit zum EET teilweise verlieren (Shi *et al.*, 2008).

Die TISS-Maschinerie durchspannt innere und äußere Membran und setzt sich aus drei Komponenten zusammen, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran befindet sich GspE, ein ATPase-Komplex, welcher mit einer Plattform in der inneren Membran, bestehend aus GspCFLM, verbunden ist. Das Periplasma durchspannt ein Pseudopilus aus GspGHIJK, dessen Assemblierung jeweils das zu sekretierende Protein durch die Pore in der äußeren Membran schiebt. Diese Pore in der äußeren Membran besteht aus mehreren GspD-Untereinheiten. Wie die für den Export bestimmten Proteine vom TISS erkannt werden, ist bislang unklar. Jedoch scheint das TISS eines Organismus hochspezifisch endogene Proteine zu erkennen und zu sekretieren und zeigt zum Teil Inkompatibilitäten zu heterolog exprimierten Proteinen nah verwandter Organismen (Lindeberg *et al.*, 1996; Francetic *et al.*, 2000; Richter, 2009; Douzi *et al.*, 2012). In *E. coli* konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die terminale Reduktase OmcA nur in Stämmen mit funktionalem endogenem TISS an der Zelloberfläche lokalisiert ist. In Stämmen ohne funktionales TISS ist OmcA an der periplasmatischen Seite der äußeren Membran lokalisiert (Donald *et al.*, 2008). Für MtrC hingegen konnte keine korrekte Lokalisation bei heterologer Expression in *E. coli* mit endogenem TISS nachgewiesen werden. Stattdessen wird MtrC in einem *E. coli*-Stamm mit funktionalem endogenem TISS im Gegensatz zu OmcA nicht sekretiert, sondern ist an der periplasmatischen Seite der äußeren Membran nachweisbar (Richter, 2009). Bisher ist nicht abschließend geklärt, ob MtrC nur von einer Komponente des *S. oneidensis*-eigenen TISS erkannt wird, und wenn ja, um welche der Komponenten es sich hierbei handelt. Da ohne korrekt lokalisierte terminale Reduktase keine direkte Interaktion mit unlöslichen extrazellulären Elektronenakzeptoren möglich ist, bedarf es bezüglich des Sekretionsmechanismus weiterer Forschung.

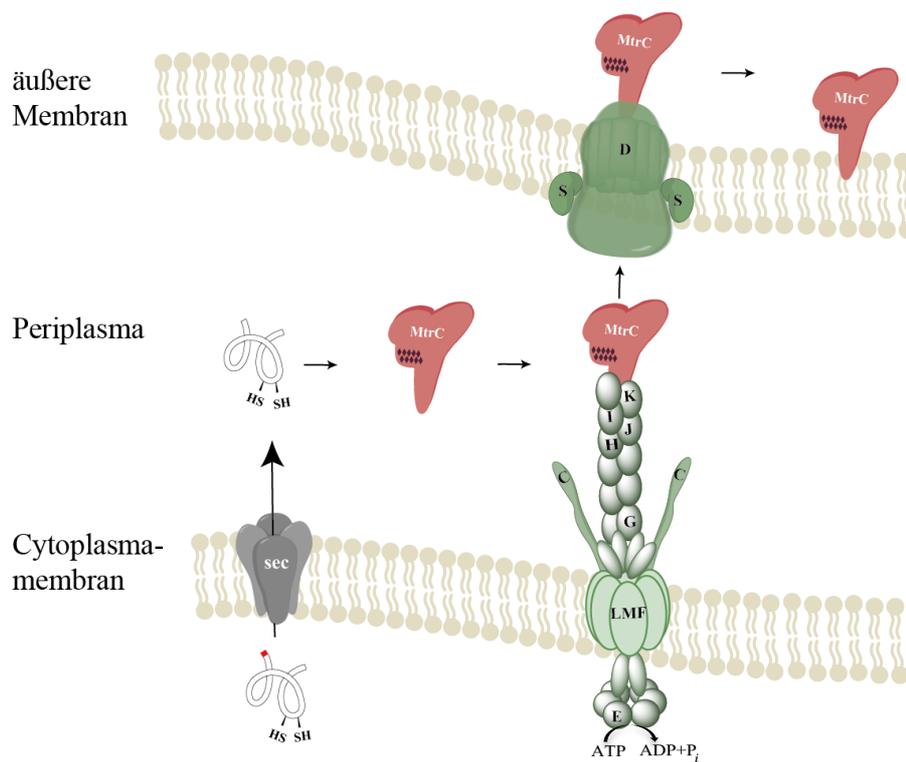


Abb. 4: Schematische Darstellung der Sekretion von Proteinen über das TIIS. An der inneren Membran befindet sich GspE, ein ATPase-Komplex, welcher mit der Membranplattform GspCFLM, verbunden ist. Von dort schiebt ein Pseudopilus aus GspGHIJK das jeweilige Protein durch die GspD-Pore in der äußeren Membran. Die Abbildung wurde abgeändert nach Korotkov *et al.* 2012.

Einbau von β -barrel Proteinen

Nach entsprechender Translation werden naszente β -barrel Proteine im Cytoplasma zunächst über eine N-terminale Signalsequenz erkannt, wodurch ein Sec-vermittelter Transport über die innere Membran ins Periplasma stattfinden kann (Chaturvedi und Mahalakshmi, 2017). Um ein Aggregieren der hydrophoben Membranproteine zu verhindern, interagieren diese im Periplasma mit Chaperonen bzw. Proteasen mit Chaperonfunktion. Interaktion sowie Geleit durch den periplasmatischen Raum müssen dabei entweder SurA (engl. *survival protein A*), oder Skp- (engl. *seventeen kilodalton protein*)/DegP-vermittelt sein. (Spiess *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2009). Mutanten mit Deletionen in sowohl *surA* als auch *skp* und/oder *degP* sind stets letal. Jedoch sind weder eine *degP/skp*-Deletion noch die Deletion von *surA* allein letal (Rizzitello *et al.*, 2001). Phänotypisch zeigen *surA*-Deletionsmutanten allerdings reduzierte Mengen äußerer Membranproteine, was für eine tragende Rolle von SurA beim Einbau von β -barrel Proteinen spricht (Sklar *et al.*, 2007; Rouviere und Gross 1996).

An der periplasmatischen Seite der äußeren Membran wird das entsprechende β -barrel Protein anschließend an den BAM-Komplex (engl. *β -barrel assembly machinery*) übergeben. Dieser faltet und integriert β -barrel Proteine in die äußere Membran Gram-negativer Organismen und besteht aus dem β -barrel Protein BamA sowie den Lipoproteinen BamB, C, D und E (Wu *et al.*, 2005). Kernkomponente des BAM-Komplexes ist BamA, welches aus einer C-terminalen, transmembranen β -barrel Domäne sowie fünf POTRA-Domänen (engl. *polypeptide translocation associated*) besteht, die in den periplasmatischen Raum ragen (Kim *et al.*, 2007; Noinaj *et al.*, 2013; Albrecht *et al.*, 2014; Ni *et al.*, 2014). Naszente β -barrel Proteine werden über das sogenannte β -Signal erkannt, von dem gezeigt wurde, dass es Konformationsänderungen in BamA auslöst (Robert *et al.*, 2006). Diese Konsensussequenz enthält meist ein hoch konserviertes Phenylalanin am C-Terminus (Struyvé *et al.*, 1991; Paramasivam *et al.*, 2012). Da die Biogenese von β -barrel Proteinen ATP-unabhängig ist, wird angenommen, BamA wirke außerdem als Maturationskatalysator, da es in der Lage ist, die Membran lokal zu destabilisieren, was eine Integration energetisch günstiger macht (Gessmann *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2013; Costello *et al.*, 2016).

Der genaue Mechanismus der Integration von β -barrel Proteinen durch den BAM-Komplex ist nicht abschließend beschrieben, jedoch ist wahrscheinlich, dass die Faltung von β -barrel Proteinen bereits im Periplasma beginnt und/oder durch Interaktion mit den BAM-Lipoproteinen oder den BamA-POTRA-Domänen gefördert wird, die der finalen Interaktion und Integration durch BamA vorausgehen (Doyle und Bernstein, 2019). Crosslinking und elektronenmikroskopische Studien legen nahe, dass die Integration über eine *lateral Gating*-Bewegung durch BamA erfolgt (Noinaj *et al.*, 2014; Rollauer *et al.*, 2015, Iadanza *et al.*, 2016). Aktuelle Studien postulieren, dass dabei C-terminale Signalsequenzen in Substraten des BAM-Komplexes, mit BamA interagieren und so helfen, die naszenten β -barrel Proteine während der Biogenese zu stabilisieren (Doyle und Bernstein, 2019; Lee *et al.*, 2019; Tomasek *et al.*, 2020). Auch der genaue Einbaumechanismus von MtrB, dem einzigen β -barrel Protein im Minimalsetup des EETs, ist bislang nicht vollständig beschrieben. Einige Besonderheiten verglichen zum Einbau anderer β -barrel Proteine lassen auf einen komplexen Mechanismus schließen. So ist für Maturation und Einbau von MtrB in die äußere Membran von *S. oneidensis* neben der bekannten Chaperone im Periplasma ein weiteres Protein, MtrA, nötig. Schicklberger *et al.* (2011) konnten zeigen, dass in *S. oneidensis*-Mutanten mit Deletion in *mtrA* kein MtrB in

der äußeren Membran nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu sind in *E. coli* die heterologe Expression und Integration von MtrB auch ohne MtrA möglich (Marin, 2020). Außerdem zeigen *S. oneidensis*-Deletionsmutanten mit einer Deletion in *degQ* (einem *degP*-Homolog) einen zum Wildtyp unveränderten Phänotyp. In *E. coli* hingegen führt die Deletion von *degP* bei Co-Expression von *mtrA* und *mtrB* zu einem Abbau von MtrB (Marin, 2020). Außer quantitativen lassen sich jedoch auch qualitative Aussagen über die Güte der Maturation von MtrB in *E. coli* treffen. Als weiterer Unterschied zur endogenen Maturation in *S. oneidensis* konnte gezeigt werden, dass MtrB in Membranfraktionen von *E. coli* in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol und SDS schon bei 37 °C denaturiert und so ein Antikörper-Epitop freigelegt wird, welches unter gleichen Bedingungen im nativen Organismus nicht zugänglich ist. In Membranfraktionen von *S. oneidensis* ist eine Zugänglichkeit des Epitops und somit ein Signal im Western-Blot nur bei Erhitzung der Probe auf 95 °C detektierbar (Stephan, 2015). Dies lässt auf ein Faltungsdefizit in *E. coli* schließen und möglicherweise auf bislang nicht identifizierte weitere Maturationsfaktoren in *S. oneidensis*. Dabei ist beispielsweise bisher unklar, inwiefern der *E. coli*-eigene BAM-Komplex heterolog exprimierte β -barrel Proteine erkennen und funktional einbauen kann.

Isoprenoide Chinone als Co-Faktor von CymA

Eine Gruppe weiterer, dem EET assoziierter Faktoren, stellen isoprenoide Chinone dar. Diese sind ubiquitär verbreitet und aufgrund des lipophilen Charakters der isoprenoiden Seitenkette in Membranen lokalisiert (Nowicka und Kruk, 2010; Kublik *et al.*, 2016). Isoprenoide Chinone können reversibel durch Aufnahme von zwei Elektronen über ein Semichinon-Intermediat zu Chinolen reduziert werden. Diese Eigenschaft befähigt Chinone als membrangebundene Elektronentransporter eine Schlüsselrolle als Elektronen-*shuttle* zwischen Proteinkomplexen, wie beispielsweise Dehydrogenasen und Oxidasen aerober und anaerober Atmungsketten, einzunehmen (Søballe und Pool, 1999). Je nach Organismus kann dabei die Länge der Seitenkette des Chinons sowie der Sättigungsgrad variieren, woraus sich auch das spezifische Redoxpotential ergibt. Für einen erfolgreichen Elektronentransfer sollte das Redoxpotential des Chinons bzw. Chinols zwischen dem Redoxpotential des jeweiligen Elektronendonors und -akzeptors liegen. Deshalb können besonders Mikroorganismen mit breitem respiratorischem Spektrum ihre Chinonzusammensetzung an die vorherrschende Umweltbedingung anpassen. So synthetisiert *E. coli* unter aeroben Bedingungen zum Übertrag

der Elektronen von NADH auf O₂ hauptsächlich Ubichinon (UK) mit einem Redoxpotential von $E_0' = +110$ mV (Uden und Bongaerts, 1997). Unter anaeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen liegen hingegen hauptsächlich Menachinon (MK; $E_0' = -80$ mV) und Demethylmenachinon (DMK; $E_0' = +40$ mV) vor. Dabei ist das Verhältnis zwischen MK und DMK vom jeweiligen Elektronenakzeptor abhängig (Uden und Bongaerts, 1997; Sharma *et al.*, 2013). Die Isoprenylseitenkette besteht in *E. coli* aus acht Isoprenoideinheiten (Collins und Jones, 1981; Kwon und Meganathan, 2009), während die Chinone in *S. oneidensis* mit einer Kettenlänge von sieben Isoprenoideinheiten vorliegen. Im EET von *S. oneidensis* spielt CymA eine zentrale Rolle, indem es als zentrales Protein verschiedenster Elektronentransferketten die Oxidation von Menachinon-7 (MK-7) mit der Reduktion einer Reihe von *c*-Typ Cytochromen, terminalen Reduktasen und löslichen extrazellulären Elektronenakzeptoren koppelt. Dabei ist MK-7 nicht nur Substrat, sondern auch spezifischer Co-Faktor für CymA (McMillan *et al.*, 2012). Durch Bindung von MK-7 an CymA wird das Semichinon als Intermediat des zwei-Elektronen-Übertrags stabilisiert und so einer Bildung radikaler Sauerstoffspezies vorgebeugt. Dieser Effekt konnte weder mit MK-0 noch mit UK-10 gezeigt werden (McMillan *et al.*, 2012). Diese Studie impliziert, dass sowohl die Länge der Seitenketten als auch der Sättigungsgrad der Chinone mögliche Proteininteraktionen determinieren.

Neben den hier aufgeführten Proteinkomplexen gibt es möglicherweise noch weitere Faktoren, welche bislang nicht in Verbindung mit Funktionalität und Leistung des EETs gebracht werden konnten. Deshalb ist neben der Untersuchung der aufgeführten Faktoren auch die Etablierung neuer *screening*-Ansätze unabdingbar für die Identifikation und Eliminierung etwaiger Limitierungen in bis *dato* erreichten EET-Raten nicht nativer exoelektrogener Mikroorganismen. Außerdem könnte dieses Wissen auch zur Steigerung der Leistungsfähigkeit nativer exoelektrogener Mikroorganismen von Nutzen sein. Dadurch könnten Produktionsstämme (weiter-)entwickelt werden, die in unterschiedlichen BES-Applikationen mit maximaler Effizienz eingesetzt werden können, sodass diese Anwendungen in Zukunft konkurrenzfähig zu oxischen Produktionsroutinen werden.

3. Anoden-gestützte Fermentationen

Die Effizienz einer biotechnologischen Produktionsroutine kann unter mehreren Gesichtspunkten betrachtet werden, wie beispielsweise, (I) wie viel des Substrats wird in das gewünschte Produkt umgewandelt, (II) wie hoch ist die Raum-Zeit-Ausbeute des Produktionsprozesses oder (III) wie viele Nebenprodukte entstehen während des Produktionsprozesses (Philipp *et al.*, 2020). Je geringer dabei der anabole Energiegewinn des Produktionsstamms relativ zur katabolen Produktionsrate ist, desto effizienter der Prozess. Ein optimales Verhältnis anaboler und kataboler Reaktionen im Hinblick auf die Prozessführung wird meist unter anoxischen Bedingungen erreicht. Ein Nachteil anoxischer Fermentationen stellt jedoch die Limitierung der Varianz in der Oxidationsstufe der erhaltenen Produkte dar. Der Organismus gewinnt in einer anoxischen Fermentation Energie durch Substratstufenphosphorylierung bei gleichzeitiger Reduktion von NADH und anderen Redoxäquivalenten. Diese müssen im Gärstoffwechsel ohne einen externen Elektronenakzeptor regeneriert werden. Hierzu wird das entstandene Inermediat reduziert. Deshalb weisen die, meist heterofermentativ entstehenden Produkte, im Mittel dieselbe Oxidationsstufe wie die jeweils eingesetzten Substrate auf. Sollen stärker oxidierte Produkte synthetisiert werden, erfordert dies die Zugabe eines Elektronenakzeptors wie beispielsweise Sauerstoff. Dadurch steigt jedoch der Energiebedarf der Prozessführung, während das Verhältnis von kataboler zu anaboler Substratumsetzung sinkt (Bhagchandani *et al.*, 2020). Eine Lösung ist die Kopplung eines anoxischen Atmungsprozesses mit einem unbegrenzt verfügbaren Elektronenakzeptor. Dies ist das Konzept anodengestützter Fermentationen (Flynn *et al.*, 2010). Dabei ist die Anode eines BES ein nicht-abbaubarer Elektronenakzeptor für die Mikroorganismen. An die Anode wird ein bestimmtes Potential angelegt, welches die Kinetik des Fermentationsprozesses bestimmt. In anodengestützten Fermentationen ist es also möglich, genetisch modifizierte Produktionsstämme auf die entsprechend gewünschten Substrate und Produkte maßzuschneidern und dabei einzelne Endprodukte mit variabler Oxidationsstufe in hohen Ausbeuten zu gewinnen. Darüber hinaus ist es in diesen Prozessen nicht vonnöten, einen abbaubaren Elektronenakzeptor kontinuierlich zuzuführen. Stattdessen wäre es möglich, durch Integration einer Anode als Elektronenakzeptor elektrische Energie als Nebenprodukt zu gewinnen.

Im ersten beschriebenen Ansatz von Flynn *et al.* (2010) wurde *S. oneidensis* genetisch so modifiziert, dass der Organismus Glycerin zu Ethanol verstoffwechseln konnte. Der im Anoxischen entstehende Elektronenüberschuss konnte durch Interaktion mit einer Anode ausgeglichen werden. So wurde ein erster Prozess zur elektrodengestützten Fermentation beschrieben, bei dem Substratausbeuten von 84 % erzielt werden konnten (Flynn *et al.*, 2010). Bis heute wurden mindestens neun verschiedene Bakterienspezies für die Produktion von wertschöpfenden Chemikalien in BES eingesetzt. Diese Organismen sind entweder von Natur aus in der Lage, mit einer Anode zu interagieren, oder sie wurden durch genetische Modifikationen oder die Zugabe membranpermeabler Elektronen-*shuttles* zur Interaktion befähigt (Philipp *et al.*, 2020).

Die anodengestützte, fermentative Synthese wertschöpfender Chemikalien bietet auch auf Seiten der Produkte große Vorteile. Bei Betrachtung der Liste der 30 vielversprechendsten biobasierten Plattformchemikalien für eine erdölunabhängige Wirtschaft (Werpy *et al.*, 2004) ist zu erkennen, dass mindestens 16 Plattformchemikalien enthalten sind, welche nicht als alleinige Endprodukte in anaeroben Fermentationen hergestellt werden können. Diese stellen interessante Ansatzpunkte für die Modifikation von Produktionsorganismen dar. Die Kombination aus der Fähigkeit zum EET und der Möglichkeit, den Metabolismus der entsprechenden Organismen mittels synthetischer Biologie zu optimieren, verdeutlicht die Wichtigkeit der Wahl eines geeigneten Produktionsorganismus.

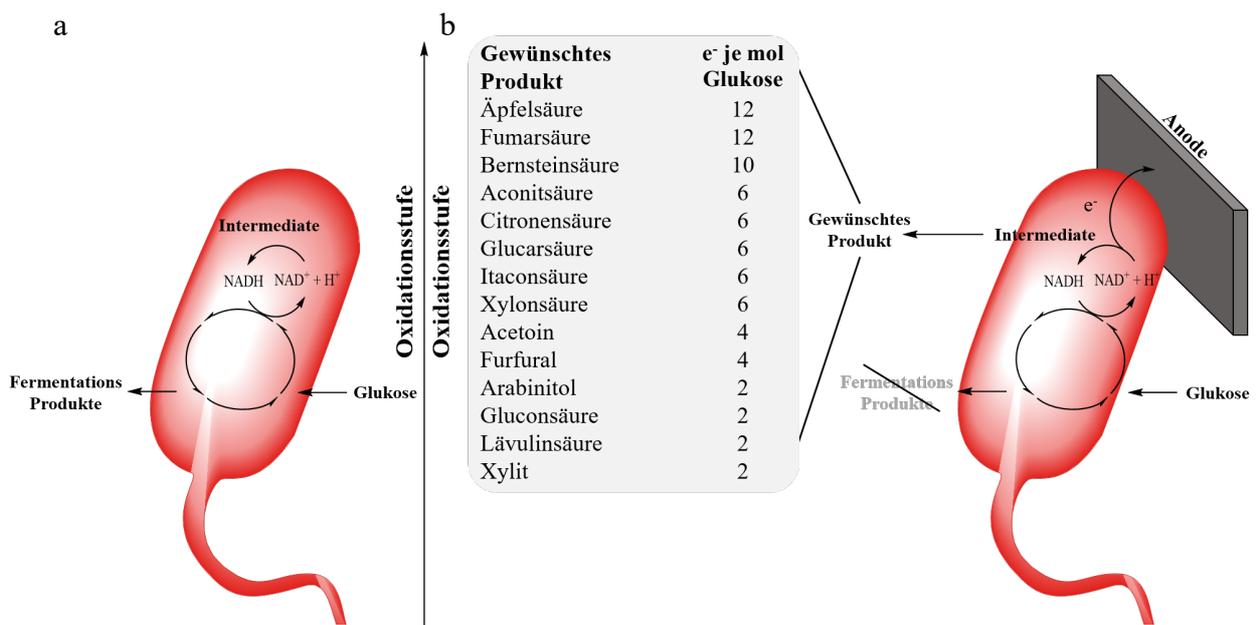


Abb. 5 Prinzip der konventionellen und Anoden-gestützten Fermentation: In konventionellen Fermentationen **a** müssen entstandene Redoxäquivalente regeneriert werden. Dazu muss mangels Elektronenakzeptors das entsprechende Intermediate reduziert werden. Dies determiniert die Oxidationsstufe der Fermentationsprodukte. In Anoden-gestützten Fermentationen **b** wird der Elektronenüberschuss auf eine Anode übertragen. Dadurch können reine Fermentationsprodukte gewonnen werden, bei denen die Oxidationsstufe höher sein kann als die des entsprechenden Substrats. Exemplarisch sind mögliche Fermentationsprodukte aufgeführt sowie die im Prozess freiwerdenden Elektronen je mol eingesetzter Glukose.

4. *Escherichia coli* als Produktionsorganismus

Am Anfang jedes Prozesses zur mikrobieller Biosynthese von Plattformchemikalien steht die Wahl eines geeigneten Produktionsorganismus. Im Falle Anoden-gestützter Fermentationsroutinen muss der gewählte Organismus sowohl zur Interaktion mit einer Anode befähigt, als auch möglichst variabel im Umgang mit unterschiedlichen Substraten sowie der Synthese verschiedener Produkte sein.

Das Gram-negative γ -Proteobakterium *E. coli* spielt schon heute eine große Rolle in biotechnologischen Prozessen und wird als Produktionsorganismus zunehmend interessanter (Liu und Khosla, 2010; Chen *et al.*, 2013). Dies ist zum einen der physiologischen Beschaffenheit, und zum anderen der hohen genetischen Zugänglichkeit und der Fülle molekularbiologischer Werkzeuge für genetische Modifikationen geschuldet (Blattner *et al.*, 1997; Schächter, 2001; Zhang *et al.*, 2016).

Ein Beispiel der mikrobiellen Biosynthese von Plattformchemikalien ist die heterologe Synthese von Acetoin (3-Hydroxy-2-Butanon, $C_4H_8O_2$), einem Vertreter aus der Liste der 30 vielversprechendsten biobasierten Plattformchemikalien. Die Fermentation erfolgt sowohl in nativen als auch in heterologen Wirtsorganismen. Nativ findet eine Fermentation beispielsweise in *Bacillus subtilis* unter Repression der Butandiolbildung statt (Zhang *et al.*, 2014). In nicht-nativen Ansätzen wird hauptsächlich *E. coli* als Produktionsorganismus oxischer Produktionsroutinen genutzt, indem Gene zur Acetoin synthese heterolog exprimiert werden (Gao *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). Um die Fermentation von Acetoin mittels *E. coli* mit hohen Ausbeuten, hoher Reinheit und unabhängig von stetigem Sauerstoffeintrag zu realisieren, wurde in Vorarbeiten ein *E. coli*-Produktionsstamm für eine Anwendung in Anoden-gestützten Fermentationen entwickelt. Dazu konnte der entsprechende *E. coli*-Stamm vielversprechend modifiziert (Abbildung 6) und die anodische Elektrofermentation von Acetoin in *E. coli* erfolgreich etabliert werden (Sturm-Richter *et al.*, 2015; Förster *et al.*, 2017, Beblawy *et al.*, 2020). Im Detail wurden zunächst Gene der Nitratreduktase (*napC-F*) deletiert und Gene der Fumaratreduktase (*frdA-D*) durch *cymA*, *mtrA* und *mtrB* substituiert (Gescher *et al.*, 2008; Schuetz *et al.*, 2009; Richter, 2014). Außerdem wurde das STC-kodierende Gen *cctA* stabil ins Wirtsgenom integriert (Sturm-Richter *et al.*, 2015) und der Stamm so zu einem Elektronentransport ins Periplasma befähigt. Mit Deletion der Gene, kodierend für die Alkoholdehydrogenase (*adhE*), die Phosphotransacetylase sowie Acetatkinase (*pta*; *ack*) und die Lactatdehydrogenase (*ldhA*), wurden Schlüsselgene der gemischten Säuregärung deletiert (Förster *et al.*, 2017). Daraus resultierte ein gärdefizienter Stamm, welcher obligat respiratorisch wächst und somit auf Zugabe externer Elektronenakzeptoren angewiesen ist. Als Folge der Deletion konkurrierender Gene zur Generierung unterschiedlicher Fermentationsendprodukte akkumuliert der Stamm den nativen Metabolit Pyruvat. Dieses Intermediat konnte durch heterologe Expression der Gene, kodierend für die Acetolaktat-Synthase und die Acetolaktat-Decarboxylase (*alsSD*) aus *B. subtilis*, zu Acetoin umgesetzt werden. Unter Zugabe eines Elektronen-*shuttles* wurde eine Anodeninteraktion ermöglicht und so ein Anoden-gestützter Fermentationsprozess mit Acetoinausbeuten von 79 % etabliert (Förster *et al.*, 2017). Die Fermentationsbedingungen und der Produktionsstamm wurden von Beblawy *et al.* optimiert. Sequenzielle Überführungen unter DMSO-atmenden Bedingungen führten zu Punktmutationen in den Genen *pfl*, *aceF* und *rpoC*. Diese Mutationen erhöhten das anoxische Wachstum um das Dreifache, was zusammen mit

Diese Untersuchungen gestalten sich aufgrund einiger redundanter Proteine in nativen exoelektrogenen Mikroorganismen oft als schwierig, da Deletionsmutanten oft keinen spezifischen Phänotyp zeigen. Darüberhinaus könnte auch die Nutzung von *E. coli* als Biokatalysator Elektroden-gestützter Fermentationen noch interessanter und vor allem wirtschaftlicher werden.

Zu diesem Zweck sollte in dieser Arbeit die Spezifität isoprenoider Chinone für CymA als initialer Schritt des Elektronentransfers untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss der Cytochrom *c*-Reifungsmaschinerie auf Qualität und Quantität der heterolog exprimierten *c*-Typ Cytochrome untersucht werden. Durch eine stabile Integration und Expression der TISS-assoziierten Gene aus *S. oneidensis* sollte die Spezifität des TISS im Hinblick auf eine erfolgreiche Sekretion des äußerem Membrancytochroms MtrC analysiert werden. Schlussendlich sollten die jeweils identifizierten Faktoren und somit die Maßnahmen zur Optimierung des EETs auf unterschiedlichen Ebenen der Elektronentransferkette in einem *E. coli*-Stamm vereint werden. In diesem Stamm sollten weitere, bisher unbekannte Faktoren identifiziert werden, welche durch *loss-of-function Screens* in nativen exoelektrogenen Mikroorganismen nicht identifiziert werden können, da ihre Deletion möglicherweise letal ist. Zu diesem Zweck sollte eine Fosmid-Bibliothek des *S. oneidensis*-Genoms erstellt und anschließend auf das entsprechende Fosmid mit dem größten Fitness-Vorteil selektiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte anhand eines *E. coli*-Produktionsstamms untersucht werden, inwiefern der Elektronentransfer den ratenlimitierende Schritt in *shuttle*-basierten Elektroden-gestützten Fermentationen darstellt. Dazu sollte der in Vorarbeiten entwickelte Stamm hinsichtlich der Elektronentransferrate optimiert und die etwaige resultierende Leistungssteigerung im BES ermittelt werden.

II. Material und Methoden

1. Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind nachfolgend in Tabelle 1 mit deren Stammmnummer, den jeweils relevanten Genotypen sowie den entsprechenden Referenzen aufgeführt.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JG7	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Wildtyp	Venkateswaran <i>et al.</i> (1999)
JG9	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$	Gescher <i>et al.</i> (2008)
JG11	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$, pEC86	Gescher <i>et al.</i> (2008)
JG12	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta OMCs$ <i>MtrAB</i> ^s	Bücking <i>et al.</i> (2010)
JG22	<i>E. coli</i> DH5 α ZI <i>aci q</i> , PN25- <i>tetR</i> , SpR, <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYAargFV169)$, Phi80 <i>lacZDM15</i>	Lutz und Bujard (1997)
JG98	<i>E. coli</i> WM3064 <i>thr B1004 pro thl rpsL hsdS lacZ</i> Δ <i>M15 RP4-1360</i> Δ <i>ara(BAD) 567</i> Δ <i>dapA1341::[erm pir(WT)]</i>	Saltikov und Newman (2003)
JG116	<i>E. coli</i> DH5 α Z1 <i>cymA-mtrA rpsL*</i> pAH121	Sturm-Richter (2014)
JG132	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta OMCs$	Bücking <i>et al.</i> (2010)
JG1083	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ KII:: <i>gspHIJK</i> KIII:: <i>gspGLMN</i>	Windhorst (2016)
JG1295	JG1352 pMAL- <i>alsSD</i> , pEC86	Beblawy <i>et al.</i> (2020)

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JG1337	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$, pEC86, pMAL- <i>cctA</i>	Diese Arbeit
JG1339	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ attP21::P _{ara} - <i>mtrAB</i> ^s	Diese Arbeit
JG1352	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA_mtrA_mtrB}$, attP21::P _{ara} - <i>cctA</i> , $\Delta galK$, $\Delta adhE$, <i>pfl</i> ⁻ , <i>aceF</i> [*] , <i>rpoC</i> ⁻ $\Delta ldhA::cscRAKB$, $\Delta pta_ackA::galK$	Beblawy <i>et al.</i> (2020)
JG1358	JG1339 pEC86	Diese Arbeit
JG1359	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ attP21::P _{ara} - <i>mtrAB</i> ^s , pEC86, pMAL- <i>cctA</i>	Diese Arbeit
JG1373	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ attP21::P _{ara} - <i>mtrAB</i> ^s , pEC86, pMAL- <i>alsSD-cymA-cctA</i>	Diese Arbeit
JG1397	JG1352 pMAL- <i>alsSD_cymA_cctA</i> , pEC86	Diese Arbeit
JG1456	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta OMCs$ pBAD- <i>mtrC_{snap}</i>	Diese Arbeit
JG1567	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta gspD$ pBAD- <i>mtrC_{snap}</i>	Diese Arbeit
JG1586	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA_mtrA_mtrB}$, $\Delta galK$, $\Delta adhE$, <i>pfl</i> ⁻ , <i>aceF</i> [*] , <i>rpoC</i> ⁻ $\Delta ldhA::cscRAKB$, $\Delta pta_ackA::galK$	Diese Arbeit
JG1618	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ attP21::P _{ara} - <i>mtrAB</i> , pEC86, pMAL- <i>cctA</i>	Diese Arbeit
JG1636	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ KII::P _{lac} <i>_gspHIJK</i> KIII::P _{lac} <i>_gspGLMN</i> attP21:: P _{lac} - <i>_gspDEFC</i>	Diese Arbeit
JG1638	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ KII:: <i>_gspHIJK</i> KIII::P _{lac} <i>_gspGLMN</i> attP21:: P _{lac} - <i>_gspDEFC</i> pEC86, pBAD- <i>mtrC_{snap}_pilD</i>	Diese Arbeit
JG1657	<i>E. coli</i> DH5 α ZI pEC86, pBAD- <i>mtrC_{snap}</i>	Diese Arbeit
JG1673	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ attP21::P _{ara} - <i>mtrAB</i> ^s , pEC86, pMAL- <i>hepST_put. heptaprenyltransferase_cctA</i>	Kolb (2021)
JG1679	<i>E. coli</i> DH5 α ZI $\Delta(napC-F)$ $\Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ attP21::P _{ara} - <i>mtrAB</i> ^s pEC86 _{<i>S. oneidensis</i>}	Diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
JG1701	<i>S. oneidensis</i> MR-1 pBAD_ <i>mtrC_{snap}</i>	Diese Arbeit
JG1709	<i>E. coli</i> DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) Δ (<i>frdA-D</i>)::P _{tet} _ <i>cymA</i> KII:: <i>gspHIJK</i> KIII::P _{lac} _ <i>gspGLMN</i> attP21:: P _{lac} _ <i>gspDEFC</i> <i>attTn7</i> :: <i>hepST_put.heptaprenyltransferase_cctA</i>	Diese Arbeit
JG1711	<i>E. coli</i> DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) Δ (<i>frdA-D</i>)::P _{tet} _ <i>cymA</i> KII::P _{lac} _ <i>gspHIJK</i> KIII::P _{lac} _ <i>gspGLMN</i> attP21:: P _{lac} _ <i>gspDEFC</i> <i>attTn7</i> :: <i>hepST_put.heptaprenyl-transferase</i> pEC86 _{<i>S.oneidensis</i>} <i>gent^R_mtrAB</i> , pMAL_ <i>cctA_mtrC_{snap_pilD}</i>	Diese Arbeit
JG1712	<i>E. coli</i> DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) Δ (<i>frdA-D</i>)::P _{tet} _ <i>cymA</i> pEC86_ <i>gent^R_mtrAB</i> pMAL_ <i>cctA_mtrC_{snap_pilD}</i>	Diese Arbeit
JG1713	<i>E. coli</i> DH5 α ZI Δ (<i>napC-F</i>) Δ (<i>frdA-D</i>)::P _{tet} _ <i>cymA</i> attP21::P _{ara} _ <i>mtrAB</i> , pEC86 pMAL_ <i>cctA_mtrC_{snap_pilD}</i>	Diese Arbeit
JG1714	JG1636 pEC86 _{<i>E.coli</i>} <i>gent^R_mtrAB</i> , pMAL_ <i>cctA_mtrC_{snap_pilD}</i>	Diese Arbeit
JG1717	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ OMCs pBAD- <i>mtrC</i>	Diese Arbeit

2. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders vermerkt, von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), PCR Biosystems (London, GB), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

3. Kulturmedien, -bedingungen und allgemeine Handhabe

Alle verwendeten Kulturmedien und Lösungen wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt (TKA MicroPure, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) und vor Gebrauch durch Autoklavieren (Systec VE-150, Linden) oder Filtration (0,22 μ m Spritzenfilter, Sarstedt, Nümbrecht) sterilisiert. Der pH-Wert wurde, sofern nicht anders angegeben auf pH = 7,2 eingestellt. Falls nötig wurden die verwendeten Medien nach Sterilisation

entsprechend komplementiert. Die verwendeten Lösungen und die finalen Konzentrationen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Liste verwendeter Komplementationslösungen.

Substanz	C_{Medium}
Glukose	20 mM
Methylenblau	273 mM
Thiamin	14,8 µM
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	10 µg/ml / 50 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Gentamycin	15 µg/ml
IPTG	10 µM / 50 µM
AHT	0,43 µM
Arabinose	1 mM / 5 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM

Für die Herstellung von Kulturplatten wurden die jeweiligen Medien mit 2 % Agar-Agar (w/v) versetzt. Vor der Zugabe hitzelabiler Substanzen wurde zuvor geschmolzener Agar-Agar auf 60 °C temperiert.

Anoxische Kulturmedien und Lösungen wurden in Laborflaschen (Duran, Mainz) gefüllt und mit einem Kautschukstopfen gasdicht verschlossen. Die Anaerobisierung erfolgte durch zyklisches Be- und Entgasen mit Stickstoff für jeweils zwei Minuten pro Zyklus und für mindestens 20 Zyklen.

Die Kultivierung verwendeter Stämme erfolgte auf Kulturplatten oder in Flüssigmedien unter stetigem Schütteln (180 rpm) bei jeweils 30 °C (*S. oneidensis*) oder 37 °C (*E. coli*). Dabei wurde das Wachstum in Minimalmedium stets photometrisch ($\lambda = 600 \text{ nm}$) mit Hilfe eines SPECTRONIC Genesys 20 Photospektrometers (Thermo Fisher Scientific) überwacht sowie der pH-Wert regelmäßig bestimmt und gegebenenfalls nachjustiert.

3.1. Medien zur Kultivierung

Zur Anzucht flüssiger Vorkulturen sowie zur Kultivierung von Stämmen zur Elektroporation wurde LB-Medium (*lysogeny broth*) verwendet. Zur Regeneration nach erfolgter Elektroporation wurde SOC-Medium verwendet. Beide Medien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Zusammensetzung verwendeter Komplexmedien (LB-/ SOC-Medium) zur Anzucht von *E. coli* und *S. oneidensis*.

Substanz	LB-Medium	SOC-Medium
	Menge [g/l]	Menge [g/l]
Trypton	10,0	20,0
Hefeextrakt	5,0	5,0
NaCl	5,0	0,58
MgCl ₂	-	1,9
Glukose	-	3,6
KCl	-	0,19

Die **anoxische Kultivierung von *E. coli*** erfolgte entweder in LB-Medium versetzt mit 50 mM HEPES oder in M9-Medium (Tabelle 4) mit 0,5 % Glycerin (w/v) als Kohlenstoffquelle und 50 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Alle Minimalmedien wurden mit Spurenelementen (Tabelle 6), Thiamin Hydrochlorid, MgSO₄ und CaCl₂ (Tabelle 2) komplementiert.

Etwaige heterologe Proteinexpression wurde zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die weitere Inkubation bei Raumtemperatur oder bei 30 °C, um eine optimale Proteinexpression zu gewährleisten.

Die **anoxische Kultivierung von *S. oneidensis*** erfolgte in LB-Medium, versetzt mit 50 mM HEPES, 50 mM Fumarat und 50 mM Laktat. Eisen-Reduktionsassays mit *S. oneidensis* wurden in M4-Medium (Tabelle 5) durchgeführt. Das Medium wurde mit Spurenelementen (Tabelle 6) sowie MgSO₄ und CaCl₂ (Tabelle 2) komplementiert. Als Elektronenakzeptor dienten 50 mM Fe(III)-Citrat.

Tab. 4: Zusammensetzung des M9-Mediums.

Substanz	Menge [g/L]
KH ₂ PO ₄	2,89
NaCl	0,537
NH ₄ Cl	1
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	8,5
Caseinhydrolysat	1
HEPES	11,9

Tab. 5: Zusammensetzung des M4-Mediums.

Substanz	Menge [g/L]
K ₂ HPO ₄	0,22
KH ₂ PO ₄	0,09
HEPES	1,41
NaHCO ₃	0,17
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,19
NaCl	8,77
Caseinhydrolysat	1

Tab. 6: Zusammensetzung des 100x Konzentrats der Spurenelemente.

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

Experimente in BES wurden in MOPS gepuffertem Medium (Tabelle 7) durchgeführt. Dazu wurden die Zellsuspensionen in Medien ohne Elektronenakzeptor angesetzt. Die Medien wurden vor Starten der jeweiligen Experimente mit Spurenelementen (Tabelle 6), Methylenblau, Glukose bzw. Glycerin, Thiamin Hydrochlorid, MgSO₄ und CaCl₂ sowie Induktoren und Antibiotika (Tabelle 2) komplementiert.

Tab. 7: Zusammensetzung des MOPS-gepufferten Mediums.

Substanz	Menge [g/L]
KCl	0,2
NaCl	8
MOPS	3,14
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,18
Hefeextrakt	1

3.2. Zellernte

Die Zellernte erfolgte stets durch Zentrifugation und je nach Volumen in einer Eppendorf 5418, einer Eppendorf 5810 R oder einer Avanti J-26 XP Zentrifuge (Beckman Coulter). Alle Zellkulturen für Proteinanalytik, Wachstumsversuche, Funktionalitätsassays und Versuche in BES wurden bei 6000 g pelletiert.

Zellen für die Poteinanalytik wurden bei 4 °C pelletiert und anschließend im Verhältnis 1:1 (w/v) in Pufferlösung (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH = 8) resuspendiert.

Kulturen für Funktionalitätsassays o. ä. wurden bei Raumtemperatur (RT) pelletiert und mit sterilem Medium ohne Elektronendonator und -akzeptor gewaschen.

3.3. Stammkonservierung

Zur langfristigen Konservierung der Stämme wurden Gefrierkulturen angefertigt. Dazu wurden die entsprechenden Zellen im Duplikat in der exponentiellen Wachstumsphase mit 10 % sterilem Glycerin versetzt und sofort im Anschluss in flüssigem Stickstoff gefroren. Je eines der Duplikate wurde anschließend bei -80 °C, das andere in flüssigem Stickstoff gelagert.

4. Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind nachfolgend in Tabelle 8 mit den jeweils relevanten Genotypen sowie den entsprechenden Referenzen aufgeführt.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevanter Genotyp	Referenz
pAH121	Amp ^R , ori101, intP21	Haldimann und Wanner (2001)
pAH95	Kan ^R , oriR6K, attP21	Haldimann und Wanner (2001)
pAH95 KI	Amp ^R , oriR6K, attP21, P _{lac} <i>_gspDEFC</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Relevanter Genotyp	Referenz
pAH95-P _{ara} _mtrAB-co	Kan ^R , oriR6K, attP21, P _{ara} _mtrA-co, mtrB-co (codon optimiert)	Diese Arbeit
pAH95-P _{ara} _mtrAB ^s -co	Kan ^R , oriR6K, attP21, P _{ara} _mtrA ^s -co, mtrB ^s -co (codon optimiert)	Diese Arbeit
pBAD	Kan ^R , P _{ara} _mtrC _{snap}	Invitrogen
pBAD-mtrC	Kan ^R , P _{ara} _mtrC _{snap}	Bücking <i>et al.</i> (2010)
pBAD-mtrC _{snap}	Kan ^R , P _{ara} _mtrC _{snap}	Diese Arbeit
pCC1FOS	Chl ^R , P _{lac} , lacZ, redF, repE, parABC, cos, loxP	Lucigen
pEC86	Chl ^R , P _{tet} _ccmABCDEFGH	Arslan <i>et al.</i> (1998)
pEC86 _{E.coli} _gent ^R _mt rAB	Gent ^R , P _{tet} _ccmABCDEFGH, P _{tac} mtrA-co, mtrB-co	Diese Arbeit
pEC86 _{S.oneidensis}	Chl ^R , P _{tet} _ccmABCDEFGHI SO_0269	Diese Arbeit
pEC86 _{S.oneidensis} _gent ^R _mtrAB	Gent ^R , P _{tet} _ccmABCDEFGHI SO_0269, P _{tac} mtrA-co, mtrB-co	Diese Arbeit
pGRG25	Amp ^R , Tn7, P _{ara} _tnsABCD, pSC101 ori ts, oriT	McKenzie und Craig (2006)
pMAL_alsSD	Amp ^R , P _{tac} _alsSD	Förster <i>et al.</i> (2017)
pMAL_alsSD_cymA_cctA	Amp ^R , P _{tac} _alsSD_cymA_cctA	Diese Arbeit
pMAL_cctA	Amp ^R , P _{tac} _cctA	Richter (2014)
pMAL_cctA-mtrC _{snap} -pilD	Amp ^R , P _{tac} _cctA-mtrC _{snap} -pilD	Diese Arbeit
pMAL_MK-7	Amp ^R , P _{tac} _hepS_hepT_putative Heptaprenyltransferase	Kolb (2021)
pMAL_MK-7_cctA	Amp ^R , P _{tac} _hepS_hepT_putative Heptaprenyltransferase_cctA	Kolb (2021)
pMAL_mtrC _{snap} -pilD	Amp ^R , P _{tac} _mtrC _{snap} -pilD	Diese Arbeit
pMAL-p2E	Amp ^R , P _{tac} , MBP,	Riggs (2001)

4.1. Isolierung von Nukleinsäuren

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide wurden mit Hilfe des Wizard® SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) nach Vorgaben des Standardprotokolls isoliert.

Um die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA zu bestimmen, wurde die Probe mittels NanoDrop quantifiziert (siehe Abschnitt II.4.7).

4.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurde das Wizard® Genomic DNA Purification KIT verwendet. Die Isolation erfolgte nach Vorgaben des Standardprotokolls. Zur Isolierung hochmolekularer DNA wurde bei allen Resuspensionsschritten stets schonend invertiert. Um die Ausbeute zu maximieren, erfolgte die Rehydrierung der DNA zur Erstellung der Fosmid-Bibliothek für mindestens 5 Tage bei RT. Für Sequenzierungen erfolgte die Rehydrierung über Nacht bei RT.

4.1.3 Isolierung von RNA

Vor der Isolierung von RNA wurden die jeweiligen Stämme unter den zu untersuchenden Bedingungen kultiviert. Zur Isolierung wurde je 1 ml $OD_{600} = 1$ Zellsuspension eingesetzt und die RNA mit Hilfe des RNeasy MiniKit (Qiagen) nach Standardprotokoll isoliert. Die finale Elution erfolgte in 50 μ l ddH₂O, eine Konzentrationsbestimmung erfolgte via NanoDrop. Nach erfolgreicher Isolierung der RNA wurden zunächst etwaige DNA-Verunreinigungen mittels RNase-Free DNase Set (Qiagen) nach Standardprotokoll entfernt.

4.2. Synthese von cDNA

Nachdem Verunreinigungen durch DNA auch mittels Agarosegel ausgeschlossen werden konnten, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das SensiFast cDNA Synthesis Kit (Bioline) nach Angaben des herstellenden Unternehmens verwendet.

4.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR. Alle hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern (C1000/S1000/MJ Mini, BioRad) durchgeführt. Als Polymerasen wurden je nach Verwendungszweck die PCR BIO HiFi Polymerase (PCR Biosystems) oder ein Taq-Polymerase-basierter *Ready-to-use-Mix* (MangoMix®, Bioline, Luckenwalde) verwendet. Zur Amplifikation präparativer DNA-Fragmente wurde die PCR BIO HiFi Polymerase nach Angaben des herstellenden Unternehmens in Volumina zwischen 15 und 50 µl verwendet. Jeder Ansatz wurde abweichend vom Standardprotokoll mit 3 % DMSO versetzt. Zur Durchführung analytischer PCR-Reaktionen wurde MangoMix® nach Standardprotokoll in Volumina von 20 µl verwendet.

Einzelklone wurden mittels Kolonie-PCR auf positive Transformationsereignisse untersucht. Dazu werden Bakterienkolonien als *Template* für die PCR-Reaktion eingesetzt, sodass eine vorangehende DNA-Isolation nicht mehr nötig ist (Güssow und Clackson, 1989).

Tab. 9: Übersicht über die in dieser Arbeit abgeleiteten und verwendeten Oligonukleotide.

Nr.	Name	Sequenz
1	P _{ara} _for_ol_pAH95	<u>TCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCT</u> <u>TGCATGCCTGCAAAGAAACCAATTGTCCATATTG</u>
2	P _{ara} _rev_ol_MtrA	<u>GTGATGGTCAGTGCCGGCAGCAGGTTTTTCATTTGAG</u> <u>GCAGTTCTTCATGGTATGTATATCTCCTTCTTAAAG</u>
3	<i>mtrB</i> _rev_ol_pAH95	<u>TCACTGATCAGTGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCG</u> <u>AGCTCGGTACCCTTAGAGTTTGTAGCTCATGC</u>
4	<i>mtrA</i> _for	ATGAAGAAGTGCCTCAAAATG
5	3317_ <i>putHeptra</i> _rev_ ol_ <i>cctA</i>	<u>CTATTTCGGATAATTCAACAGGAGAGCATTATGAGCAA</u> <u>AAAAGTCTGTG</u>

Nr.	Name	Sequenz
6	3318_cctA_for_ol _putHeptra	<u>CTATTTCCGATAATTCAACAGGAGAGCATTATGAGCAA</u> <u>AAAACCTGCTGTC</u>
7	cctA_rev_ol_pMAL	AAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTTATTT TTTCAGAACAGATGCGC
8	putHeptra_rev_ol_pMAL	<u>CCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGCCAAG</u> <u>CTTGCCCTGCAGGTTATCGGAAATAGCTGATCAATAATC</u>
9	hepS_for_ol_pMAL	<u>CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTACCAACAA</u> <u>GGACCATAGCAATGCAAGACATCTACGG</u>
10	P _{tac} _for_ol_pGRG25	<u>ATATCGGATCCTAGTAAGCCACGTTTTAATTAATCAGAT</u> <u>CCCTCAATAGCTTGACAATTAATCATCGGCTCG</u>
11	putHeptra_rev_ol_pGRG2 5	<u>ATTAAGAGGGGCGTGGGGTCGACGCGGCCGTTGGCGC</u> <u>GCCTCCTAGGTGCTTATCGGAAATAGCTGATCAATAAT</u> <u>C</u>
12	SO_0269_ol_pEC86_rev	<u>CGCACTTTGTCAACAGTCTAGCCCGATGGCATCACCAT</u> <u>CGGGCCTCTTTTAATTCAGCTTTTTTTCGCC</u>
13	pEC86_rev	AAAGAGGCCCGATGGTGAT
14	ccmI_for	TTATTGTACTIONGAGTATCCAGTACT
15	ccmE_for	TTATTGAGTTGCCGATTTCTGT
16	ccmI_rev_rbs_ol_ccmE	<u>TACAGCCAACAGAAATCGGCAACTCAATAAGTCTTGAG</u> <u>GCTGACCCGCGAGGAGGTAGCCATGACGACATTTTGGAA</u> TTTTTATTG
17	pEC86_for	GCAATAACCCTGTAAAAACCT
18	rev_ccmF_NdeI_ol_ pEC86	<u>GTCGAGCCAGGTTTTTAACAGGGTATTGCCATATGGC</u> <u>ACTAAATAAAAGGAGGTAAGGGAAATATGATCCCAGA</u> ACTTGGACA
19	ccmI_for_ol_Fragm.1_ nachNdeI	<u>TGTCGAAGTTCTGGGATCATATTTCCCTTACCTCCTTTT</u> <u>ATTTAGTGCCATTATTGTACTIONGAGTATCCAGTACT</u>
20	ccmA_rev_ol_pEC86_ nachNdeI	<u>CGAGCCAGGTTTTTAACAGGGTATTGCCAAGGAGGTA</u> <u>GTTCTACTTGTGACAAATATAATTTTCAGTAGACACA</u>
21	Gent ^R _for_ol_pEC86	<u>TGACACCCTCATCAGTGCCAACATAGTAAGCCAGTATA</u> <u>CACTCCGCTAGCGCCTTGAACGAATTGTTAGGTGG</u>
22	Gent ^R _rev_ol_P _{lac}	<u>GTATCATTGTTATCCGCTCACAAGTCAACACTCTTTTTG</u> <u>ATAAGCGGAACCCCTATTTGTTTA</u>
23	P _{lac} _rev_ol_mtrA	<u>GTGATGGTCAGTGCCGGCAGCAGGTTTTTCATTTTGAG</u> <u>GCAGTTCTTCATTATTTTTCTTTCCCCTAACGC</u>
24	mtrB_rev_ol_pEC86	<u>TCCAGGCCACTCATACCTTTCATATTGAGATCCAGCAA</u> <u>GATCACGTCGATTTAGAGTTTGTAGCTCATGCTC</u>

Nr.	Name	Sequenz
25	P _{lac} _for	TTATCAAAAAGAGTGTTGACTTG
26	<i>mtrC</i> _for_ol_pBADNcoI	<u>TTTGGGCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA</u> <u>GATATACATACCATGATGAACGCACAAAAATCA</u>
27	<i>mtrCnoStop</i> _rev-Linker	<u>ACATTCACGACGTTCTTTAGTTTCAGATTGGTGACAAGA</u> <u>AACCATTTTCACTTTAGTGTGATCTG</u>
28	for_snap_ol-linker_ <i>mtrC</i>	<u>GTTTCTTGTCCACCAATCTGAAACTAAAGAACGTCGTGA</u> <u>ATGTATGGACAAAGATTGCGAAATG</u>
29	rev_snap+stop_ol_pBAD	<u>TGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGG</u> <u>AGACCGTTTTTATCCCAGACCCGGTTTAC</u>
30	Snap_rev	TTATCCCAGACCCGGTTTA
31	RBS_ <i>pilD</i> _for_ol_Snap	<u>GCTGCTGGCCCATGAAGGTCATCGTCTGGGTAAACCGG</u> <u>GTCTGGGATAATACATTGAACAATATAATTAAGTAAG</u>
32	<i>pilD</i> _rev_ol_pMAL	<u>CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAG</u> <u>CTTGCCATGCAGGCTATAACGTAATAAATACCAATCCA</u>
33	<i>mtrC</i> _for_ol_RBS- <i>cctA</i>	<u>CTGAAGAAGTAAAGCACTAAATAAAAGGAGTGAAGGG</u> <u>AAATATGGGCAACGCACAAAAAT</u>
34	0931_pMAL_ <i>cctA</i> _for	<u>CAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAA</u> <u>GGACCATAGCAATGAGCAAAAAACTATTAAGTG</u>
35	for_ <i>cymA</i> +RBS_ol_pMAL -alsSD	<u>CCCTTTTAGCAGGGCTTTCTGGAAGGAGATATACATAC</u> CATGAACTG
36	rev_ <i>cctA</i> _OL_pMAL	<u>AAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTTATTT</u> TTTCAGAACAGATGCGC
37	KI_rev_ol_pAH95	<u>TCACTGATCAGTGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCG</u> <u>AGCTCGGTACCCTCACTGCGGCAGAGAAAAC</u>
38	P _{lac} _KI_for_ol_pAH95	<u>TCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCT</u> <u>TGCATGCCTGCATTATCAAAAAGAGTGTTGACTTGT</u>
39	<i>gspH</i> _for	ACTGATGGAAGTCATGCTGG
40	<i>gspH</i> _rev	CTCCATTTGTTTTTCACTCAGG
41	<i>gspI</i> _for	AAAGTCTGAGTGAGCAAATGG
42	<i>gspI</i> _rev	ACGTACGAGCTTACCTGG
43	<i>gspJ</i> _for	GCTGGTATTTCCCCTATCC
44	<i>gspJ</i> _rev	GTTTTCGTCTTTGTTGCC
45	<i>gspK</i> _for	CGTACATTTGTGTCATTCCTGG
46	<i>gspK</i> _rev	CGTCGATTCATAGCATCTTCC
47	<i>gspG</i> _for	CGTAATTCTCGGTATCCTGG
48	<i>gspG</i> _rev	CACATAGCCTTCCTCACG

Nr.	Name	Sequenz
49	<i>gspL_for</i>	GCCTCCTATTCCGAAATGC
50	<i>gspL_rev</i>	CATTAACCTGATGAATGGTGAGG
51	<i>gspM_for</i>	GCTCAGCAACAGACTTTAACG
52	<i>gspM_rev</i>	CTTTCTTCTGCACCAGATCG
53	<i>gspN_for</i>	TTGTAGTGCTGTTTCCTGC
54	<i>gspN_rev</i>	GACCAAGTAATCAGACCTTTTCG
55	<i>gspD_for</i>	GCACCTACATCACCAATCC
56	<i>gspD_rev</i>	CACAATGAAAGAGGCTTCCTG
57	<i>gspE_for</i>	GCAATGAGATGGACCTTTTCAC
58	<i>gspE_rev</i>	CGATTCCGGCTTCAGTACTTC
59	<i>gspF_for</i>	AATTGGCGTAGTTTCAGTGC
60	<i>gspF_rev</i>	GATAACAGGCATTTTCAGGAGG
61	<i>gspC_for</i>	ACAGATGCTCCGAAAACC
62	<i>gspC_rev</i>	GCTTCTGTAAGTGTGATTGTC

Unterstrichen sind jeweils die nicht-bindenden Bereiche des Primers.

4.2.1 Quantitative real-time-PCR

In dieser Arbeit wurde die quantitative *real-time*-PCR (qPCR) durchgeführt, um relative Zellzahlen zu vergleichen. Dazu wurden Bakteriensuspensionen unbekannter gesamt-DNA-Konzentration bei 98 °C für 10 Minuten erhitzt und anschließend als *template* eingesetzt. Als Reaktionsmix wurde der SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) nach Standardprotokoll verwendet. Zur Kalibrierung wurden Standards mit definierter Zellzahl hergestellt. Die qPCR wurde in einem C1000 Thermal Cycler mit CFX96 Real-Time System (BioRad) durchgeführt und mit der BioRad CFX Manager Software ausgewertet.

4.4. Sanger-Sequenzierung

Zur Verifizierung der Sequenzen aller generierten Plasmide und genomischen Integrationen wurden diese mit dem Mix2Seq NightXpress Kit durch die Firma Eurofins Genomics

(Ebersberg) nach der Sanger-Methode sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Die Alignements wurden mit der CLC Mainworkbench (Qiagen, Venlo) *in silico* erstellt (Alignmentmodus: *Assemble sequence to reference*, *Minimum aligned read length* = 50, *Alignment stringency* = *Medium*, *Trimming* = *manual*).

4.5. Brückensynthese-Sequenzierung (Illumina)

Für die Sequenzierung von Genomen und Fosmiden wurde die Brückensynthese-Sequenzier-Technologie (Illumina) genutzt. Die Sequenzierung wurde durch IMG (IMG Laboratories, Planegg) durchgeführt. Genomische- sowie Fosmid-DNA wurde wie in Abschnitt II.4.1.2 beschrieben isoliert. Die Probenvorbereitung durch IMG erfolgte mittels NEBNext® UltraTM II FS DNA Library Prep Kit (Illumina). Für die Sequenzierung wurden mindestens 5 Millionen Sequenzen auf einem Illumina NextSeq 500 Sequencer angestrebt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe der CLC Genomic Workbench (Qiagen, Venlo) mittels Fixed Ploidy Variant Detection individuell gegen eine Referenz *gemapped*. Die Analyse erfolgte mit Standardeinstellungen, wobei die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation auf > 90 % gesetzt wurde. Es wurden nur Genomstellen berücksichtigt, die mindestens 10-fach sequenziert wurden und eine Mindestmutationsrate von 50 % aufwiesen. Schließlich wurden die ermittelten Mutationen mit denen des Kontrollstamms verglichen. Um die Abundanz der jeweiligen Gene innerhalb der Kultur zu bestimmen und somit die Fosmid-Inserts zu identifizieren, wurden die *reads* entsprechend eines RNA-Seq Workflows behandelt. Dazu wurden die *reads* nach Filtern und *Trimming* auf die Genome von *E. coli* und *S. oneidensis* *gemapped*.

4.6. Restriktion und Ligation

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und nach Angaben des herstellenden Unternehmens verwendet. Bei unvollständiger Restriktionsreaktion wurde die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurde der gesamte Restriktionsansatz über ein Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt (Abschnitt II.4.6).

Zur Vermeidung von Religationsereignissen wurden linearisierte Plasmide mit *blunt* Enden mittels alkaliner Phosphatase (Roche, Mannheim) nach Standardprotokoll dephosphoryliert und aufgereinigt.

Ligationen komplementärer Überhänge wurden mit T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Schwalbach) nach Standardprotokoll durchgeführt.

Für Ligationen mittels isothermaler *in-vitro*-Ligation nach Gibson (Gibson *et al.*, 2009) wurden äquimolare Mengen der zu ligierenden Fragmente mit einer gesamt-DNA-Konzentration von 10 - 100 ng und einem Volumen von 5 µl mit je 15 µl des Reaktionsansatzes (Tabelle 11) versetzt.

Tab. 10: Zusammensetzung der 5x konzentrierten Stammlösung der isothermalen *in-vitro*-Ligation.

Substanz	Menge
Tris/HCl pH 7,5 (1M)	125 µl
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (1M)	12,5 µl
dNTPs (10 mM)	25 µl
DTT (1M)	12,5 µl
NAD ⁺ (100mM)	12,5 µl
Polyethylenglycol-8000	62,5 mg
ddH ₂ O	62,5 µl

Tab. 7: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der isothermalen *in-vitro*-Ligation.

Substanz	Menge
5x-Stammlösung	80 µl
PCRBIO HiFi Polymerase (2 U/µl)	5 µl
Taq DNA-Ligase (40 U/µl)	40 µl
T5 Exonuklease (0,1 U/µl)	16 µl
ddH ₂ O	239 µl

4.7. Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer (Tabelle 12) aufgekocht, vollständig gelöst und anschließend mit 2 ppm Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics, Dueren) versetzt. Midori Green interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV- bzw. Blau/Grün-Licht. Das polymerisierte Gel wurde in einer Laufkammer (PerfectBlue Mini S, VWR Peqlab) mit TAE-Puffer überschichtet. Als Größenmarker diente je nach erwarteter Größe GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) bzw. Lambda-DNA (Thermo Fisher Scientific). Die Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer (Tabelle 13) versetzt und durch Anlegen einer Spannung von 120 V (Powerpac HC, Biorad) aufgetrennt. Zur Detektion von DNA-Banden präparativer Gele wurden diese mit dem FastGene® Blue/Green LED Transilluminator (Nippon Genetics) bei einer Wellenlänge von 500 nm bestrahlt und Banden gegebenenfalls ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) wie im Standardprotokoll angegeben. Analytische Gele wurden mittels ChemiDoc™ XRS⁺ System (Biorad) visualisiert.

Tab. 8: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Substanz	Konzentration [mM]
Tris-HCl pH 8	40
Essigsäure	20
Na ₂ EDTA	1

Tab. 9: Zusammensetzung des 6x DNA-Ladepuffers.

Substanz	Menge
Xylene cyanol	0,05 g
Bromphenolblau	10 mg
Glycerin	12 ml
50x TAE	1,5 ml
ddH ₂ O	15 ml

4.8. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung des DNA- bzw. RNA-Gehalts einer Probe erfolgte für sämtliche Proben spektroskopisch mittels NanoDrop ND-2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Chromosomale DNA wurde zusätzlich mit Hilfe des QBit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Die Messung erfolgte in 96-Well Platten in einem infinitePro 200 Spektrometer (Tecan).

4.9. Klonierungsmethoden

4.8.1 CRIM-Integration

Die CRIM-Integration (*Conditional-Replication, Integration and modular plasmid*) bietet die Möglichkeit, Gene stabil in Wirtsgenome zu integrieren (Haldimann und Wanner, 2001).

Dazu steht eine Reihe unterschiedlicher CRIM-Plasmide zur Verfügung. Diese kodieren homologe Bereiche zu genomischen Phagen-Bindestellen, verschiedenen Antibiotikaresistenzkassetten sowie das R6K-Replikon zur Replikation in *pir*⁺-Stämmen.

Die Zielsequenz wird in das gewünschte CRIM-Plasmid eingefügt und in einem *pir*⁺-Stamm gesichert und vervielfältigt. Zur anschließenden genomischen Integration in *pir*⁻-Wirtsgenome wird über ein hitzelabiles CRIM-Hilfsplasmid eine Integrase exprimiert, welche die ortsspezifische Rekombination vermittelt.

In dieser Arbeit wurde das CRIM-Plasmid pAH95 und das entsprechende Hilfsplasmid pAH121 verwendet. pAH95 integriert stabil in die *attP21-site* im *E. coli*-Genom. Der Zielstamm wurde mit pAH121 transformiert und bei 30 °C kultiviert. Die Zielsequenz wurde über eine isothermale *in-vitro* Ligation in pAH95 integriert. Das daraus resultierende Plasmid wurde in den Zielstamm co-transformiert. Inkubation bei höheren Temperaturen (1h bei 37 °C, dann 30 Minuten bei 42 °C) induzierten die Expression der Integrase und führten zum Verlust von pAH121. Anschließend wurde auf Kanamycinhaltigen (10 µg/ml) Kulturplatten auf positive Integrationsereignisse selektiert.

4.8.2 Tn7-Integration

Mit Hilfe der Tn7-Integration ist es ebenfalls möglich, Zielsequenzen stabil ins Wirtsgenom zu integrieren (McKenzie und Craig, 2006). Unter Verwendung der ortsspezifischen Rekombinationsmaschinerie des bakteriellen Transposons Tn7 wird die entsprechende Sequenz an der *attnTn7-site* eingefügt. Zu diesem Zweck werden die Sequenzen für *tnsABCD* sowie die entsprechende Zielsequenz, welche von Erkennungsstellen für die Transposase flankiert wird, auf einem temperatursensitiven Plasmid (pGRG25) in die Wirtszellen eingebracht. Anschließend wird die Expression der TnsABCD-Proteine induziert um die Integration zu vermitteln. Durch Inkubation bei 42 °C wird pGRG25 anschließend aus den Zellen entfernt, um dann mittels PCR auf positive Integrationsereignisse zu testen.

4.10. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

In dieser Arbeit wurde DNA stets mittels Elektroporation in Wirtszellen eingebracht (Dower *et al.*, 1988). Unmittelbar vor der Elektroporation wurden die Zellen bei einer $OD_{600} \approx 0,6 - 0,8$ für 30 Minuten bei 0 °C inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu maximieren, wurde die Ionenkonzentration in der Suspension so weit als möglich verringert. Dazu wurden die Zellen viermal für 30 s bei 16.372 x g pelletiert und anschließend in 4 °C kaltem ddH₂O aufgenommen. Die Transformation erfolgte in Elektroporationsküvetten (1 mm Elektrodenabstand, Biorad) mit jeweils 100 µl kompetenter Zellen ($OD_{600} \approx 5$) und einem isothermalen *in-vitro* Ligationsansatz bzw. 1-2 µg eines Plasmids. Die Elektroporation erfolgte mit einem Mikropulser (BioRad) durch Anlegen einer Spannung (1,8 kV; 4-5 ms). Unmittelbar nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und anschließend auf Selektionsplatten inkubiert.

Vor der Elektroporation isothermaler *in-vitro* Ligationsansätze wurden überschüssige Ionen aus dem Ligationsansatz mit Hilfe einer Dialysemembran (Millipore, Eschborn, Typ VSWP) entfernt.

4.11. Herstellung einer Fosmid-Bibliothek

Um in einem *gain-of-function Screening* weitere bislang unentdeckte obligate Faktoren des Minimalsetups zum EET zu identifizieren, wurde aus dem *S. oneidensis*-Genom eine Fosmid-Bibliothek zur Einbringung in einen *E. coli* Wirtstamm erstellt. Die Isolierung der gDNA erfolgte wie in Abschnitt II.4.1.2 beschrieben. Das Scheren der DNA erfolgte mechanisch, um eine möglichst hohe Randomisierung zu erreichen. Dazu wurden 100 µl (500 ng/µl) gDNA 2000 x durch eine zweifach geknickte 0,55 x 25 mm Kanüle pipettiert. Die anschließende Herstellung der Fosmid-Bibliothek erfolgte in pCC1FOS Vektoren mit dem CopyControl Fosmid Library Production Kit (Lucigen). Abweichend vom Standardprotokoll wurde der Stamm JG1711 als Rezipientenstamm verwendet.

Über eine blau-/weiß- Selektion konnte festgestellt werden, ob die erhaltenen Klone ein entsprechendes Insert trugen. Die Mindestanzahl an Klonen (= N) für eine zu 99 % vollständige Bibliothek also eine 99 %-ige Abdeckung des *S. oneidensis*-Genoms wurde wie folgt berechnet:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Dabei wurde für die Wahrscheinlichkeit P eine Abdeckung von 99 % (entspricht $P = 0,99$) angenommen. Da f dem Anteil des gesamten Genoms pro Fosmid entspricht, wurde der Quotient aus Insertgröße (40 kb) durch die Größe des *S. oneidensis*-Genoms (4,97 Mb) ermittelt. Die Anzahl der benötigten Klone für eine einfache, 99 %-ige Abdeckung des *S. oneidensis*-Genoms beträgt demnach 569.

5. Protein-biochemische Methoden

5.1. Zellfraktionierung

5.1.1 Periplasmapräparation

Zur Permeabilisierung der äußeren Zellmembran wurden Zellsuspensionen mit 1 mg/ml Polymyxin B versetzt und für 60 Minuten bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Polymyxin B komplexiert Lipopolysaccharide und permeabilisiert Membranen dadurch (Vaara *et al.*, 1981). Die Suspension wurde durch Zentrifugation für 45 Minuten bei 15.000 g und 4 °C in Periplasma (Überstand) und Zellen (Pellet) aufgetrennt. Das Pellet wurde in Pufferlösung (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 8) resuspendiert und für die in Abschnitt II.5.2 beschriebene Membranpräparation verwendet.

5.1.2 Membranpräparation

Der Zellaufschluss erfolgte in einem Volumen von 3 ml mittels French-Press (American Instruments Company, Maryland, USA). Um DNA zu entfernen, wurde die Suspension mit 0,1 mg/ml DNase I (3000 U/mg, AppliChem, Darmstadt) versetzt. Anschließend wurde ein Arbeitsdruck von 8,7 MPa angelegt und bei konstantbleibendem Arbeitsdruck die Zellsuspension kontinuierlich durch eine Kanüle (Ø 0,8 mm) auf Normaldruck entlassen. Diese Prozedur wurde zweimal je Probe wiederholt. Durch Zentrifugation für 3 x 5 Minuten bei 9000 g und 4 °C wurden intakte Zellen entfernt. Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge (L60-Ultrazentrifuge, Beckmann-Coulter) bei 208.000 g und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Das Pellet stellt innere sowie äußere Membranfraktion dar. Nach Zugabe von Puffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 2 % Triton-X100, pH 8) wurde das Pellet mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

5.2. Protein-Quantifizierung

Zur Quantifizierung des Proteingehalts einer Probe wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) angewandt. Als Referenz dienten Standards aus Albumin Fraktion V (Carl Roth) mit einem Konzentrationsbereich von 0,0 – 0,1 mg/ml. Proben und Standards wurden in einer 96-Well-Platte 1:10 mit BradfordUltra (Expedeon) versetzt und die Absorption in einem Lesegerät (iMark Microplate reader, Biorad) bei 595 nm ausgelesen.

5.3. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (Laemmli, 1970) nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Dabei erfolgte die Auftrennung der denaturierten Proteine über Anlegen einer Spannung von 120 V (Powerpac HC, Biorad). Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe des Ladepuffers (Tabelle 17) und Hitzezufuhr (25 µl Probe + 5 µl 6x SDS-Ladepuffer, 3-5 Minuten bei 95 °C).

Das polymerisierte Gel, bestehend aus Trenn- (Tabelle 14) und Sammelgel (Tabelle 15), wurde mit Laufpuffer (Tabelle 16) überschichtet und anschließend mit den entsprechenden Proben beladen. Als Größenmarker dienten BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics) oder PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Tab. 10: Komponenten des Trenngels für ein Gel, 12 % Acrylamid (w/v).

Substanz	Zusammensetzung	Volumen
ddH ₂ O	-	3,1 ml
Trenngelpuffer	2 M Tris/HCl, pH 8,8	2,25 ml
Acrylamid Lösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	3,6 ml
SDS	20 % (w/v) in ddH ₂ O	45 µl
TEMED	-	9 µl
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in ddH ₂ O	45 µl

Tab. 11: Komponenten des Sammelgels für ein Gel, 4 % Acrylamid (w/v).

Substanz	Zusammensetzung	Volumen
ddH ₂ O	-	4,38 ml
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl, pH 6,8	375 µl
Acrylamid Lösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	0,825 ml
SDS	20 % (w/v) in ddH ₂ O	30 µl
TEMED	-	7,5 µl
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in ddH ₂ O	30 µl

Tab. 12: Komponenten des SDS-Laufpuffers (pH 5,8).

Substanz	Menge [g/l]
SDS	1,0
Glycin	14,4
Tris	3,0

Tab. 13: Komponenten des 6x SDS-Ladepuffers.

Substanz	Volumen [ml]
1 M Tris/HCl, pH 6,8	1,5
10 % SDS (w/v)	6,0
Glycerin	5,0
β-Mercaptoethanol	3,0
0,5 % (w/v) Bromphenolblau	3,0

5.4. Proteinfärbung

5.7.1 Hämgruppen-Färbung

Cytochrome wurden indirekt über eine Färbung der Hämgruppen detektiert. Die Peroxidaseaktivität der Hämgruppen kann qualitativ durch die Reduktion von H₂O₂ und die damit verbundene Übertragung von Elektronen auf TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) nachgewiesen werden. Der damit verbundene Farbumschlag von TMB (farblos zu blau) macht etwaige Cytochrome auf dem SDS-Gel sichtbar (Thomas *et al.*, 1976). Die durchgeführten Wasch- und Fixierschritte sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tab. 18: Wasch- und Fixierschritte zur spezifischen Hämgruppenfärbung.

Arbeitsschritt	Substanz	Dauer
Protein-Fixierung	12,5 % TCA (w/v) in ddH ₂ O	30 min
Waschen	ddH ₂ O	30 min
Hämgruppen-Färbung	- 10 mg TMB in 9 ml ddH ₂ O - 1 ml Citratpuffer (0,5 M Citrat pH 6,4) - 40 µl konz. H ₂ O ₂	30 min

5.7.2 Coomassie-Färbung

Zur unspezifischen Färbung aller Proteine im SDS-Gel wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt (Zehr *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurden SDS-Gele mit InstantBlue (Expedon), einem sogenannten „*single step stain*“, gefärbt. Dieser wurde nach Angaben des herstellenden Unternehmens verwendet.

5.5. Western-Blotting

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mittels *Semi-dry-western-blot*-Verfahrens von einem Acrylamidgel auf eine Trägermembran (Nitrocellulose-Membran, Carl Roth, Karlsruhe)

übertragen (Burnette 1981). In dieser Arbeit erfolgte der Transfer in einem (Trans-Blot-Turbo, Biorad) unter Anlegen einer Spannung (High MW2 [13 A, 25 V, 12 Minuten]). Die Schichtung in der Blotting-Kammer war dabei wie folgt: Auf die Anode wurden zwei mit Blotting-Puffer (Tabelle 19) getränkte Filterpapiere (Roth, Karlsruhe), eine Nitrocellulose-Membran, das Acrylamidgel und zwei weitere Filterpapiere geschichtet. Der Deckel der Kammer (Kathode) wurde auf dem Aufbau verschraubt. Nach dem Transfer wurden fixierte Proteine mittels Immunodetektion (Abschnitt II.5.7) visualisiert.

Tab. 19: Komponenten des Blotting-Puffers.

Substanz	Menge
Tris	40 g
Glycin	20 g
Ethanol	150 ml
Methanol	50 ml
ddH ₂ O	Add 1000 ml

5.6. Immunodetektion

In dieser Arbeit wurden Antigene mittels Antikörperdetektion visualisiert. Dieses Verfahren wird als Immunodetektion bezeichnet (Towbin und Gordon, 1984). Als primäre Antikörper wurden ein Hase-Anti-MtrB Antikörper (Epitop = Gly²³-Cys⁴⁴) der Firma GenScript oder ein Hase-Anti-SNAP-Tag Antikörper (New England Biolabs) verwendet. Der anti-MtrB Antikörper wurde 1:2000, der anti-SNAP-Tag-Antikörper 1:1000 in je 20 ml TBS, 3 % BSA verdünnt und mehrfach verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Hase-Antikörper (1:7500 in 15 ml TBS, 3 % Milchpulver) verwendet. Die Färbung erfolgte mittels AP Conjugate Substrate Kit (Biorad) nach Standardprotokoll.

Die einzelnen Schritte der Immunodetektion sowie die dabei verwendeten Lösungen sind den Tabellen 20 und 21 zu entnehmen. Die Farbreaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 10-30 Minuten. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend mit dem ChemiDoc™ XRS+

System (BioRad) visualisiert. Die relative Proteinquantifizierung erfolgte über densitometrische Bestimmung mit der Image Lab Software (BioRad).

Tab. 20: Behandlungsschritte der Trägermembran zur Proteindetektion.

Dauer	Substanz	Zusammensetzung	
2x 10 min	TBS	Tab. 21	
1 h oder länger	Blockierlösung	3 % Milchpulver in TBS	
1h oder länger	Primärer AK	3 % BSA in TBS + 1:1000/1:2000 primärer AK	
2x 10 min	TBSTT	Tab. 21	
1x 10 min	TBS	Tab. 21	
1 h	Sekundärer AK	3 % Milchpulver in TBS + 1:7500 sekundärer AK	
4x 5 min	TBST	Tab. 21	
5x 2 min	ddH ₂ O	-	
20 - 30 min	Entwicklungslösung	ddH ₂ O	11,75 ml
		AP-Detektionspuffer	500 µl
		Color Reagent A	125 µl
		Color Reagent B	125 µl

Tab. 21: Komponenten der verwendeten Waschpuffer (pH 7,5) für die Immunodetektion.

Substanz	TBS-Puffer	TBST-Puffer	TBSTT-Puffer
	Konzentration	Konzentration	Konzentration
Tris	10 mM	20 mM	20 mM
NaCl	150 mM	500 mM	500 mM
Tween-20	-	0,05 %	0,05 %
Triton-X100	-	-	0,2 %

5.7. Ganzzell *pull-down* Assay

Um Stämme auf eine erfolgreiche MtrC-Sekretion hin zu untersuchen, wurde ein Ganzzell *pull-down* Assay mit *SNAP-Capture Magnetic Beads* (New England Biolabs) entwickelt. Die *SNAP-*

Capture Magnetic Beads dienen der selektiven Immobilisierung und magnetischen Abtrennung eines Proteins, das zuvor mit einem SNAP-Tag versehen wurde. Das SNAP-Tag Substrat Benzylguanin ist dazu an magnetische Agarose-Beads gebunden. Zellen, welche MtrC_{snap} exprimieren und sekretieren, verfügen über einen zugänglichen SNAP-Tag auf der Zelloberfläche. Diese Zellen wurden an die entsprechenden Beads gebunden und von Zellen, welche kein MtrC_{snap} sekretieren, abgetrennt. Dazu wurden die zu untersuchenden Kulturen im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Magnetic Beads wurden vor Verwendung zweimal mit Puffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8) gewaschen und je 50 µL Beads mit 500 µL Zellen OD₆₀₀ = 1 in LB-Medium versetzt. Die Zellen mit den *SNAP-Capture Magnetic Beads* wurden bei 180 rpm für 1 h bei RT inkubiert, damit Zellen, die MtrC_{snap} auf die Zelloberfläche sekretieren, an die Beads binden. Anschließend wurden Beads mit kovalent gebundenen Zellen und nicht-gebundene Zellen mittels *magnetic separation rack* voneinander separiert. Um alle nicht-gebundenen Zellen zu entfernen, wurden die Beads zweimal mit Puffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8) gewaschen.

6. Funktionsanalyse

6.1. Anthraquinon-2,6-disulfonat-Reduktionsassay

Um Stämme auf ihre Fähigkeit zur Anthraquinon-2,6-disulfonat-(AQDS)-Reduktion zu untersuchen, wurde eine anoxische Vorkultur in M9-Medium mit DMSO und Glycerin bzw. M4-Medium mit Laktat und Fumarat kultiviert. Dabei wurde der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von mindestens 0,4 und maximal 0,6 wurden entsprechende Induktoren zugegeben und die Kultur bei 30 °C für weitere 12 Stunden inkubiert.

Vor Starten des Assays wurden Elektronendonator und –akzeptor durch zweimaliges Waschen mit entsprechenden Salzen entfernt. Der Assay wurde in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, MI, USA) durchgeführt. Dazu wurde die Absorption der Kulturen im Triplikat (OD₆₀₀ = 6) in einer 96-Well-Platte über sechs Stunden (1 Messpunkt/Minute) mittels infinitePro 200 Spektrometer (Tecan) bei 436 nm gemessen. Als Elektronendonator wurden dazu 50 mM Glycerin, als Elektronenakzeptor 1 mM AQDS eingesetzt. Das Volumen pro Well betrug 200 µl.

6.2. Eisen-Reduktionsassay

Die Kultivierung der Stämme für den Eisen-Reduktionsassay erfolgte oxisch in LB-Medium (siehe Tabelle 3). Nachdem die Vorkultur bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 gewachsen war, wurden die Zellen unter oxischen Bedingungen pelletiert und zweimalig frei von Elektronenakzeptoren und -donoren gewaschen. Anschließend wurden im Triplikat je 100 ml Fe(III)-Citrat-Medium (Tabelle 5 mit 50 mM Fe(III)-Citrat) $OD_{655} = 1$ inokuliert.

Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 180 rpm in Laborflaschen (Duran, Mainz), welche gasdicht mit einem Kautschukstopfen verschlossen wurden. Unverzüglich nach Entnahme der Proben wurde eine Re-oxidation des entstandenen Fe-(II) durch Zugabe von 1 M HCl (900 µl 1 M HCl + 100 µl Probe) verhindert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Zur quantitativen Bestimmung des Fe(II)-Gehalts wurde ein Ferrozine-Assay nach Stookey durchgeführt (Stookey, 1970). Ferrozine ((3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl)-1,2,4-triazin-sulfonsäure) komplexiert Fe(II). Als Referenz dienten Standards aus Ammonium-Fe(II)-Sulfat-Lösung mit einem Konzentrationsbereich von 0-5 µM. Anschließend wurden Proben sowie Standards 1:10 mit Ferrozine-Lösung (Tabelle 22) versetzt. Die Absorption wurde mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (iMark Microplate reader, Biorad) bei 595 nm ausgelesen.

Tab. 22: Komponenten der Ferrozine-Lösung zum quantitativen Eisen(II)-Nachweis.

Substanz	Menge
Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]-benzosulfonat	0,1 % (w/v)
Ammoniumacetat	50,0 % (w/v)

6.3. Methylenblau-Reduktionsassay

Die MB-Reduktionsrate wurde in einem anoxischen Zellsuspensions-Assay ($OD_{600} = 6$) bestimmt, der in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, USA) mit $N_2(98 \%) / H_2(2 \%)$ -Atmosphäre durchgeführt wurde. Die Zellen wurden unter anoxischen Bedingungen in M9-Medium mit 50 mM DMSO als einzigem Elektronenakzeptor und 0,5 % (w/v) Glycerin

als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Expression der heterologen Gene wurde bei einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 induziert. Anschließend erfolgte eine weitere 12-stündige Inkubation bei 30 °C. Vor dem Start des Assays wurden die Zellen geerntet und zweimal frei von Elektronendonoren und -akzeptoren gewaschen. Die Zellen wurden dann in 50 μ L Medium ohne Elektronenakzeptor in einer Mikrotiterplatte auf eine OD_{600} von 12 verdünnt. Die Suspension wurde 30 Minuten lang in der Anaerobenkammer inkubiert, um jeglichen Restsauerstoff zu entfernen. Um den Reduktionsassay zu starten, wurden 50 μ L MB mit einer Konzentration von 546 μ M zeitgleich mit einem Dispenser-Tool (Infinite 200 PRO, Tecan, Männedorf, Schweiz) in jedes Well gegeben. Der Assay wurde mit einer finalen Arbeitskonzentration von 273 μ M MB einer Zellzahl von $OD_{600} = 6$ durchgeführt. Die Absorption wurde bei 660 nm mit dem Spektrometer Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Der Assay war in der Regel innerhalb weniger Minuten abgeschlossen.

6.4. Anoden-gestützte Fermentation

Das verwendete BES wurde in Vorarbeiten (weiter-)entwickelt (Golitsch, 2016; Beblawy, 2019). Der Mini-Reaktor für chronoamperometrische Messungen von Zellsuspensionen fasst ein Volumen von 23,11 ml und besteht aus einem Drei-Elektroden-Setup, mit einem ringförmigen 40 cm^2 Sigracell GFD 2,5 Graphit-Vlies (SGL Carbon, Wiesbaden) als Arbeitselektrode. Die Arbeitselektrode ist am Boden des Reaktors befestigt und bietet mittig eine Aussparung für einen magnetischen Rührstab. Ein 1,25 cm^2 Platinnetz (99,9 %, 10,24 Maschen/ mm^2 chemPUR, Karlsruhe, Deutschland) fungiert als Gegenelektrode und eine Ag/AgCl-Elektrode (Xylem-Gruppe, Deutschland) als Referenzelektrode. Arbeits- und Gegenelektrode waren durch eine Anionentauschermembran (Fumasep FAS-50, Fumatech BWT, Deutschland) getrennt. Das Anodenpotential wurde konstant auf 0 mV gegen Ag/AgCl ($E_{REF} = 199mV$ vs. Standard-Wasserstoff-Elektrode) gehalten. Die detaillierte Vorgehensweise inklusive Schemata des Reaktorsystems ist in Förster *et al.*, 2017 bzw. Beblawy *et al.*, 2020 beschrieben. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Reglers (Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland; Thermo Fisher Scientific Waltham, USA), der eine 0,5 M NaOH-Lösung über eine IP-N 4 ISMATEC Peristaltikpumpe (Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland) einspeist, zwischen 7,0 und 7,2 gehalten. Die Stromstärke wurde mit WaveNow Potentiostaten (Pine

Instruments) bzw. MultiEmStat 3+ Potentiostaten (PalmSens, Houten, Niederlande) kontinuierlich (Messintervall = 30 s) über sechs oder acht Stunden gemessen (Chronoamperometrie).

Das Elektrodenmaterial wurde in sterilem Reaktormedium über Nacht bei einem angelegten Potential von 0 mV gegen Ag/AgCl vorinkubiert. Das Vorinkubationsmedium (MOPS Medium mit 273 µM MB, 20 mM Glycerin bzw. 20 mM Glukose, Tab. 7) wurde zu Beginn der Messung gegen beimpftes Medium (OD₆₀₀ = 6) ausgetauscht. Das gesamte Experiment wurde in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, USA) unter N₂(98 %)/H₂(2 %)-Atmosphäre durchgeführt.

Der Reaktor zur Selektion der Fosmid-Bibliothek fasste ein Volumen von 250 ml. Der Reaktoraufbau gleicht dem Aufbau des Mini-Reaktors, im Unterschied zum Mini-Reaktor ist die Arbeitselektrode (36 cm² Graphit-Vlies (SGL Carbon, Wiesbaden) senkrecht an einem PTFE-Stab im Reaktor befestigt, durch den eine Edelstahlkanüle den Strom ableitet. Die Inkubation erfolgte in MOPS-Medium mit bzw. ohne 273 µM MB und 20 mM Glycerin (Tab.7) in einem Incudrive Inkubator (schuett-biotec, Göttingen) bei 30 °C. Während des Experiments wurde der Reaktor mit N₂ begast und der pH-Wert manuell zwischen 6,9 und 7,3 gehalten. Bei Erreichen eines Stromplateaus wurde die Arbeitselektrode in frisches Medium überführt. Dieser Vorgang wurde dreimal je Medium wiederholt.

Anhand der Quantifizierung von Substrat und Produkt (II.7.1-2) wurde die durchschnittliche Stromdichte über 6 bzw. 8 h des Experiments (*j*), die coulombsche Effizienz (CE), der Ertrag (*Y*) und die Produktivität (*Q*) der jeweiligen Fermentationsprozesse anhand der folgenden Formeln berechnet:

$$j = \frac{\int_{t_0}^{t_8} I}{t_8} \quad CE = \frac{\int_{t_0}^{t_8} I}{\Delta c \cdot V_r \cdot z_e \cdot \epsilon \cdot N_A} \quad Y = \frac{\Delta c_{Ace}}{\Delta c_{Gluk}} \quad Q = \frac{\Delta c_{Ace} \cdot M_{Ace}}{\Delta t}$$

I = elektrischer Strom, *A* = Elektrodenoberfläche, *t* = Zeit, *V_r* = Reaktorvolumen, *z_e* = Elektronen pro Reaktion, *c* = Konzentration, *ε* = Elementarladung, *M* = molare Masse, *Ace* = Acetoin, *Gluk* = Glukose, *N_A* = Avogadro-Konstante.

7. Chemische Analytik

7.1. Quantifizierung von Acetoin

Acetoin wurde über die Reaktion nach Voges-Proskauer photometrisch quantifiziert (Sigma Aldrich). Zur Kalibrierung wurden Acetoin-Standards mit Konzentrationen von 0 – 5 mM verwendet. Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt und mit den Standards in 96-Well-Platten in einem Volumen von 20 µl vorgelegt. Der Reaktionsmix (Tab. 23) wurde in einem Volumen von 140 µl zugegeben und der Farbumschlag nach 30-minütiger Inkubation bei RT in einem Lesegerät (iMark Microplate reader, Biorad) bei 490 nm photometrisch bestimmt.

Tab. 14: Komponenten des Reaktionsmix zur Quantifizierung von Acetoin.

Substanz	Menge [ml]
ddH ₂ O	10
L-Arginin (10 mg/ml)	1,4
50 mg 1-Naphtol in 1 ml Ethanol	1
KOH 40 %	1

7.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Quantifizierung von Glukose erfolgte durch Messung mittels HPLC. Die Proben wurden zusammen mit einem Laufmittel (5 mM H₂SO₄) über eine Säule mit einer selektiven stationären Phase aufgetrennt. Je nach Stärke der Interaktion ergibt sich die stoffspezifische Retentionszeit. Die Kalibrierung erfolgte dabei über externe Standards. Die Proben wurden vor der Messung für eine Minute bei 16.873 g zentrifugiert und der Überstand ein- bis zweimal durch einen 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. In 96-Well-Platten wurden je 150 µl Probe/Standard mit 15 µl 0,5 M H₂SO₄ versetzt und im Anschluss je 50 µl Probenvolumen auf die Säule appliziert. Dabei betrug die Flussrate 0,6 ml/min bei einer Säulentemperatur von 60 °C.

Die Trennung der Proben erfolgt mit einem UltiMat3000 SD HPLC System (Thermo Fisher Scientific) mit einer Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm) (BioRad). Die Detektion erfolgte entweder mittels Dioden-Array-Detektor vom Typ DAD-3000(RS) (Thermo Fisher Scientific)

oder mittels RefraktoMax 521 Brechungsindex Detektor (RI). Zucker und organische Säuren wurden mit Hilfe des RI-Detektors bei einer Polarisation von 500 mV detektiert.

7.3. Hämquantifizierung

Hämgruppen lassen sich anhand ihrer Absorptionsspektren unter verschiedenen Redoxzuständen charakterisieren und quantifizieren. Reduzierte *c*-Typ Cytochrome weisen unter anderem eine α - und eine β -Bande mit Absorptionsmaxima bei 550 und 535 nm auf. Die α -Bande ist im oxidierten Spektrum nicht vorhanden. Diese Differenz der Absorptionsmaxima wird zur Hämquantifizierung genutzt (Berry und Trumpower, 1987).

250 μ l einer Stammlösung aus 40 % (v/v) Pyridin in 200 mM NaOH und 3 μ l einer 0,1 M $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung wurden in eine 0,5-ml-Quarzküvette gegeben. 250 μ l der gegebenenfalls verdünnten Probe wurden unter gründlichem Mischen zugegeben, und das oxidierte Spektrum (400 - 600 nm) mit einem Spektrometer (Varian Cary 50, Agilent Technologies) aufgenommen. Anschließend wurde schrittweise festes Natriumdithionit (ca. 1 mg) zugegeben und nach jeder Zugabe das reduzierte Spektrum aufgenommen. Die Prozedur wurde wiederholt, bis keine Änderung der Absorption durch Zugabe von Natriumdithionit mehr erreicht wurde. Um den Hämgehalt der Probe zu bestimmen, wurde die Differenz zwischen oxidiertem und reduziertem Spektrum ermittelt. Die Berechnung erfolgte nach den folgenden Formeln unter Zuhilfenahme des Lambert Beer'schen Gesetzes:

$$A = [A_{550}(red) - A_{550}(ox)] - [A_{535}(red) - A_{535}(ox)]$$

A = Absorption; red = reduziert; ox = oxidiert

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d}$$

A = Absorption, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Schichtdicke

Der Absorptionskoeffizient beträgt $\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Robertson *et al.*, 1994)

7.4. Quantifizierung isoprenoider Chinone

Die Quantifizierung isoprenoider Chinone erfolgte an der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Simon. Die Zellen wurden dazu in M9-Medium (Tab 4) mit Glycerin und DMSO als Kohlenstoffquelle bzw. Elektronenakzeptor kultiviert. Nachdem eine $OD_{600} = 0,6$ erreicht war, wurden die entsprechenden Induktoren zugegeben und so die Expression heterologer Gene für 12 h induziert. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 g pelletiert und die Pellets unmittelbar in flüssigem Stickstoff geforen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C bzw. auf Trockeneis gelagert. Die Probenvorbereitung sowie die Quantifizierung via HPLC erfolgte wie in Hein, 2019 beschrieben.

III. Ergebnisse

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die Weiterentwicklung einer transplantierten EET-Kette sowie das Screening nach bislang unbekanntem obligaten Faktoren für relevante EET-Raten. Hierfür wurden zunächst systematisch Elemente des theoretischen Protein-Minimalsets für den EET in einem *E. coli*-Stamm aufgebaut und auf ihre Reduktionsleistung gegenüber AQDS untersucht. Diese werden im ersten Kapitel präsentiert und ins Verhältnis zu AQDS-Reduktionsraten von *S. oneidensis*-Stämmen mit vergleichbarer Proteinausstattung gesetzt. Darauf aufbauend wird die Integration und Untersuchung je eines weiteren möglicherweise EET-assoziierten Moduls beschrieben. Auch hier lag der Fokus auf der Ermittlung maximaler AQDS-Reduktionsraten. Den ersten Teil der Ergebnisse abschließend, wird die Vereinigung dieser Module in einem *E. coli*-Stamm behandelt. Es wird außerdem die Entwicklung eines *gain-of-function* Ansatzes vorgestellt, in dem randomisiert weitere Faktoren des EETs durch Selektionsverfahren identifiziert werden können.

In einem zweiten Teil sollen daraufhin Ergebnisse zur Weiterentwicklung eines *E. coli*-Produktionsstamms für den Einsatz in einer mediatorbasierten Elektrofermentation zur Synthese von Acetoin aus Glukose präsentiert werden.

1. Systematische Untersuchungen des Minimalsetups sowie EET-assoziiierter Faktoren im Hinblick auf die Funktionalität einer transplantierten EET-Kette

1.1. Steigerung der AQDS-Reduktionsraten in *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktionalität einer transplantierten EET-Kette aus dem nativen exoelektrogenen Organismus *S. oneidensis*, heterolog exprimiert in *E. coli*, verifiziert und untersucht werden. Die Leistungsfähigkeit dieser EET-Kette sollte dabei stetig, über alle Ausbaustufen hinweg, durch AQDS-Reduktionsassays (II.6.1) überprüft werden. Dazu sollten die untersuchten Module schrittweise eingebracht und systematisch analysiert werden. Über die jeweiligen maximalen AQDS-Reduktionsraten der unterschiedlichen Ausbaustufen sollte dann überprüft werden, ob und bei welchem Modul es eine direkte Korrelation zwischen dem jeweiligen Modul und EET gibt. AQDS wurde in dieser Arbeit als Elektronenakzeptor gewählt, da das Huminsäure-Analog häufig als extrazellulärer löslicher Elektronenakzeptor in

Untersuchungen zum EET eingesetzt wird (Shyu *et al.*, 2002, Bücking *et al.*, 2012). Außerdem verschiebt sich das Absorptionsmaximum durch Reduktion von AQDS zu AH₂QDS, was eine automatisierte kontinuierliche Messung der Reduktion ermöglicht.

Zu diesem Zweck wurden zunächst *E. coli*-Stämme in verschiedenen *c*-Typ Cytochrom/ β -barrel Ausbaustufen generiert bzw. überprüft. Als Ausgangsstamm diente hierbei JG9¹ (Gescher *et al.*, 2009). In einem zweiten Stamm wurde die Elektronentransferkette durch Co-Expression von STC ins Periplasma verlängert (Richter, 2014). Dabei wurde *cctA* von einem pMAL-Plasmid exprimiert, um eine höhere Gendosis zu erreichen. Dies wurde angestrebt, da vorangegangene Studien zumindest in *S. oneidensis* einen verbesserten Elektronenfluss bei erhöhter *cctA*-Kopienzahl zeigten (Delgado *et al.*, 2019). Anschließend wurde der MtrAB bzw. MtrAB^s Komplex durch stabile genomische Integration der entsprechenden Gene co-exprimiert. Die Gene *mtrA*^(s) und *mtrB*^(s) wurden für *E. coli* kodonoptimiert, da gezeigt werden konnte, dass eine Kodonoptimierung zu einer verbesserten Expression von MtrB führt (Philipp, 2017). Dadurch wurde theoretisch der Elektronentransfer über die äußere Membran auf lösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren ermöglicht. In einer letzten Ausbaustufe des Minimalsets des EETs wurden zusätzlich zu *cctA* auch *mtrC* und *pilD* von einem pMAL-Plasmid exprimiert. Dieser Stamm verfügte also über das mutmaßlich vollständige Minimalset an Proteinen, welche den Organismus nach derzeitiger Literaturlage zur Reduktion unlöslicher extrazellulärer Elektronenakzeptoren befähigen. Die Stämme wurden dann in Zellsuspensionsassays mit einer OD₆₀₀ von 6 auf ihre Fähigkeit zur AQDS-Reduktion getestet (Abschnitt II.6.1). Als Vergleich wurden *S. oneidensis*-Stämme (WT, Δ OMC und die Δ OMC MtrAB^s Suppressormutante) hinsichtlich ihrer AQDS-Reduktionsraten untersucht (Abbildung 7). Dabei erreichte der *E. coli* WT eine maximale Reduktionsrate von $0,025 \pm 0,031$ AQDS nmol min⁻¹ $8 \cdot 10^8$ Zellen⁻¹. Die erste Ausbaustufe des *E. coli*-Stamms, die *CymA* exprimiert, zeigte eine leicht gesteigerte maximale Reduktionsrate von $0,072 \pm 0,01$ AQDS nmol min⁻¹ $8 \cdot 10^8$ Zellen⁻¹, welche durch Co-Expression von STC weiter auf $0,09454 \pm 0,02782$ AQDS nmol min⁻¹ $8 \cdot 10^8$ Zellen⁻¹ gesteigert werden konnte. Die nächste Ausbaustufe des *E. coli*-Stamms, welche zusätzlich zu *CymA* und STC die Suppressorvariante von MtrAB (MtrAB^s) exprimiert, ist im Bezug auf die Proteinausstattung zum EET vergleichbar mit der *S. oneidensis* Δ OMC MtrAB^s Suppressormutante. Hier erreichte der *E. coli*-Stamm eine maximale AQDS-Reduktionstate von $0,514 \pm 0,064$, AQDS nmol min⁻¹ $8 \cdot 10^8$ Zellen⁻¹ und der korrespondierende *S. oneidensis*-

¹ *E. coli* DH5 α ZI Δ (*napC-F*) Δ (*frdA-D*)::p_{tet}_{cymA}; pEC86

Stamm eine maximale AQDS-Reduktionstate von $209 \pm 6,24$ AQDS $\text{nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8$ Zellen $^{-1}$. Der *E. coli*-Stamm, der CymA, STC und MtrAB exprimiert, weist eine vergleichbare, für den EET relevante Proteinausstattung zum *S. oneidensis* Δ OMC-Stamm auf. Im AQDS-Reduktionsassay erreichten die beiden Stämme maximale Raten von $0,448 \pm 0,011$ (*E. coli*) und $141,32 \pm 2,08$ AQDS $\text{nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8$ Zellen $^{-1}$ (*S. oneidensis*). Schlussendlich wurde in einem *E. coli*-Stamm das gesamte minimale Proteinsetup des EETs, CymA, STC und MtrCAB, exprimiert. Dieser Stamm sollte, den EET betreffend, eine ähnliche Konfiguration verglichen mit dem *S. oneidensis* WT aufweisen. In den AQDS-Assays erreichte der entsprechende *E. coli*-Stamm eine maximale Reduktionsrate von $0,8156 \pm 0,0067$ AQDS $\text{nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8$ Zellen $^{-1}$, während der *S. oneidensis* WT eine maximale Reduktionsrate von $246,18 \pm 1,69$ AQDS $\text{nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8$ Zellen $^{-1}$ aufzeigte. Werden die jeweils korrespondierenden Stämme im Vergleich betrachtet sind die maximalen Reduktionsraten der *S. oneidensis*-Stämme um Faktor ~ 410 (Δ OMC MtrAB^s), ~ 315 (Δ OMC) und ~ 300 (CymA, STC und MtrCAB) höher als die der jeweiligen *E. coli*-Stämme. Diese Zahlen verdeutlichen nochmals, dass es höchstwahrscheinlich weitere Faktoren des EETs zusätzlich zu dem bisher beschriebenen minimalen Proteinsetup zu geben scheint. Diese zu identifizieren, war Motivation der weiteren Arbeit.

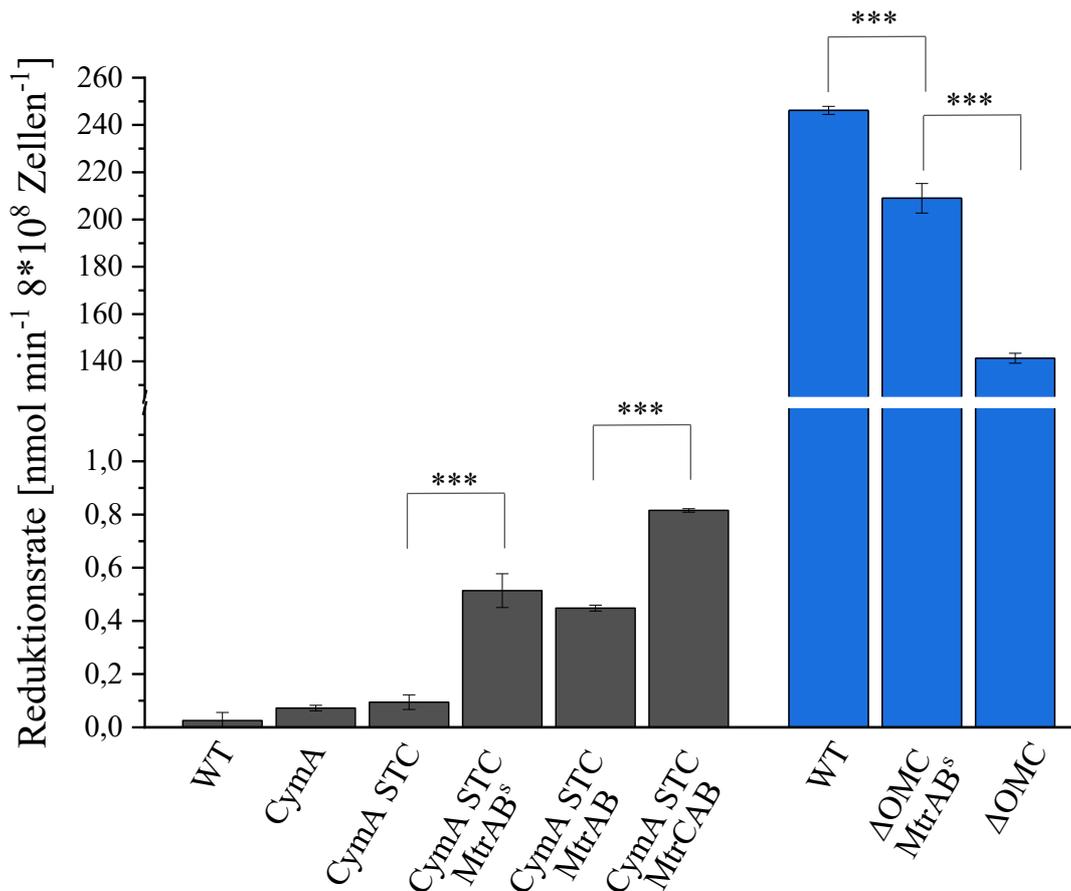


Abb. 7: Maximale AQDS-Reduktionsraten verschiedener *E. coli*- (a) und *S. oneidensis*-Stämme (b): In Grau (*E. coli*) bzw. Blau (*S. oneidensis*) sind die jeweiligen AQDS-Reduktionsraten in nmol AQDS min⁻¹ 8*10⁸ Zellen⁻¹ aufgetragen. Die Versuche wurden dabei als Zellsuspensionsassay mit einer OD₆₀₀ von 6 (*E. coli*) und einer OD₆₀₀ von 3 (*S. oneidensis*) durchgeführt. Die dargestellten Werte sind auf eine einheitliche Zellzahl normiert. Erläuterungen zu den einzelnen Stämmen sind dem Text zu entnehmen. Die Markierung *** gibt einen signifikanten Unterschied in der jeweiligen Reduktionsrate an (unpaired t-test, p < 0,001).

1.2. Heterologe Synthese von Menachinon-7

Um Faktoren zu identifizieren, welche die große Diskrepanz zwischen vergleichbar ausgestatteten *E. coli*- und *S. oneidensis*-Stämmen verursachen, wurden in dieser Arbeit Schritt für Schritt unterschiedliche, für einen erfolgreichen EET wichtige Faktoren adressiert. Zunächst wurde dazu der initiale Schritt des EETs untersucht. Dieser besteht in der Reduktion der QH₂-Dehydrogenase CymA. Dabei überträgt membrangebundenes Menachinon respiratorisch anfallende Elektronen auf CymA, welches als *c*-Typ Cytochrom der inneren Membran den

Eintrittspunkt der Elektronen in unterschiedliche Elektronentransferwege bereitet. Sollte die Interaktion und somit der Elektronentransfer nur mit MK-7 zu relevanten Raten erfolgen, könnte die endogene Synthese von MK-8 in *E. coli* die Reduktionsraten minimieren (McMillan *et al.*, 2012).

Um den Einfluss des synthetisierten Menachinons für die Funktion der heterolog exprimierten Elektronentransportkette aus *S. oneidensis* in *E. coli* zu überprüfen, sollte zunächst die Synthese von MK-7 in *E. coli* etabliert und anschließend vergleichende Wachstums- und Reduktionsassays durchgeführt werden.

Mittels isothermaler *in vitro*-Ligation wurden die Gene *hepS*, *hepT* sowie ein Gen welches mutmaßlich für eine Heptaprenyltransferase kodiert, in ein pMAL-*cctA*-Plasmid unter Kontrolle eines p_{Tac}-Promotors integriert. Die entsprechenden Gene stammen aus *B. subtilis* DSM1088. Das sequenzierte Plasmid (pMAL_MK-7_*cctA*) wurde in einen *E. coli* Rezipientenstamm (JG1358²) transformiert, welcher *cymA*, *mtrAB*^s und pEC86 trug. Daraus resultierte der Stamm JG1673. Als Kontrollstamm diente in allen durchgeführten Analysen *E. coli* JG1358 mit pMAL-*cctA*-Plasmid (JG1359).

Zur Analyse der jeweils synthetisierten isoprenoiden Chinone wurden beide Stämme, wie in Abschnitt II.3 beschrieben in M9-Medium mit DMSO und Glycerin unter anoxischen Bedingungen im Triplikat kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert und an der TU Darmstadt mittels HPLC auf die jeweilige Chinonzusammensetzung untersucht (Abbildung 8). Die Analysen zeigten, dass der Menachinonpool von JG1673 zu $70 \pm 2,4$ % aus MK-7 bestand. Mit $19,7 \pm 1,9$ % bildete DMK-7 den zweitgrößten Anteil. MK-6 und MK-8 wiesen lediglich einen Anteil von $8,9 \pm 0,5$ % bzw. $1,5 \pm 0,12$ % auf. Es konnte in JG1673 weder UK-8, DMK-8 noch MK-8 detektiert werden. Der Kontrollstamm synthetisierte keine detektierbaren Mengen MK-7, MK-6 und DMK-7. Der Chinonpool in JG1359 bestand zu $57,9 \pm 4,5$ % aus UK-8, zu $12,4 \pm 2,3$ % aus DMK-8 und zu $29,7 \pm 2,2$ % aus MK-8.

² *E. coli* DH5 α ZI Δ (*napC-F*) Δ (*frdA-D*)::P_{tet}*cymA* attP21::P_{ara}*mtrAB*^s, pEC86

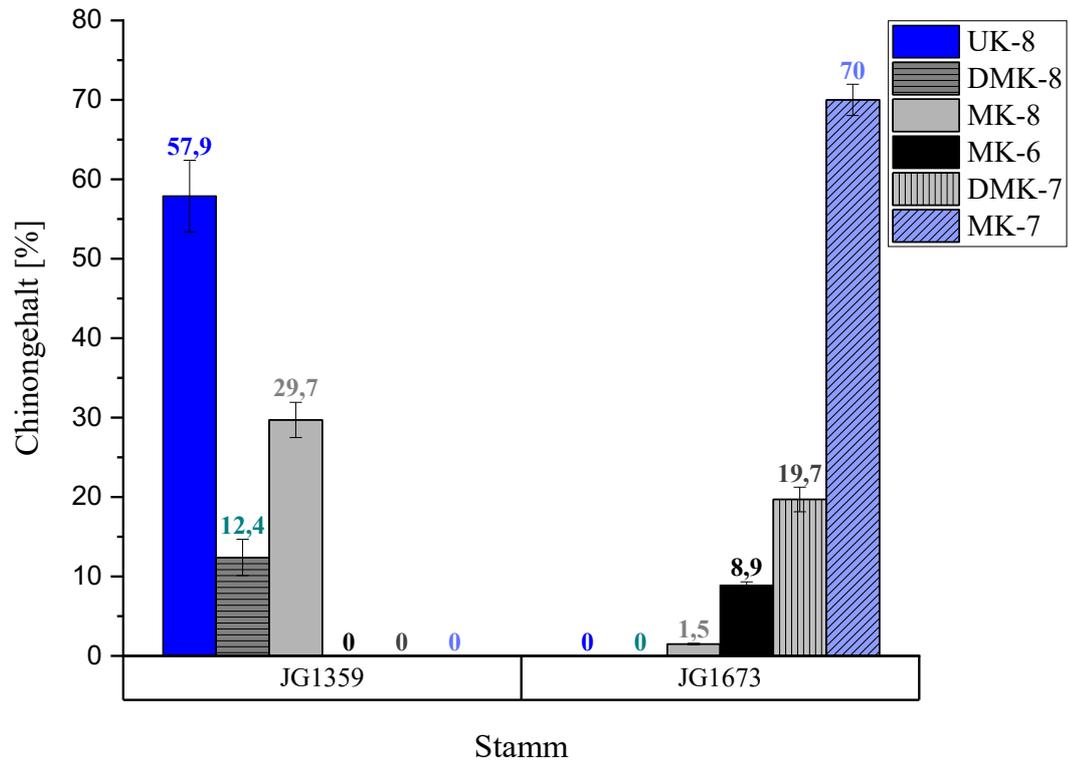


Abb. 8: Übersicht über den Chinongehalt der Stämme JG1359 und JG1673: Abgebildet sind die prozentualen Zusammensetzungen verschiedener MK-, DMK- und UK-Spezies der beiden Stämme unter anoxischen, DMSO-respirierenden Bedingungen.

Um den Einfluss bzw. die Funktionalität der veränderten Chinon-Zusammensetzung zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche unter oxischen und anoxischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die beiden Plasmide pMAL_MK-7_cctA und pMAL-cctA in einen gärfähigen, obligat respiratorischen Stamm (JG1586³) eingebracht (Förster *et al.*, 2017; Beblawy *et al.*, 2020; Kolb, 2021). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass der Stamm die synthetisierten Chinone nutzen muss, um Wachstum zu zeigen. Die Zunahme der optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) wurde über die Zeit gemessen und in Abbildung 9 a und b aufgetragen.

Für die oxische Wachstumskurve wurden beide Stämme mit einer initialen OD₆₀₀ von 0,03 inokuliert. Nach einer lag-Phase stieg die OD₆₀₀ exponentiell an. Die stationäre Phase erreichte JG1586_pMal_cctA mit einer OD₆₀₀ von $3,17 \pm 0,05$ nach 12 h, JG1586 pMAL_MK-7_cctA erreichte diese nach 15 h mit einer OD₆₀₀ von $2,95 \pm 0,24$. Die spezifische Wachstumsrate μ

³ *E. coli* DH5 α ZI $\Delta(napC-F) \Delta(frda-D)::P_{tet_cymA_mtrA_mtrB}$, $\Delta galK$, $\Delta adhE$, pfl^- , $aceF^*$, $rpoC^- \Delta ldhA::cscRAKB$, $\Delta pta_ackA::galK$

lag für JG1586_pMAL_ *cctA* bei $0,385 \pm 0,044$, für JG1586 pMAL_MK-7_ *cctA* bei $0,369 \pm 0,044$ (unpaired t-test, $p > 0,05$). Unter anoxischen Bedingungen mit DMSO als Elektronenakzeptor dauerte die lag-Phase etwa 12 h. Nach 22 bzw. 26 h erreichten JG1586 pMal_ *cctA* bzw. JG1586 pMal_MK-7_ *cctA* eine maximale OD₆₀₀ von $1,11 \pm 0,04$ bzw. $1,1 \pm 0,02$. Die jeweiligen Wachstumsraten betragen $0,201 \pm 0,005$ für JG1586 pMal_ *cctA* und $0,158 \pm 0,028$ für JG1586 pMal_MK-7_ *cctA* und die Differenz war mit $p > 0,05$ (unpaired t-test) nicht signifikant.

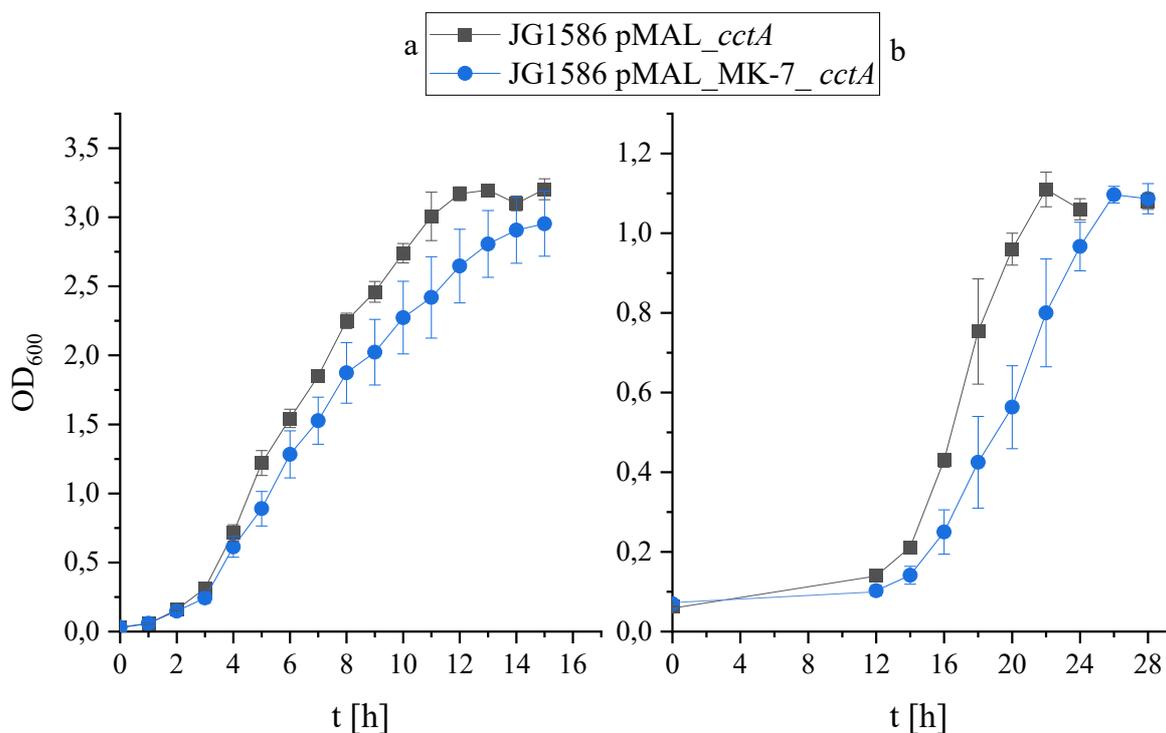


Abb. 9: Untersuchungen zu Wachstum und AQDS-Reduktion in Abhängigkeit von MK-7: In Abbildung a und b ist jeweils die OD₆₀₀ beider Stämme in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Dabei wurde das Wachstum zweier fermentationsdefizienter Stämme unter a oxischen Bedingungen in LB-Medium und b unter anoxischen Bedingungen in LB-Medium mit DMSO als Elektronenakzeptor untersucht. JG1586 pMAL_MK-7_ *cctA* (blau) trug dabei im Vergleich zu JG1586 pMAL_ *cctA* (grau) Gene zur MK-7-Synthese.

Abschließend sollte in einem AQDS-Reduktionsassay untersucht werden, ob die Interaktion von MK-7 und CymA zu einer gesteigerten Reduktionsrate gegenüber der Interaktion von MK-8 und CymA führt. Dazu wurden JG1673 und JG1359 wie in Abschnitt II.3 (M9-Medium mit DMSO und Glycerin) beschrieben kultiviert und die AQDS-Reduktion (II.6.1) in einem Zellsuspensionsassay (OD₆₀₀ = 6) durchgeführt.

Der maximale Reduktionsrate von AQDS zu AH₂QDS ist in Abbildung 10 aufgetragen. Beide Stämme hatten innerhalb der ersten zwei Stunden maximale Reduktionsraten von $57,7 \pm 4,2$ (JG1359) und $52,3 \pm 3,2$ (JG1673) AQDS $\text{nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$. Um eine bessere Übersicht über den direkten Vergleich zwischen dem Stamm mit dem entsprechend untersuchten Modul und der zugehörigen Kontrolle zu bieten, wurde je neuer Ausbaustufe die prozentuale Veränderung der Reduktionsrate gezeigt. Dabei wurde jeweils der Stamm mit der korrespondierenden Ausbaustufe als Kontrollstamm und Bezugswert gewählt. Davon abhängig wurde die Veränderung des Stamms mit jeweils neuem Modul in % dargestellt.

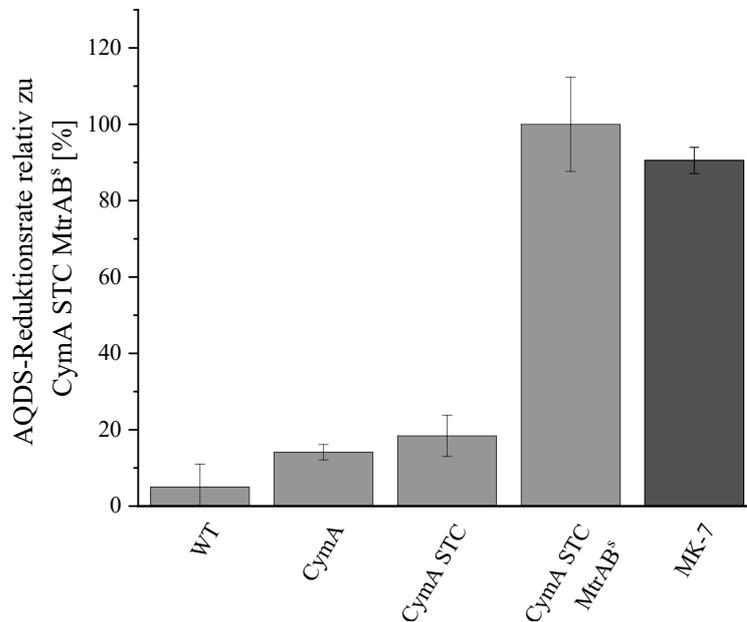


Abb. 10: Relative AQDS-Rate eines *E. coli* MK-7-Stamms: In Hellgrau ist die Veränderung der AQDS-Reduktionsrate der initialen Ausbaustufen des *E. coli*-Stamms in Prozent dargestellt, in Dunkelgrau im Vergleich die veränderte, prozentual maximale AQDS-Reduktionsrate relativ zu *E. coli* CymA STC MtrAB^s, also dem Stamm, dessen Ausbaustufe bis auf das zu untersuchende Modul mit der des getesteten Stamms korreliert und als Kontrolle diente. Der Unterschied des Stamms mit MK-7-Modul zum Kontrollstamm ist dabei nicht signifikant (unpaired t-test, $p > 0,05$).

1.3. Heterologe Expression der *ccm*-Gene

Das *ccm*-System ist ein hochkonserviertes System, über das *c*-Typ Cytochrome maturiert werden. Jedoch unterscheidet sich das *ccm*-System von *S. oneidensis* von dem in *E. coli* in seinem Aufbau. Zum einen unterscheidet sich die Orientierung der Operons in beiden

Organismen, zum anderen ist in *S. oneidensis* *ccmI* als zusätzliches Gen kodiert. Deshalb sollte in einem nächsten Schritt zur Verbesserung der Elektronentransferraten das Cytochrom *c*-Reifungssystem von *S. oneidensis* adressiert werden.

Bis *dato* wird bei heterologer Expression von Cytochromen in *E. coli* in der Regel das Plasmid pEC86 mit den *E. coli*-eigenen *ccm*-Genen co-exprimiert. Da die endogene Maturationsmaschinerie in *E. coli* für eine heterologe Überexpression von *c*-Typ Cytochromen zu schwach exprimiert ist, kann durch Verwendung des Plasmids pEC86 die Synthese endogener und heterologer Cytochrome wesentlich erhöht werden (Arslan *et al.*, 1998). In einer Publikation von Su *et al.* (2020 a) wurde erstmals ein hybrides *ccmH* mit Teilen aus *E. coli* und *S. oneidensis* heterolog exprimiert, es gibt bisher jedoch keine Vergleiche der beiden *ccm*-Cluster im Ganzen. Um einen direkten Vergleich der beiden *ccm*-Systeme zu ermöglichen, wurden die entsprechenden Gene aus *S. oneidensis* mittels isothermaler *in vitro*-Ligation (Abschnitt II.4.5) in dasselbe pEC86-Rückgrat integriert. Die Anordnung und Reihenfolge der Gene wurde entsprechend der nativen Anordnung der Operons wie folgt gewählt: *ccmABCDEFGHI* und *SO_0269*. Durch Integration dieser Gene wurden alle, in *S. oneidensis* als essenziell beschriebenen Gene in das pEC86 Rückgrat integriert (Jin *et al.*, 2013). Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das entsprechende Plasmid (pEC86_{*S.oneidensis*}) zusammen mit pMAL_ *cctA* in JG1339⁴ transformiert. Daraus resultierte der Stamm JG1679. Als Kontrollstamm diente JG1359 (JG1339 pMAL_ *cctA*; pEC86_{*E.coli*}).

Zunächst wurden die beiden Stämme hinsichtlich ihrer Cytochromqualität und -quantität untersucht. Die Expression der Cytochrome wurde mittels Hämgruppen-Färbung nachgewiesen. Dazu wurden die Stämme JG1359 und JG1679 in 50 mM HEPES gepuffertem LB-Medium oxisch vorkultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 anoxisch für 12 h bei RT induziert. Neben der Identifikation sollte außerdem die korrekte Lokalisation der Proteine nachgewiesen werden. CymA und MtrA^s sollten in der Membranfraktion und STC in der periplasmatischen Fraktion detektiert werden. Die Aufreinigung der Periplasma- bzw. Membranfraktionen, die elektrophoretische Auftrennung der Proteine und die Hämgruppen-Färbung und -Quantifizierung erfolgten wie in Abschnitt II.5.7.1 und II.7.3 beschrieben. Dabei zeigte die Hämgruppen-Färbung (Abbildung 11 a) in der periplasmatischen Fraktion beider Stämme ein deutliches Signal im Bereich von < 10-23 kDa. Das theoretische Molekulargewicht

⁴ *E. coli* DH5αZI Δ(*napC-F*) Δ(*frdA-D*)::P_{tet}_ *cymA* attP21:: *mtrAB*^s

von *STC* beträgt 12,9 kDa, jedoch konnte ein diffuses Laufverhalten für *STC* schon in anderen Arbeiten als charakteristisch beschrieben werden (Sturm *et al.*, 2015; Philipp, 2017). In der Membranfraktion von JG1359 war ein schwaches, diffuses Signal auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts von *CymA* (20,8 kDa) zu erkennen. Auch die Membranfraktion von JG1679 zeigte ein Signal auf Höhe von ca. 21 kDa – jedoch war hier eine deutliche, distinkte Bande zu erkennen. Weiterhin waren in den Membranfraktionen beider Proben Banden auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts von *MtrA^s* (32 kDa) detektierbar. Dabei war das Signal in der Membranfraktion von JG1359 deutlich stärker. In der periplasmatischen Fraktion von JG1359 waren weitere schwache Banden auf Höhe von 28 und 30 kDa sichtbar. In beiden periplasmatische Fraktionen war ein diffuses Signal bei ca. 32 kDa zu erkennen

Die Bestimmung des Hämgehalts (Abbildung 11 b) ergab für die periplasmatische Fraktion von JG1359 $1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ Häm/mg Protein und für die periplasmatische Fraktion von JG1679 $1,41 \pm 0,2 \mu\text{M}$ Häm/mg Protein. Für die beiden Membranfraktionen ergaben sich Mengen von $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ Häm/mg Protein (JG1359) und $0,36 \pm 0,13 \mu\text{M}$ Häm/mg Protein.

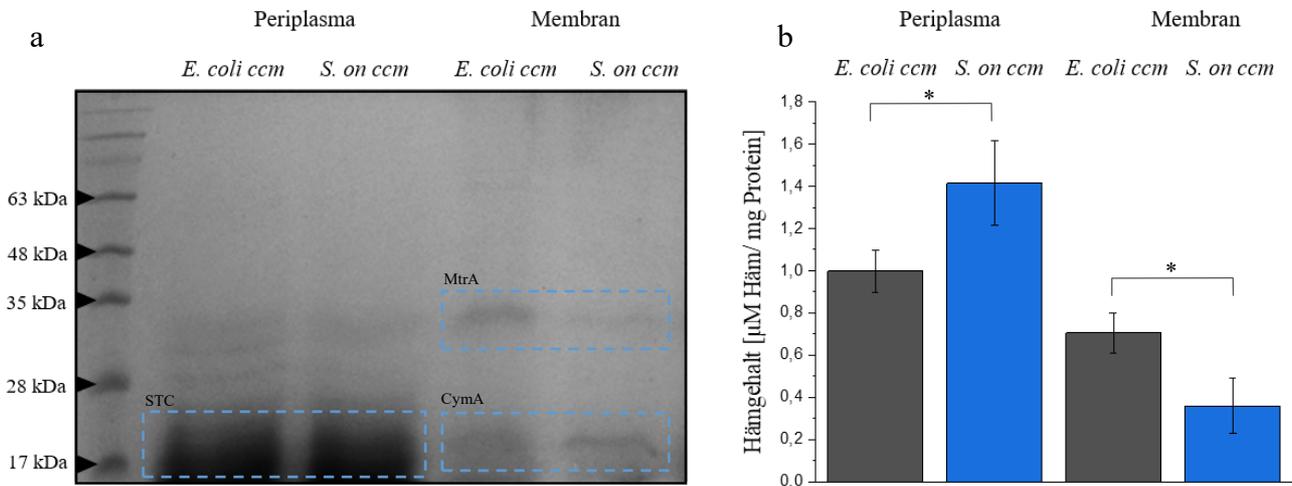


Abb. 11: Hämgruppen-Färbung und Bestimmung des Hämgehalts der Periplasma- und Membranfraktionen von JG1359 und JG1679: Die Induktion der Expression der heterologen Gene erfolgte in LB-Medium gepuffert mit 50 mM HEPES unter anoxischen Bedingungen bei RT über Nacht. In a sind die Hämgruppen-Färbungen von Periplasma- und Membranfraktion des Stammes mit *E. coli ccm*-Cluster und des Stammes mit *S. oneidensis* (*S. on*) *ccm*-Cluster gezeigt. Pro Membranfraktion wurden 100 μg , pro Periplasmafraktion 50 μg Gesamtprotein aufgetragen. Die induzierten Fraktionen zeigen Banden, welche mit den Größen der nachzuweisenden *c*-Typ Cytochrome korrelieren, relevante Banden wurden blau markiert. In b ist der Hämgehalt der beiden Membran- und Periplasmafraktionen in μM Häm/mg Protein aufgetragen, dabei ist der Unterschied in beiden Fraktionen jeweils signifikant (unpaired t-test, $p < 0,05$).

Außerdem wurden die Auswirkungen der Wahl der *ccm*-Gene auf die Güte der Maturation von MtrB^s sowie auf die Quantität von MtrB^s in der Membranfraktion untersucht. Dazu wurden je 100 µg Protein der Membranfraktionen von JG1359 und JG1679 mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 37 °C bzw. 95 °C für fünf Minuten inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung, das Übertragen der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran sowie alle durchgeführten Wasch- und Färbeschritte erfolgten wie in Abschnitt II.5.7 beschrieben. Der verwendete MtrB^s-Antikörper (GenScript, Piscataway) bindet an ein Epitop des Proteins, das unter wildtypischen Bedingungen nur zugänglich ist, sofern MtrB zuvor denaturiert wurde. In *S. oneidensis* ist dies der Fall, wenn die Proben mit SDS-Ladepuffer mit β-Mercaptoethanol versetzt und fünf Minuten bei 95 °C inkubiert werden (Marin, 2020; Stephan, 2015). Werden die Proben lediglich bei 37 °C inkubiert, ist MtrB nicht vollständig denaturiert und somit nicht auf der Nitrocellulosemembran detektierbar. Membranfraktionen aus *E. coli* zeigen jedoch auch bei unvollständiger Denaturierung (fünf Minuten bei 37 °C) Banden in der Immunodetektion. Zunächst wurde zu Beginn dieser Arbeit untersucht, ob dieses Faltungsdefizit auch in der MtrB^s Suppressor-Variante auftritt. Dazu wurden ein *E. coli*-Stamm sowie ein *S. oneidensis*-Stamm, welche MtrABs exprimieren, kultiviert. Nach Induktion der Expression heterologer Proteine wurde die Membran präpariert und mittels *western-blot* und anschließender Immunodetektion untersucht. Das Ergebnis der Immunodetektion nach Inkubation der Proben bei 37 oder 95 °C ist in Abbildung 12 gezeigt. Die Membranfraktion des *E. coli*-Stamms zeigt in beiden Proben eine Bande auf Höhe von ca. 75 kDa, was dem theoretischen Molekulargewicht von MtrB^s entspricht. Die Membranfraktion des korrespondierenden *S. oneidensis*-Stamms zeigt diese Bande nur bei der Probe, die zuvor auf 95 °C erhitzt wurde.

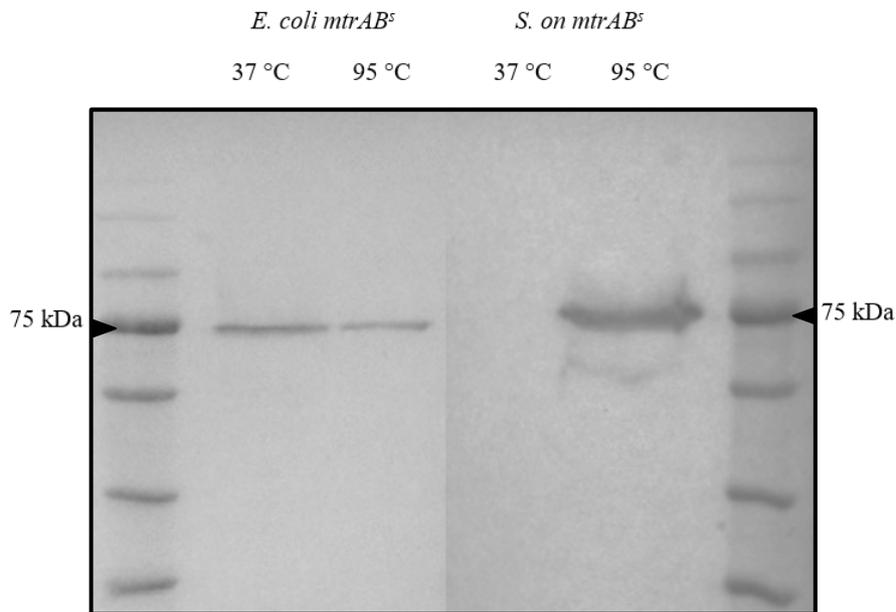


Abb. 12: Immunodetektion der Membranfraktionen von JG1359 und JG12: Die Abbildung zeigt die Immunodetektion von MtrB^s in der Membranfraktion eines *E. coli* Suppressor-Stamms (JG1359) sowie eines *S. oneidensis* Suppressor-Stamms (JG12). Vor der Beladung des SDS-Gels mit 100 µg Gesamtprotein wurde die Membranprobe mit Ladepuffer versetzt und einmal bei 37 °C und einmal bei 95 °C für je fünf Minuten inkubiert.

Die Immunodetektion von MtrB^s (Abbildung 13 a) zeigt in allen Proben ein Signal auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts von MtrB^s (ca. 75 kDa) unabhängig davon, ob in den Stämmen die *E. coli*-eigenen *ccm*-Gene oder das *ccm*-Cluster aus *S. oneidensis* exprimiert wurden. Auch war MtrB^s sowohl in Proben welche bei 37 °C, als auch in Proben, welche bei 95 °C inkubiert wurden, detektierbar. Außer den beiden Banden auf Höhe von 75 kDa zeigen die Membranfraktionen von JG1679 weitere Banden bei ca. 35, 63 und 90 kDa. Zusätzlich wurde die relative Menge an MtrB^s in der jeweiligen Membran bestimmt. Dazu wurden die Stämme JG1359 und JG1679 im Triplikate kultiviert und drei unabhängige Immunodetektionen durchgeführt. Nach der Visualisierung mittels ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad) erfolgte die relative Proteinquantifizierung über eine densitometrische Bestimmung relativ zur stärksten Bande mit der Image Lab Software (BioRad). Diese ist in Abbildung 13 b dargestellt. Dabei betrug der detektierte MtrB^s-Gehalt der Membranfraktionen von JG1359 bei Inkubation bei 37 °C $15 \pm 6 \%$ und bei Inkubation bei 95 °C $15,6 \pm 2,3 \%$. Membranfraktionen von JG1679 wiesen MtrB^s-Mengen von $104 \pm 4 \%$ (37 °C) und $82,67 \pm 6,9 \%$ (95 °C) auf. In Stämmen, welche das *S. oneidensis ccm*-Cluster exprimieren, konnte somit also ~6 x mehr MtrB^s detektiert werden als in Stämmen welche das *E. coli ccm*-Cluster exprimieren.

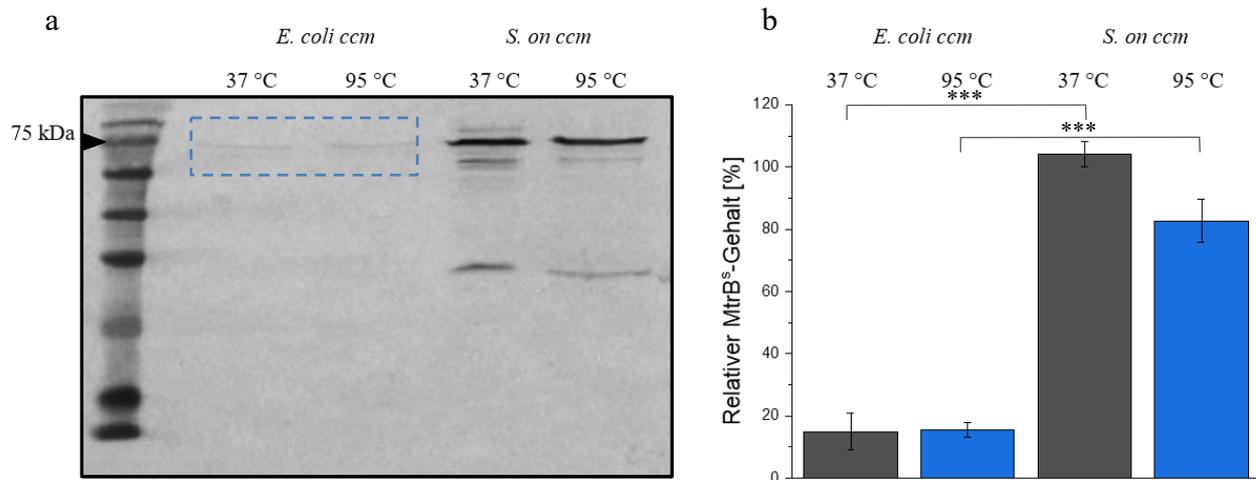


Abb. 13: Immunodetektion und Quantifizierung in den Membranfraktionen von JG1359 und JG1679: In **a** ist die Immunodetektion von MtrB^s in beiden Membranfraktionen gezeigt. Schwache Banden sind in Blau markiert. Vor der Beladung des SDS-Gels mit 100 µg Gesamtprotein wurde die Membranprobe mit Ladepuffer versetzt und je einmal bei 37 °C und einmal bei 95 °C für fünf Minuten inkubiert. In **b** ist der relative MtrB^s-Gehalt der Proben der Immunodetektion in Prozent gezeigt. Die Proben weisen unabhängig der Inkubationstemperatur einen jeweils signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$ (unpaired t-test) auf.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Expression der beiden unterschiedlichen *ccm*-Cluster zu einer Veränderung der AQDS-Reduktionsraten führt. Dazu wurden beide Stämme wie in Abschnitt II.3 (M9-Medium mit DMSO und Glycerin) beschrieben kultiviert und der AQDS-Reduktionsassay wie in Abschnitt II.6.1 beschrieben durchgeführt. JG1359 reduzierte AQDS mit einer maximalen Reduktionsrate von $0,68 \pm 0,006 \text{ nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$ und JG1679 mit einer maximalen Reduktionsrate von $0,63 \pm 0,004 \text{ nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$. Zur Veranschaulichung ist die prozentuale Veränderung zu den entsprechenden vorherigen Ausbaustufen in Abbildung 14 dargestellt. Um eine bessere Übersicht über den direkten Vergleich zwischen dem Stamm mit dem entsprechend untersuchten Modul und der zugehörigen Kontrolle zu bieten, wurde diese Art der Präsentation für jedes der getesteten Module gewählt. Dabei wurde jeweils der Stamm mit der korrespondierenden Ausbaustufe als Kontrollstamm und Bezugswert gewählt. Davon abhängig wurde die Veränderung des Stamms mit jeweils neuem Modul in % dargestellt.

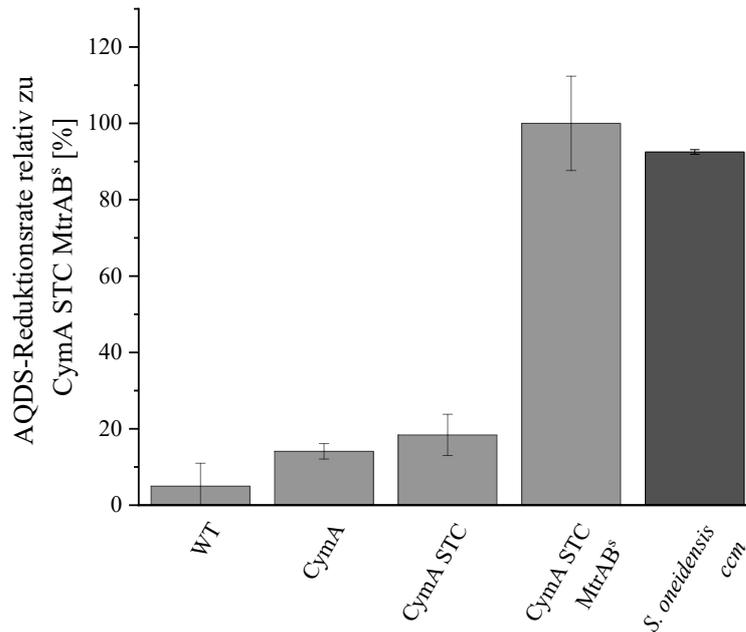


Abb. 14: Relative AQDS-Rate eines *E. coli* *ccms.oneidensis*-Stamms: In Hellgrau ist die Veränderung der AQDS-Reduktionsrate der initialen Ausbaustufen des *E. coli*-Stamms in Prozent dargestellt, in Dunkelgrau im Vergleich die veränderte, prozentual maximale AQDS-Reduktionsrate relativ zum *E. coli* CymA STC MtrAB^s-Stamm, also dem Stamm, dessen Ausbaustufe bis auf das zu untersuchende Modul mit der des getesteten Stamms korreliert, und als Kontrolle diente. Der Unterschied des Stamms mit *S. oneidensis* *ccm*-Modul zum Kontrollstamm ist dabei nicht signifikant (unpaired t-test, $p > 0,05$).

1.4. Heterologe Expression der TISS-Gene

Äußere Membrancytochrome wie MtrC müssen sowohl die innere als auch die äußere Membran von *S. oneidensis* bzw. *E. coli* passieren. Den Export der Proteine aus dem Periplasma durch die äußere Membran katalysiert das Typ-II-Sekretionssystem (TISS). In Mutanten von *S. oneidensis* mit Deletionen in *gspD*, *gspE* oder *gspG* kann kein MtrC an der Außenseite der äußeren Membran detektiert werden (Shi *et al.*, 2008). *E. coli* scheint, ähnlich der *S. oneidensis*-Deletionsmutanten nicht zur Sekretion von MtrC durch die äußere Membran befähigt zu sein. Zwar ist eine heterologe Expression von MtrC in *E. coli* möglich und auch die Verknüpfung der entsprechenden Hämgruppen im Periplasma ist erfolgreich, jedoch scheint MtrC an der dem Periplasma zugewandten Seite an der äußeren Membran lokalisiert zu sein (Jensen *et al.*, 2010; Richter, 2014; TerAvest *et al.*, 2014). Da dieser Phänotyp ähnlich dem der Mutanten von *S. oneidensis* mit Deletionen in Schlüsselgenen des TISS ist, sollte im

Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit das TISS von *S. oneidensis* spezifisch für die Sekretion von MtrC ist. Dazu wurde das gesamte Operon der TISS-Gene aus *S. oneidensis* stabil in das Genom eines *E. coli*-Stamms ohne funktionales endogenes TISS integriert und anschließend der Einfluss der Expression auf die Lokalisation von MtrC untersucht. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass nicht alle Gene exprimiert werden, wenn das gesamte Operon unter einem Promotor orientiert ist. (Richter, 2014). Deshalb wurde das Operon entsprechend der Transkriptstärke in drei Cluster – *gspDEF*C, *gspHIJK* und *gspGLMN* – aufgeteilt. Die Expression aller drei Cluster kann durch Zugabe von IPTG (Lac-Promotor) induziert werden. Die beiden Cluster *gspHIJK* und *gspGLMN* konnten bereits in Vorarbeiten stabil ins Genom integriert werden (Windhorst, 2016). Das Cluster *gspDEF*C konnte im Rahmen dieser Arbeit über die CRIM-Integration (Abschnitt II.4.8.1) ins Genom von JG1083⁵ integriert werden. Der daraus resultierte Stamm JG1636⁶ wurde mit pEC86 sowie pBAD-*mtrC_{snap}_pilD* transformiert. Die putative Typ-IV-Präpilin-Peptidase PilD wurde co-exprimiert, da die Aktivität des TISS und somit eine Sekretion äußerer Membrancytochrome in *S. oneidensis* von der Anwesenheit von pilD abhängt (Bouhenni *et al.*, 2009). Weiterhin ist bekannt, dass *E. coli* K-12-Stämme (und entsprechende Derivate, wie *E. coli* Dh5 α) keine Typ IV Pili synthetisieren, da mehrere der mutmaßlichen Pili-Gene in sehr geringen Mengen exprimiert werden. Da allerdings auch eine Steigerung der Expression nicht zu einer Pilusproduktion führte, wurde in dieser Arbeit, zusätzlich zum *gsp*-Operon, *pilD* aus *S. oneidensis* integriert, um ein funktionales TISS zu etablieren (Francetić *et al.*, 1998; Sauvonnnet *et al.*, 2000). Das heterolog exprimierte MtrC wurde mit einem SNAP-Tag versehen, um nachfolgende Lokalisationsstudien zu ermöglichen. Nachdem eine erfolgreiche Integration per Sequenzierung bestätigt werden konnte, sollte zunächst überprüft werden, ob alle TISS-assoziierten Gene exprimiert wurden. Dazu wurde der entsprechende Stamm in LB kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für 4 h induziert. Anschließend wurde RNA aus den Zellen isoliert und diese in cDNA umgeschrieben (Abschnitt II.4.2). Die qualitativen PCRs wurden daraufhin mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt und die Ergebnisse in Abbildung 15 dargestellt. Die Primer wurden jeweils so gewählt, dass Fragmente mit einer Größe von 200-300 bp

⁵ *E. coli* DH5 α ZI Δ (*napC-F*) Δ (*frdA-D*)::P_{tet}*_cymA* KII::P_{lac}*_gspHIJK* KIII::P_{lac}*_gspGLMN*

⁶ *E. coli* DH5 α ZI Δ (*napC-F*) Δ (*frdA-D*)::P_{tet}*_cymA* KII::P_{lac}*_gspHIJK* KIII::P_{lac}*_gspGLMN* attP21::P_{lac}*_gspDEF*C

amplifiziert wurden. Alle Primer-Kombinationen ergaben Banden auf Höhe der kalkulierten und erwarteten Größe. Als Negativkontrolle wurden Primer gewählt, die außerhalb des transkribierten Bereichs binden. Als Positivkontrolle diente die cDNA des *housekeeping*-Gens *rpoA*.

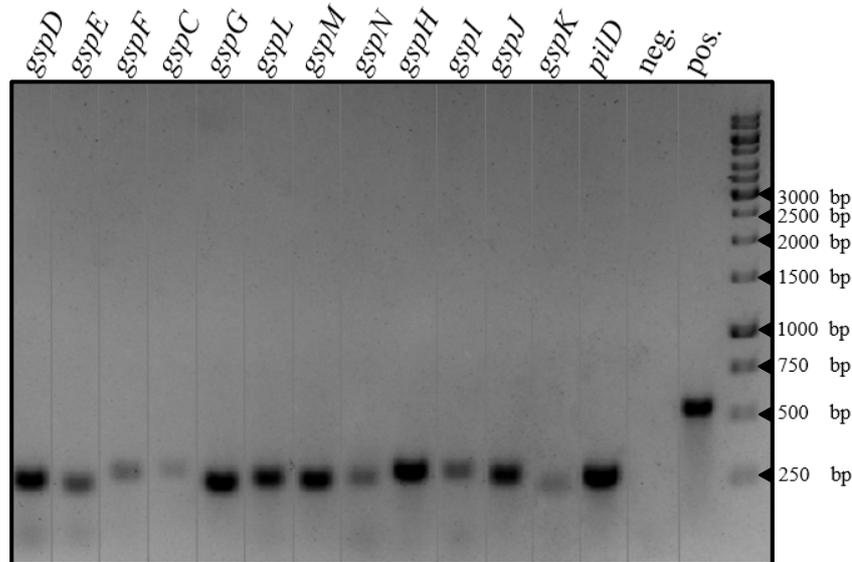


Abb. 15: Ergebnis der analytischen PCR zur Untersuchung der Transkription der THISS-Gene heterolog aus *S. oneidensis* in *E. coli* exprimiert: Nach Isolation der RNA und Entfernung der DNA wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und die entsprechenden Gene anschließend amplifiziert. Die Primer für die Positivkontrolle (pos.) binden in dem *housekeeping* Gen *rpoA*. Die Primer der Negativkontrolle (neg.) binden außerhalb des transkribierten Bereiches.

Anschließend wurde überprüft, ob $MtrC_{snap}$ funktional exprimiert werden kann. Dazu wurden je ein pBAD- $mtrC_{snap}$ und ein pBAD- $mtrC$ Plasmid in einen *S. oneidensis*-Stamm ohne äußere Membrancytochrome transformiert (Δomc). In den Membranfraktionen der Stämme *S. oneidensis* Δomc pBAD- $mtrC_{snap}$ und *S. oneidensis* Δomc pBAD- $mtrC$ konnte ein Cytochrom auf Höhe von ca. 70 kDa detektiert werden, was dem theoretischen Molekulargewicht von MtrC entspricht (Abbildung 16 a). Außerdem konnten Banden auf Höhe von ~35 und ~21 kDa (MtrA und CymA) detektiert werden. Beide Stämme wurden außerdem in einem Zellsuspensionsassay mit $OD_{600} = 1$ auf ihre Fähigkeit zur Fe(III)-Reduktion untersucht. Die Zunahme der Fe(II)-Konzentration wurde, wie in Abschnitt II.6.2 beschrieben, über die Zeit gemessen und in Abbildung 16 b aufgetragen. Beide Stämme reduzierten innerhalb von 24 h $44,21 \pm 0,24516$ (Δomc pBAD- $mtrC$) bzw. $44,14542 \pm 2,46$ mM (Δomc pBAD- $mtrC_{snap}$) Fe(III) zu Fe(II).

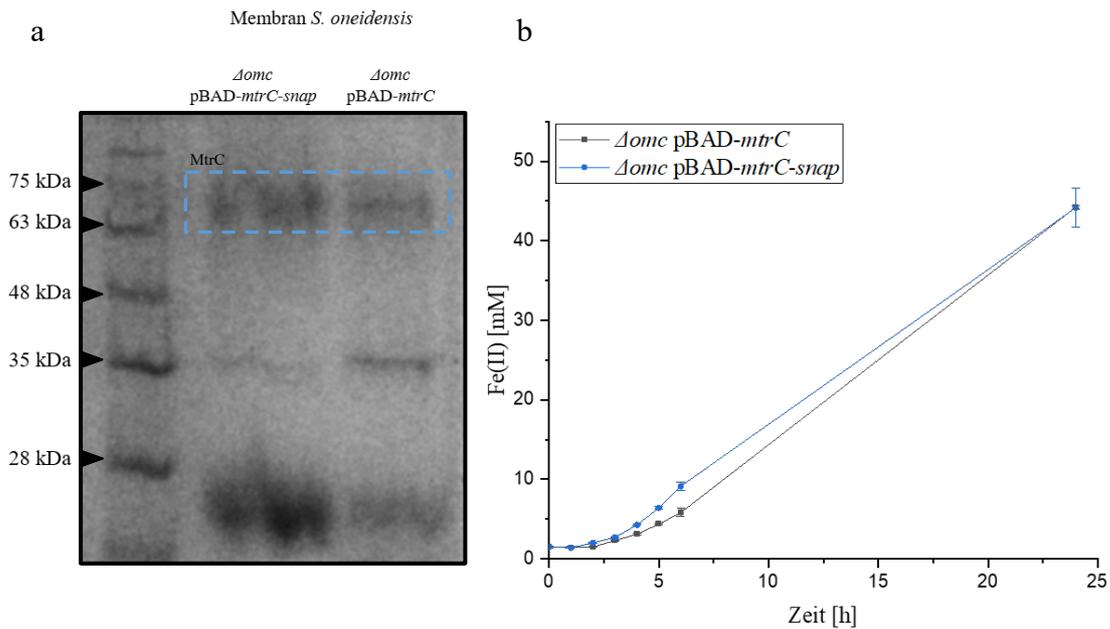


Abb. 16: Untersuchung der Expression und der Funktionalität von MtrC_{snap}: In **a** ist die Hämgruppenfärbung der Membranfraktionen von *S. oneidensis* Δomc pBAD-*mtrC-snap* und *S. oneidensis* Δomc pBAD-*mtrC* dargestellt. Die Induktion der Expression der heterologen Gene erfolgte in LB-Medium. Pro Membranfraktion wurden 100 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die induzierten Fraktionen zeigen Banden, welche mit den Größen der nachzuweisenden *c*-Typ Cytochrome korrelieren. Die entsprechenden Banden sind in Blau markiert. In **b** ist die Zunahme von Fe(II) im Rahmen eines Fe(III)-Citrat Reduktionsassays über die Zeit aufgetragen. Der Stamm welcher *mtrC-snap* exprimiert, ist in Blau, der Stamm, der *mtrC* exprimiert, in Grau dargestellt.

Nach erfolgreicher heterologer Expression der TISS-assoziierten Gene in *E. coli* sowie funktionaler Expression des MtrC_{snap} Tag Fusionsproteins in *S. oneidensis* sollte die Sekretion sowie die Funktionalität des MtrCAB-Komplexes in *E. coli* untersucht werden.

Um eine erfolgreiche Sekretion von MtrC_{snap} nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit ein *pull-down* Verfahren entwickelt. Dabei sollten Zellen, welche MtrC_{snap} auf der äußeren Membran tragen, mittels *SNAP-Capture Magnetic Beads* (New England Biolabs) kovalent gebunden und isoliert werden. Da Zellen mit Defizienz in der Sekretion von MtrC keinen zugänglichen SNAP-Tag auf der Zelloberfläche tragen, sollten diese Zellen nicht an die Beads binden. Welche Zellen an die Beads gebunden hatten, sollte mittels qPCR auf stamm-spezifische Gene ermittelt werden. Anschließend wurde das Verhältnis der einzelnen untersuchten Stämme vor und nach erfolgtem *pull-down* ermittelt. Um die Methode zu validieren, wurden zunächst zwei *S. oneidensis*-Stämme untersucht. Dabei handelte es sich um den WT sowie um einen $\Delta gspD$ -Stamm, welcher nicht dazu in der Lage ist, MtrC zu sekretieren. Beide Stämme trugen

zusätzlich das Plasmid pBAD-*mtrC_{snap}*. Nach Kultivierung der Zellen und Induktion der Expression von *mtrC_{snap}* wurden die beiden *S. oneidensis*-Stämme im Verhältnis 1:1 gemischt (1 mL OD₆₀₀ = 1). Davon wurden im Triplikate je 500 µL mit 50 µL *SNAP-Capture Magnetic Beads* (New England Biolabs) versetzt, die anderen 500 µL für 10 Minuten aufgeköcht und sofort eingefroren. Die 500 µL mit den *SNAP-Capture Magnetic Beads* wurden bei 180 rpm für 1 h bei RT inkubiert, damit Zellen, die MtrC_{snap} auf die Zelloberfläche sekretieren, an die Beads binden. Anschließend wurden Beads mit kovalent gebundenen Zellen und nicht-gebundene Zellen mittels *magnetic separation rack* voneinander separiert. Beads mit gebundenen Zellen wurden für 10 Minuten aufgeköcht. Um die Menge bzw. das Verhältnis von Zellen mit funktionalem TISS gegen Zellen ohne funktionales TISS zu ermitteln, wurde eine qPCR durchgeführt. Dazu wurden Primer, welche in *mioC*, einem Gen, welches für ein Flavodoxin Protein kodiert, binden, und Primer, welche in *gspD* binden, eingesetzt. Über eine erstellte Kalibriergerade konnte anschließend auf die Menge aller *S. oneidensis*-Zellen sowie auf die Menge der WT-Zellen (Zellen ohne Deletion in *gspD*) rückgeschlossen werden. Die qPCR wurde als Triplikate jeweils mit der initialen Mischkultur und mit den Zellen, die an die Beads gebunden hatten, durchgeführt. Aus dem initialen Verhältnis der Mischkultur und dem Verhältnis der an die Beads gebundenen Zellen wurde die Veränderung des Verhältnisses vor zu nach der Inkubation mit *SNAP-Capture Magnetic Beads* ermittelt. Dabei ergaben sich die in Abbildung 17 aufgezeigten Verhältnisse von $72,11 \pm 6,87 \%$ (*S. oneidensis* WT) zu $27,9 \pm 6,87 \%$ (*S. oneidensis* Δ *gspD*). Nachdem die Methode validiert werden konnte, wurde derselbe Versuch mit zwei *E. coli*-Stämmen wiederholt, um zu überprüfen, ob das heterolog exprimierte TISS in der Lage ist, MtrC in *E. coli* zu sekretieren. Dazu wurde das pMAL-*mtrC_{snap}_pilD* Plasmid in einem *E. coli* WT sowie in einem *E. coli*-Stamm mit TISS aus *S. oneidensis* exprimiert. Die qPCR wurde mit Primern, welche in *gspD* binden, und Primern, welche in *nuoA* binden, durchgeführt. Die entsprechenden Verhältnisse betragen $71,61 \pm 8,38 \%$ (*E. coli* TISS) zu $28,4 \pm 8,38 \%$ (*E. coli* WT) und sind ebenfalls Abbildung 17 zu entnehmen.

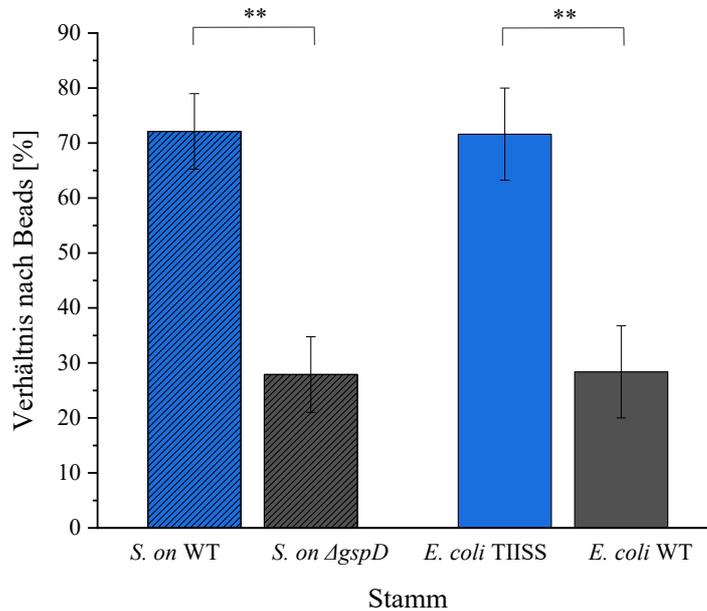


Abb. 17: Verhältnis der Stämme nach pull-down mittels SNAP-Capture Magnetic Beads: Dargestellt sind die prozentualen Anteile zweier pull-down-assays mit je zwei Stämmen. Schraffiert dargestellt sind die Verhältnisse von *S. oneidensis* WT (blau) und *S. oneidensis* Δ gspD (grau). Ohne Schraffur dargestellt sind die Verhältnisse eines *E. coli*-Stamms, der heterolog *mtrC_{snap}* und Gene des *S. oneidensis* TISSs exprimiert (blau), zu einem *E. coli* WT, der *mtrC_{snap}* exprimiert. Der Unterschied der Abundanz beider *E. coli*-Stämme zueinander sowie beider *S. oneidensis*-Stämme zueinander nach erfolgtem pull-down-Assay war mit $p < 0,01$ (unpaired t-test) signifikant.

Schlussendlich sollte ein AQDS-Reduktionsassay Aufschluss darüber geben, ob die Zunahme von *MtrC_{snap}* auf der Zelloberfläche auch zu einer verbesserten AQDS-Reduktionsrate führt.

Dazu wurden zwei weitere Plasmide erstellt, um einen Stamm zu erhalten, der alle bisher beschriebenen, für die AQDS-Reduktion notwendigen Gene enthält. Zunächst wurde das Plasmid pEC86_{gent^R}_{mtrAB} erstellt. Dieses wurde ausgehend von pEC86 wie folgt verändert: Die Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde über eine inverse PCR mit anschließender isothermaler *in-vitro* Ligation gegen eine Gentamycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Zusätzlich wurden die Gene *mtrA* und *mtrB* unter einem IPTG-induzierbaren (*p_{lac}*) Promotor integriert. Dies erfolgte ebenfalls über eine isothermale *in-vitro* Ligation. Die *E. coli* eigenen *ccm*-Gene blieben dabei erhalten. Außerdem wurde *cctA* über eine isothermale *in-vitro* Ligation in den pMAL_{mtrC_{snap}}_{pilD}-Vektor vor *mtrC* und *pilD* integriert. Beide Plasmide wurden in

JG9⁷ und in JG1636⁸ transformiert. Daraus resultierten die beiden Stämme JG1712 und JG1714. Der AQDS-Reduktionsassay wurde mit beiden Stämmen als Zellsuspensionsassay im Triplikot und mit einer OD₆₀₀ von 6 durchgeführt. Dabei reduzierte JG1712 AQDS mit einer maximalen Reduktionsrate von $0,327 \pm 0,0019 \text{ nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$ und JG1714 mit einer maximalen Reduktionsrate von $0,4596 \pm 0,0058 \text{ nmol min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$. Die AQDS-Reduktionsrate des TISS exprimierenden *E. coli*-Stamms (JG1714) ist in Abbildung 18 relativ zu der des direkten Vorgänger-Stamms (JG1712) aufgezeigt.

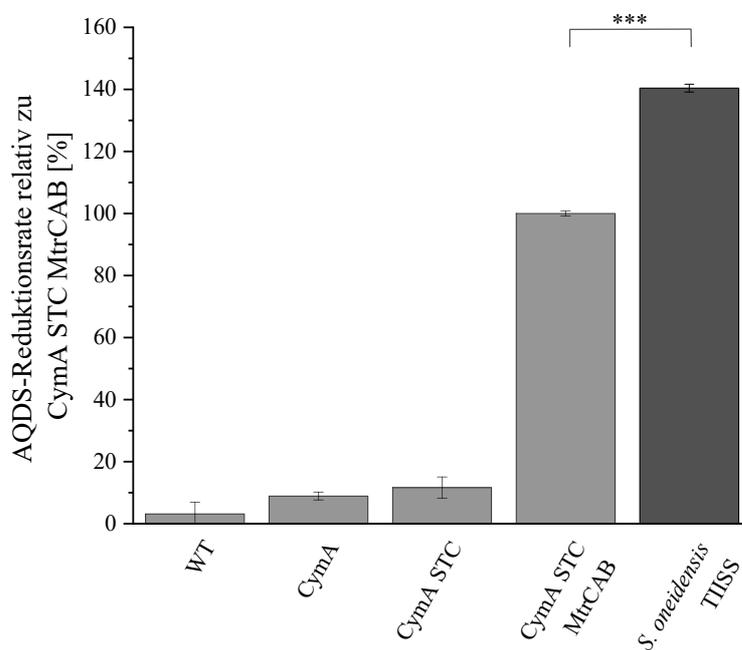


Abb. 18: Relative AQDS-Rate eines *E. coli* TISS_{*S. oneidensis*}-Stamms: In Hellgrau ist die Veränderung der AQDS-Reduktionsrate der initialen Ausbaustufen des *E. coli*-Stamms in Prozent dargestellt, in Dunkelgrau im Vergleich die veränderte, prozentual maximale AQDS-Reduktionsrate relativ zum *E. coli* CymA STC MtrCAB-Stamm, also dem Stamm, dessen Ausbaustufe bis auf das zu untersuchende Modul mit der des getesteten Stamms korreliert, und als Kontrolle diente. Der Unterschied des Stamms mit *S. oneidensis* *gsp*-Modul zum Kontrollstamm ist dabei signifikant (unpaired t-test, $p < 0,001$).

⁷ *E. coli* DH5 α ZI $\Delta(napC-F) \Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$

⁸ *E. coli* DH5 α ZI $\Delta(napC-F) \Delta(frdA-D)::P_{tet_cymA}$ KII::P_{lac} *_gspHIJK* KIII::P_{lac} *_gspGLMN attP21:: P_{lac}_gspDEFC*

1.5. Integration aller untersuchter Module in einen *E. coli*-Stamm

Die vorausgegangenen Kapitel beschäftigten sich jeweils mit der Verbesserung der EET-Raten durch Adressierung bestimmter Faktoren oder eines bestimmten Moduls EET. Nun sollten diese Module und Faktoren in einem finalen Stamm vereint werden, um zu untersuchen, wie sich einzelnen Module kombiniert in ihrer Gesamtheit auf die EET-Raten auswirken. Dieser Stamm könnte dann zum einen als möglicher Ausgangsstamm für Produktionsstämme in BES und zum anderen als Ausgangsstamm für weiterführende Untersuchungen zu den Grundlagen des EETs genutzt werden.

Dazu wurden, ausgehend von JG1636⁹, die Gene zur MK-7-Synthese *hepS*, *hepT* sowie das Gen, welches eine putative Heptaprenyltransferase kodiert, über eine Tn7-Integration in die *attnTn7-site* von JG1636 integriert. In diesen Stamm wurde das pMAL_ *cctA* _*mtrC_{snap}*_ *pilD* Plasmid eingebracht. Um die *ccm*-Gene aus *S. oneidensis* im finalen Stamm exprimieren zu können, wurde das Plasmid pEC86_ *gent^R*_ *mtrAB* (Abschnitt III.4) dahingehend modifiziert, dass die *E. coli*-eigenen *ccm*-Gene auf dem Plasmid mittels isothermaler *in-vitro* Ligation durch die *ccm*-Gene aus *S. oneidensis* ersetzt wurden. Daraus resultierte das Plasmid pEC86_{*S.oneidensis*}_ *gent^R*_ *mtrAB*. Dieses wurde ebenfalls transformiert, sodass ein finaler Stamm JG1711 mit allen Proteinen des minimalen Setups des EETs sowie Modulen für die MK-7-Synthese, die *c*-Typ Cytochrom-Maturation und die Sekretion von MtrC durch das TISS, resultierte. Der finale Stamm wurde in einem AQDS-Reduktionsassay auf die maximale Reduktionsrate untersucht und verglichen mit JG1712¹⁰, welcher im Unterschied zu JG1711 über die *E. coli*-eigenen *ccm*-Gene verfügt und keine Gene für die MK-7-Synthese heterolog exprimiert. Die entsprechenden relativen Reduktionsraten sind in Abbildung 19 dargestellt. Dabei zeigt JG1711 eine absolute AQDS-Reduktionsrate von $0,195 \pm 0,0062 \text{ AQDS min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$ und JG1712 von $0,327 \pm 0,0019 \text{ AQDS min}^{-1} 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$ auf.

⁹ *E. coli* DH5 α ZI $\Delta(\text{napC-F}) \Delta(\text{frdA-D})::\text{Ptet}_{cymA}$ KII::P_{lac} _gspHIJK KIII::P_{lac} _gspGLMN *attP21*::P_{lac}_gspDEF

¹⁰ *E. coli* DH5 α ZI $\Delta(\text{napC-F}) \Delta(\text{frdA-D})::\text{Ptet}_{cymA}$ pEC86_ *gent^R*_ *mtrAB* pMAL_ *cctA* _*mtrC_{snap}*_ *pilD*

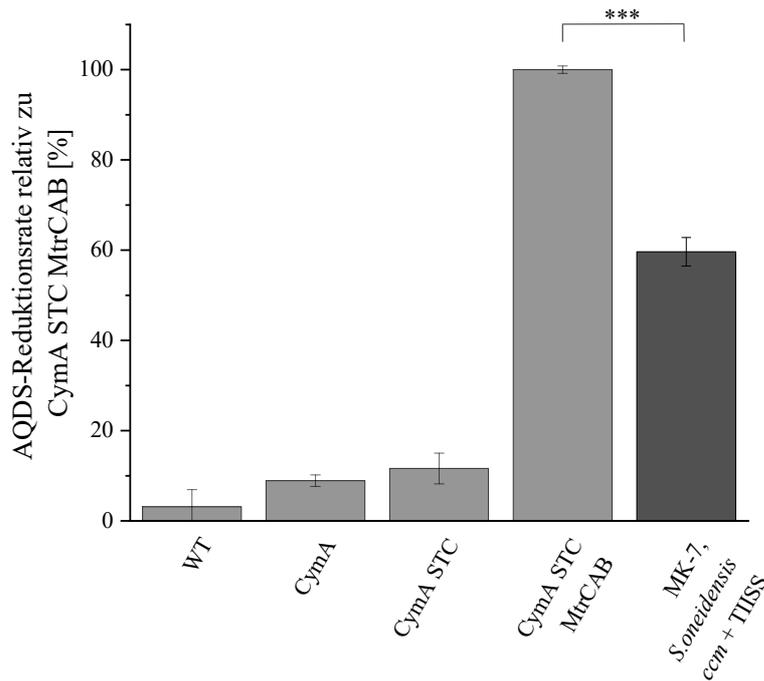


Abb. 19: Relative AQDS-Rate eines *E. coli* MK-7, *ccmS.oneidensis*, **THISS*S.oneidensis*-Stamms:** In Hellgrau ist die Veränderung der AQDS-Reduktionsrate der initialen Ausbaustufen des *E. coli*-Stamms in Prozent dargestellt, in Dunkelgrau im Vergleich die veränderte, prozentual maximale AQDS-Reduktionsrate relativ zum *E. coli* CymA STC MtrCAB-Stamm, also dem Stamm, dessen Ausbaustufe bis auf das zu untersuchende Modul mit der des getesteten Stamms korreliert, und als Kontrolle diente. Der Unterschied des Stamms mit Kombination aller Module zum Kontrollstamm ist dabei signifikant (unpaired t-test, $p < 0,001$).

1.6. Erstellung, Expression und Selektion einer Fosmid-Bibliothek

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *gain-of-function* Ansatz entwickelt, mit dessen Hilfe untersucht werden sollte, ob noch weitere, bislang unbekannte Faktoren aus *S. oneidensis* zu einer Verbesserung des EETs beitragen. Bisherige Untersuchungen der Grundlagen des EETs in nativen exoelektrogenen Mikroorganismen basieren auf *loss-of-function* Screens. Dabei werden *knockout*-Bibliotheken bzw. Mutanten erstellt und untersucht, ob sich die entsprechende Deletion negativ auf den EET auswirkt. Sollten dabei Deletionen eines wichtigen, direkten oder indirekten Faktors des EETs letal sein, würden diese in den entsprechenden Screens nicht entdeckt. Gleiches gilt beispielsweise für Proteine, deren Funktion durch andere endogene Proteine bei gleichbleibender phänotypischer Leistungsfähigkeit übernommen werden kann.

Um unabhängig von letalen Eingriffen und redundanten Proteinfunktionen weitere wichtige Faktoren zu finden und zu charakterisieren, wurde der in Abschnitt (III.5) generierte und beschriebene *E. coli*-Stamm als Ausgangsplattform verwendet. Dieser exprimiert das bis *dato* beschriebene minimale Proteinsset, welches einen EET ermöglicht bzw. für einen erfolgreichen EET unabdingbar ist. Außerdem wurden weitere Module, welche höchstwahrscheinlich eng mit einem funktionalen EET assoziiert sind, integriert. Ausgehend von diesem Stamm sollte nun randomisiert analysiert werden, welche weiteren Gene aus *S. oneidensis* einen möglichen Vorteil bezogen auf eine Kultivierung unter extrazellulär respirierenden Bedingungen erbringen. Dazu wurde wie in Abschnitt II.4.10 beschrieben eine Fosmid-Bibliothek aus dem Genom von *S. oneidensis* MR-1 erstellt. Die gDNA des Stamms wurde für eine möglichst optimal randomisierte Fragmentierung mechanisch geschert. Die erhaltenen 40 kb großen Fragmente wurden in ein Fosmid-Rückgrat (Chl^R) ligiert und mittels Lambda-Phagen in JG1711 eingebracht. Der Transduktionserfolg wurde durch Selektion auf Chloramphenicol-haltigen Kulturplatten verifiziert. Die Anzahl der benötigten Klone für eine 99 %-ige Abdeckung des *S. oneidensis* Genoms beträgt 569 (Abschnitt II.4.11). Im Rahmen der Erstellung der Fosmid-Bibliothek konnten ca. 40.000 Chloramphenicol-resistente Klone generiert werden. Über blau-/weiß- Selektion konnte festgestellt werden, dass davon ca. 60 % ein Insert trugen. Dies entspricht einer Fosmid-Bibliotheksgröße von 24.000 Klonen, was wiederum einer ~42-fachen Abdeckung des *S. oneidensis*-Genoms entspricht.

Zur Selektion auf einen physiologischen Vorteil wurden alle erhaltenen Klone abgeschwemmt und mit der erhaltenen Suspension zwei BES (Abschnitt II.6.4) inokuliert. Einem der beiden BES wurden 273 μ M MB als Elektronen-*shuttle* zugegeben, das zweite BES operierte ohne Zugabe eines exogenen Elektronen-*shuttles*. Die Arbeitselektroden beider BES wurden insgesamt dreimal im Abstand von je sechs Tagen überführt. Die Anzahl der Überführungen wurde so gewählt, dass der Selektionsdruck möglichst wenig auf Adaptationsereignissen lag. Stattdessen war das Ziel, den Selektionsvorteil, den einige Fosmide bzw. Gene möglicherweise erbringen, so zu nutzen, dass die initiale Varianz der enthaltenen Kombinationen möglichst schnell reduziert wird. Dies würde eine gezieltere Analyse nach erfolgter Selektion ermöglichen.

Zum Ende des Selektionsversuchs wurde der Biofilm beider Arbeitselektroden gelöst und verdünnt ausplattiert. Die so erhaltenen Klone wurden wiederum abgeschwemmt und in LB mit 50 mM HEPES kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase wurde die Expression der

heterologen Proteine induziert und für weitere 12 h inkubiert. Die Kultur wurde als Inokulum für Zellsuspensionsversuche im BES verwendet. Dabei sollte die Leistungsfähigkeit des jeweiligen Fosmid-Konsortiums mit einem Kontrollstamm mit leerem Fosmid im BES verglichen werden. Die BES wurden mit einer OD_{600} von 6 inokuliert. Während des sechsstündigen Versuchs wurde ein Potential von 0 gegen Ag/AgCl angelegt und der pH-Wert kontinuierlich zwischen 6,9 und 7,2 titriert. Vom jeweiligen Inokulum wurde außerdem gDNA zusammen mit Fosmid-DNA isoliert und mittels Illuminia-Sequenzierung sequenziert.

Die mittleren Stromdichten sowie der Verlauf des Stroms über die Zeit sind in Abbildung 20 dargestellt. Zum Zeitpunkt t_0 und t_6 wurde je eine Probe entnommen und mittels HPLC der Stoffumsatz und etwaige Produkte quantifiziert. Die mittlere Stromdichte über sechs Stunden des Fosmid-Konsortiums, welches unter Anwesenheit von MB selektiert wurde, betrug $476,38 \pm 51,17 \text{ mA m}^{-2}$, während der korrespondierende Kontrollstamm eine mittlere Stromdichte von $300,92 \pm 40,92 \text{ mA m}^{-2}$ erreichte. In diesem Zeitraum setzte das Fosmid-Konsortium $11,24 \pm 0,364 \text{ mM}$ Glycerin und der Kontrollstamm $9,85 \pm 0,097 \text{ mM}$ Glycerin um. Das Fosmid-Konsortium, das ohne MB selektiert wurde, erreichte eine mittlere Stromdichte von $452,47 \pm 26,36 \text{ mA m}^{-2}$ und der korrespondierende Kontrollstamm eine mittlere Stromdichte von $301,9 \pm 6,96 \text{ mA m}^{-2}$. Der Glycerin-Umsatz lag in diesem Zeitraum bei $9,4 \pm 2,954 \text{ mM}$ (Fosmid-Konsortium) und $11,07 \pm 1,201 \text{ mM}$ Glycerin (Kontrollstamm).

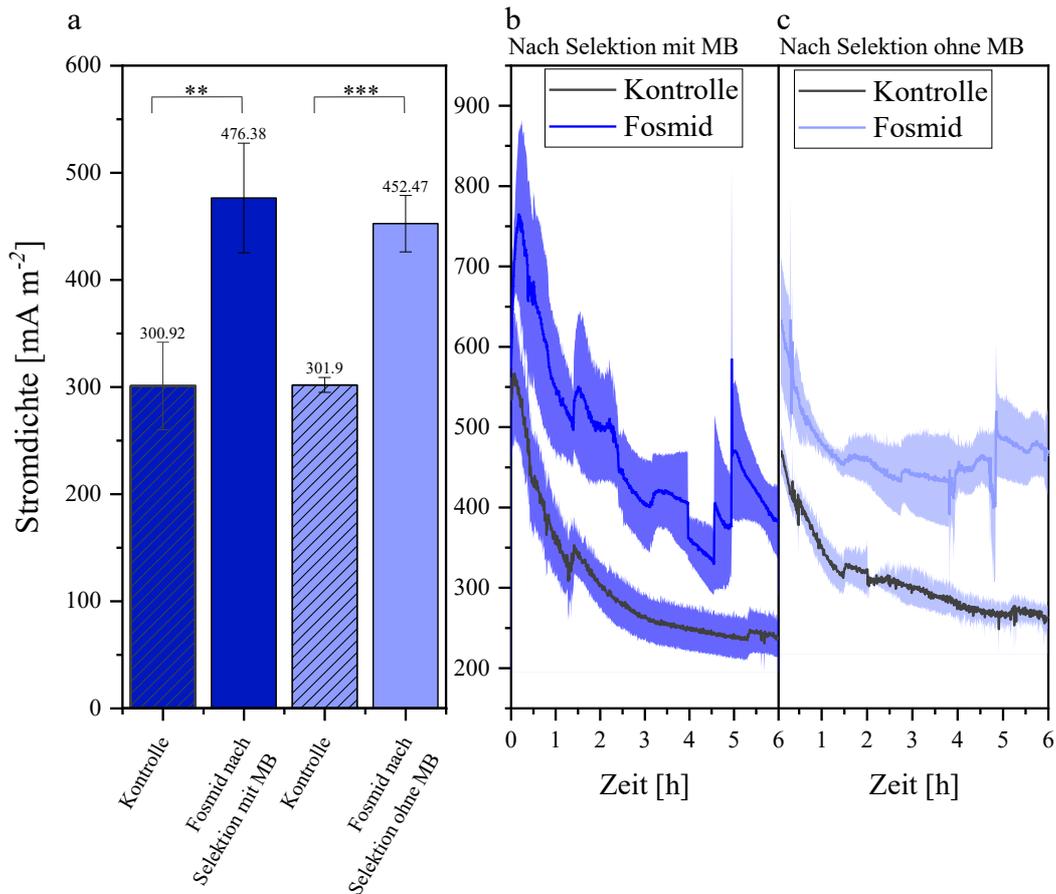


Abb. 20: Leistungsfähigkeit der selektierten Fosmid-Konsortien im BES: In **a** ist die über sechs Stunden erreichte mittlere Stromdichte der Stämme aufgezeigt. Dabei sind dunkel- bzw. hellblau schraffiert die Stromdichten der jeweiligen Kontrollstämmen aufgezeigt. In Dunkelblau ohne Schraffur ist die mittlere Stromdichte des Fosmid-Konsortiums das mit MB selektiert wurde (unpaired t-test, $p < 0,01$), und in Hellblau ohne Schraffur ist die des Fosmid-Konsortiums, das ohne MB selektiert wurde (unpaired t-test, $p < 0,01$), aufgezeigt. In **b** und **c** ist der Verlauf der Stromdichte der Konsortien nach Selektion mit (**b**) und ohne MB (**c**) über sechs Stunden dargestellt.

Ausgehend von den erreichten Stromdichten sowie dem quantifizierten Substratverbrauch wurde die Coulomb-Effizienz (CE) des Fermentationsprozesses anhand der in II.6.4 beschriebenen Formel berechnet. Da mittels HPLC keine Produkte detektiert werden konnten, kommen für den Umsatz von Glycerin zwei metabolische Szenarien infrage, welche als Grenzfälle des realen Stoffwechsels angesehen werden können. In Abbildung 21 ist die CE für die beiden entsprechenden Grenzfälle dargestellt. Dabei wurde für Fall **a** angenommen, dass das umgesetzte Glycerin vollständig zu CO_2 oxidiert wurde. Dabei würden pro Molekül Glycerin 12,6 Elektronen frei. Für Fall **b** wurde angenommen, Glycerin wurde vollständig zu Biomasse umgesetzt. Dies würde einen Elektronenüberschuss von 0,6 Elektronen je Molekül

Glycerin bedeuten. Diese Annahmen ergaben für das Fosmid-Konsortium mit MB CEs von $11,84 \pm 1,51$ % (CO₂) und $248,64 \pm 31,7$ % (Biomasse). Während die CEs des entsprechenden Kontrollstamms $9,39 \pm 1,18$ % (CO₂) und $197,22 \pm 24,7$ % (Biomasse) betragen. Die CEs des Fosmid-Konsortiums ohne MB ergaben $14,72 \pm 4,33$ % (CO₂) und $309,17 \pm 90,85$ % (Biomasse) und die des entsprechenden Kontrollstamms $8,39 \pm 1,1$ % (CO₂) und $176,16 \pm 23,12$ % (Biomasse). Die jeweils zu vergleichenden Werte ergaben keinen signifikanten Unterschied für die entsprechenden Coulomb-Effizienzen.

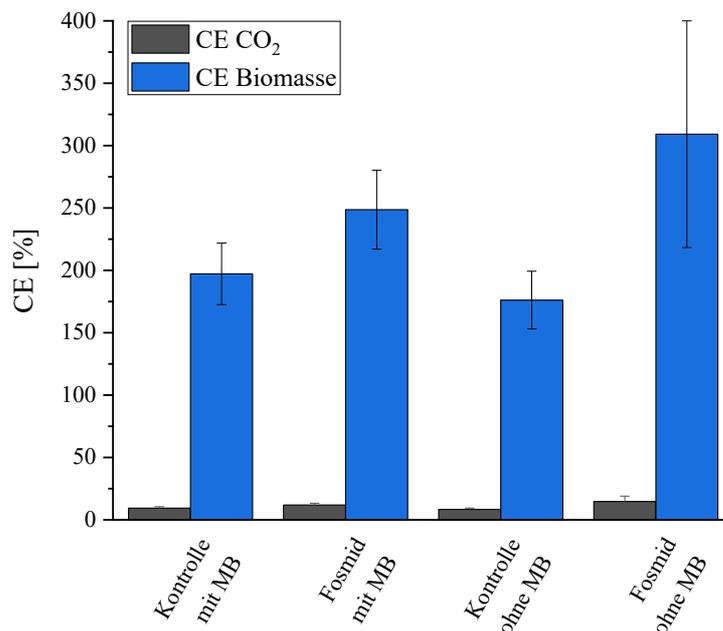


Abb. 21: Coulomb-Effizienz der Anoden-gestützten Fermentationen der Fosmid-Konsortien und der entsprechenden Kontrollen: In Blau dargestellt sind die CEs der Stämme/Konsortien unter Annahme, dass das gesamte Glycerin in Biomasse umgesetzt wurde. In Grau sind die CEs für die Annahme einer vollständigen Oxidation von Glycerin zu CO₂ aufgezeigt. Für die zu vergleichenden Stämme/Konsortien konnte für keine der Annahmen eine signifikant unterschiedliche Coulomb-Effizienz ermittelt werden.

Beide Kulturen, welche Fosmide mit Genom-Abschnitten aus *S. oneidensis* enthielten, erreichten nach der Selektion eine ca. 1,5-fach gesteigerte Stromdichte im Zellsuspensionsassay gegenüber der Stromdichte eines Kontrollstamms mit leerem Fosmid. Mittels Brückensynthese-Sequenzierung der enthaltenen Fosmide sowie der gDNA sollte festgestellt werden, ob und, wenn ja, welche Fosmide einen Selektionsvorteil vermittelten. Dazu wurde das Konsortium gewählt, welches ohne Anwesenheit von MB selektiert wurde. Um zu untersuchen, ob bei der ca. dreiwöchigen Selektion eine genomische Adaptation des *E. coli*-Stamms

stattgefunden hatte, welche zu einer verbesserten Leistungsfähigkeit im BES führen könnte, wurde neben der Fosmid-DNA auch die gDNA des Stamms sequenziert.

Die Sequenzierung des Kontrollstamms mit leerem Fosmid ergab 1.076.465.155 *total reads*, wovon 97,28 %, also 1.047.187.809 *reads*, mit einer durchschnittlichen Länge von 137,76 bp *gemapped* werden konnten. Aus der Sequenzierung des Konsortiums konnten von 8.136.360 *total reads* 97,25 %, also 7.912.934 *reads*, mit einer durchschnittlichen Länge von 137,58 bp *gemapped* werden. Um den Anteil von *S. oneidensis*-Genen auf den jeweiligen Fosmiden zu berechnen, wurden *reads*, welche auf Gene des *S. oneidensis*-Genoms *gemapped* werden konnten, quantitativ ausgewertet. Der Kontrollstamm mit leerem Fosmid wurde dazu zur Normalisierung verwendet. Insgesamt wurden nur Gene berücksichtigt, welche einen Anteil von > 0,005 % ausmachten.

Die Analyse ergab, dass sich während der Selektion nur zwei Fosmide durchsetzen konnten. Diese Fosmide enthielten *S. oneidensis* gDNA mit einer Länge von 35.195 bp (Fosmid 1; Region: 3.572.662 – 3.607.856) und 20.041 bp (Fosmid 2; Region: 3.987.655 – 4.007.695). Die jeweils kodierenden Bereiche auf den entsprechenden Fragmenten sind in Tabelle 24 aufgeführt. Die annotierten, putativen Funktionen stammen aus den UniProt und KEGG Datenbanken (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000). Innerhalb des Konsortiums trat Fosmid 1 1,7-fach häufiger auf als Fosmid 2 (unpaired t-test, $p < 0,0001$).

Tab. 24: Auf den Fosmiden kodierte Gene mit deren entsprechend annotierter Funktion.

Fosmid Nr.	Gen	Annotierte Funktion
1	<i>recX</i>	Regulatorisches Protein RecX
1	<i>recA</i>	Recombinase RecA
1	<i>mutS</i>	DNA <i>mismatch repair</i> Protein MutS
1	<i>rpoS</i>	RNA Polymerase Sigma Factor RpoS
1	<i>nlpD</i>	Lipoprotein NlpD
1	<i>pcm</i>	Protein-L-Isoaspartat O-Methyltransferase Pcm
1	<i>surE</i>	5'/3'-Nukleotidase SurE
1	<i>truD</i>	tRNA Pseudouridin 13 Synthase TruD
1	<i>ispF</i>	2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphatsynthase
1	<i>ispD</i>	2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat Cytidyltransferase
1	<i>ftsB</i>	Zellteilungsprotein FtsB

Fosmid Nr.	Gen	Annotierte Funktion
1	<i>eno</i>	Phosphopyruvat Hydratase
1	<i>pyrG</i>	CTP Synthase PyrG
1	<i>SO_3442</i>	Nukleosid Triphosphat Pyrophosphohydrolase
1	<i>SO_3443</i>	Transposase TnpA
1	<i>SO_3444</i>	Uncharakterisiertes Protein
1	<i>SO_3447</i>	Uncharakterisiertes Protein
1	<i>SO_3449</i>	WGR-Domänen Protein
1	<i>SO_4841</i>	Uncharakterisiertes Protein
1	<i>SO_3451</i>	Transposase TnpA
1	<i>SO_3454</i>	Putatives cytoplasmatisches Protein
1	<i>relA</i>	GTP Diphosphokinase
1	<i>rumA</i>	23S rRNA Methyltransferase RumA
1	<i>barA</i>	Zwei-Komponenten Sensorhistidinkinase BarA
1	<i>SO_3458</i>	Uncharakterisiertes Protein
1	<i>SO_3459</i>	Uncharakterisiertes Protein
1	<i>lldR</i>	Transkriptioneller Regulator L-Lactat <i>utilization</i> LldR
1	<i>SO_3461</i>	Transporter AEC Familie
2	<i>SO_3838</i>	Chemotaxis Signaltransduktionssystem
2	<i>SO_3840</i>	RNA Polymerase Sigma-70 Faktor ECF Familie
2	<i>SO_3841</i>	Anti-Sigma Faktor
2	<i>SO_3842</i>	Sekretiertes <i>low complexity</i> Protein
2	<i>rsuA</i>	16S rRNA Pseudouridine Synthase RsuA
2	<i>pepO</i>	Thermoregulierte äußere Membran Zink Endopeptidase
2	<i>relV</i>	(p)ppGpp Synthetase RelV
2	<i>SO_3847</i>	Zellwandassemblierung koodinierendes Protein
2	<i>SO_3848</i>	Uncharakterisiertes cytoplasmatisches Protein
2	<i>SO_3849</i>	Uncharakterisiertes membrangebundenes Protein
2	<i>SO_3852</i>	Uncharakterisiertes Protein
2	<i>SO_3854</i>	Transposase TnpA
2	<i>sfcA</i>	NAD-Abhängige Malat Dehydrogenase SfcA
2	<i>SO_3856</i>	Uncharakterisiertes Protein

Fosmid Nr.	Gen	Annotierte Funktion
2	<i>SO_3857</i>	Phosphoesterase PA-Phosphatase <i>related</i> Protein
2	<i>SO_3858</i>	Transposase TnpA
2	<i>SO_3859</i>	Diguanylat Zykklase
2	<i>SO_3860</i>	Periplasmatisches Substratbindeprotein

Bei der Analyse der Sequenzierung der gDNA des Konsortiums welches ohne Anwesenheit von MB selektiert wurde traten insgesamt 19 Mutationen mit mindestens einem AS-Austausch bzw. einer AS-Deletion in 18 verschiedenen Genen auf, welche im entsprechenden Kontrollstamm nicht auftraten. Die entsprechenden Gene sind mit der zugehörigen Mutation und der putativen Funktion des Genprodukts in Tabelle 25 aufgeführt. Die angegebenen Funktionen stammen aus den UniProt und KEGG Datenbanken (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000). 18 Mutationen traten dabei mit einer Häufigkeit von 100 % und eine Mutation mit einer Häufigkeit von 98,3 % auf.

Tab. 25: Genomisch auftretende Mutationen des adaptierten Konsortiums mit Häufigkeit und Funktion.

Mutation	Häufigkeit	Gen	Größe	Annotierte Funktion
Glu208→Lys	100 %	<i>endA</i>	236 AS	Endonuklease-1
Val326→Ala	100 %	<i>galP</i>	465 AS	Galaktose-Proton Symporter
Val354→Ile	100 %	<i>scpC</i>	493 AS	Propionyl-CoA:Succinat CoA Transferase
Ala356→Val	100 %	<i>scpA</i>	715 AS	Methylmalonyl-CoA Mutase
Ala156→Val	100 %	<i>ygfS</i>	163 AS	Putatives Elektronen Transport Protein YgfS
Pro79→Leu	100 %	<i>ppnN</i>	454 AS	Pyrimidine/Purine Nucleotid 5'-Monophosphat Nukleosidase
Gly63→Asp	100 %	<i>ydiU</i>	479 AS	Protein Adenylyltransferase SelO
Asn271→Tyr	100 %	<i>oppA</i>	544 AS	periplasmatisches Oligopeptid-Bindeprotein
Gln922→*	100 %	<i>narG</i>	1248 AS	Nitritreduktase NarG
Thr336→Ile	100 %	<i>ybaL</i>	559 AS	Putativer Kation-/Proton-Antiporter

Mutation	Häufigkeit	Gen	Größe	Annotierte Funktion
Pro5→Phe	100 %	<i>hha</i>	73 AS	Hemolysin Expressions-modulierendes Protein
Pro72→fs	98,3 %	<i>rbsR</i>	331 AS	Ribose-Operon Repressor
Gly235→Asp	100 %	<i>rbsK</i>	310 AS	Ribokinase
Ala206→Thr	100 %	<i>rbsK</i>	310 AS	Ribokinase
Gly37→Glu	100 %	<i>asnC</i>	153 AS	Regulator-Protein AsnC
Ser256→fs	100 %	<i>atpG</i>	288 AS	ATP-Synthase Gamma-Untereinheit
Ala185→Thr	100 %	<i>glmU</i>	457 AS	Bifunktionales Protein GlmU
Glu231→Lys	100 %	<i>bglF</i>	626 AS	PTS System Beta-Glukosid-spezifische EIIBCA Komponente
Trp537→*	100 %	<i>bglH</i>	539 AS	Kryptisches äußeres Membran Porin

fs = frameshift; * = Stop-Codon

2. Evaluierung des Einflusses der Elektronentransferraten im Bezug auf die Limitierung eines *E. coli*-Produktionsstamms in Anoden-gestützten Fermentationen

Nachdem der Fokus im ersten Teil der präsentierten Ergebnisse auf Untersuchungen zur Ratensteigerung des EETs und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen lag, sollte in einem zweiten Teil evaluiert werden, inwiefern Elektronentransferraten die ratenlimitierenden Größen in Elektroden-gestützten Fermentationen sind, und, ob diese folglich die Raum-Zeit-Ausbeute im BES determinieren.

Die durchgeführten Experimente basieren auf einem obligat respiratorischen Fermentations- bzw. Produktionsstamm, der Gene der EET-Kette aus *S. oneidensis* und Gene zur Acetoin-Synthese aus *B. subtilis* heterolog exprimiert, und außerdem durch selektive Anpassung weiterentwickelt wurde (Förster *et al.*, 2017; Beblawy *et al.*, 2020). Dieser Stamm fungiert im BES als Ganzzellkatalysator und überträgt respiratorische Elektronen *via* MB auf die Arbeitselektrode. Da MB membranpermeabel ist, liegt der Fokus in Bezug auf den EET in diesem Stamm auf optimalen Elektronentransferraten bis in den periplasmatischen Raum, wo das Redox-*shuttle* MB reduziert werden kann. Hierbei sind maßgeblich die beiden Proteine CymA und STC beteiligt. Überexpressionsstudien in *S. oneidensis* konnten zeigen, dass sowohl durch Überexpression von CymA als auch von STC gesteigerte Elektronentransferraten bzw.

Stromdichten erreicht werden konnten (Vellingiri *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2019). Um zu untersuchen, ob die Überexpression von *CymA* und *STC* auch in *E. coli* zu verbesserten Elektronentransferraten und infolgedessen gegebenenfalls zu einer verbesserten Leistungsfähigkeit im BES führt, wurde die Kopienzahl von *cymA* und *cctA* erhöht.

Dies wurde erreicht, indem die beiden Gene *cymA* und *cctA* *downstream* der *alsSD*-Gene in das pMAL-Plasmid von Förster *et al.* (2017) kloniert wurden. Die Gene *cymA* und *cctA* wurden dazu für die Expression in *E. coli* codon-optimiert über eine isothermale *in-vitro* Ligation in das pMAL-Plasmid integriert. Das resultierende Plasmid wurde sequenziert und zusammen mit pEC86 in JG1352¹¹ transformiert, woraus der Stamm JG1397 (JG1352 pMAL_alsSD_cymA_cctA; pEC86) resultierte. Als Kontrollstamm diente der bisherige Produktionsstamm JG1295 (JG1352 pEC86, pMAL_alsSD).

Die beiden Stämme JG1295 und JG1397 wurden zunächst hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur MB-Reduktion untersucht. Dazu wurden die Zellen wie in Abschnitt II.3.1 beschrieben in M9-Medium mit DMSO und Glycerin kultiviert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 für 12 h induziert. Die Durchführung des Reduktionsassays ist Abschnitt II.6.3 zu entnehmen. Der Verlauf der MB-Reduktion sowie die maximalen Reduktionsraten sind in Abbildung 22 a und 22 b aufgezeigt. Die Überexpression der Gene *cymA* und *cctA*, die für eine synthetische Elektronentransportkette in den periplasmatischen Raum kodieren, erhöhte die Reduktionsrate von MB von $1,59 \pm 0,013 \mu\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ (JG1295) um das 2,45-fache auf $3,9 \pm 0,178 \mu\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ (JG1397). Dabei ist der Verlauf der Absorptionsabnahme von JG1295 weniger steil als der Verlauf von JG1397. Beide Stämme reduzierten innerhalb von 180 s die eingesetzten 273 μM MB vollständig.

¹¹ *E. coli* DH5 α ZI $\Delta(\text{napC-F}) \Delta(\text{frdA-D})::\text{P}_{\text{tet}}\text{-cymA_mtrA_mtrB, } \Delta\text{galK, } \Delta\text{adhE, attP21}::\text{P}_{\text{ara}}\text{-cctA, pfl}^{-}, \text{aceF}^*, \text{rpoC}^{-} \Delta\text{ldhA}::\text{cscRAKB, } \Delta\text{pta_ackA}::\text{galK}$

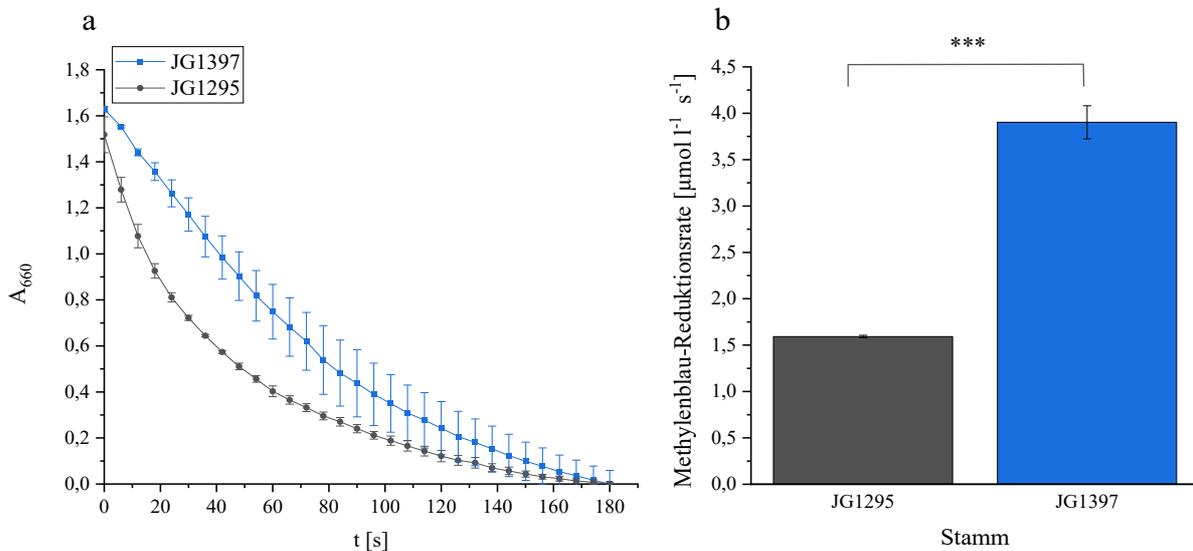


Abb. 22: Ergebnisse des Methylenblau-Reduktionsassays mit 273 μM Methylenblau: In **a** ist die Abnahme der Absorption bei $\lambda = 660$ nm der beiden Stämme JG1295 (grau) und JG1397 (blau) über die Zeit in einer Zellsuspension mit $\text{OD}_{600} = 6$ aufgezeigt. In **b** sind die maximalen Methylenblau-Reduktionsraten in $\mu\text{mol MB l}^{-1} \text{s}^{-1}$ dargestellt. Die maximale Reduktionsrate von JG1295 ist in Grau, die maximale Reduktionsrate von JG1397 in Blau aufgetragen. Der Unterschied des Stamms mit erhöhter Abundanz von CymA und STC zum Kontrollstamm ist dabei signifikant (unpaired t-test, $p < 0,001$).

Nachdem eine gesteigerte Methylenblau-Reduktionsrate festgestellt werden konnte, sollte untersucht werden, inwiefern sich die Reduktionsrate des Stamms auf die Produktivität im BES auswirkt. Dazu wurde die Anoden-gestützte Fermentation wie in Abschnitt II.6.4 beschrieben im Zellsuspensionsassay ($\text{OD}_{600} = 6$) im Triplikат durchgeführt und die in Abbildung 23 dargestellte Stromdichte über 8 h gemessen. Der pH-Wert wurde kontinuierlich und automatisch zwischen 6,9 und 7,2 gehalten.

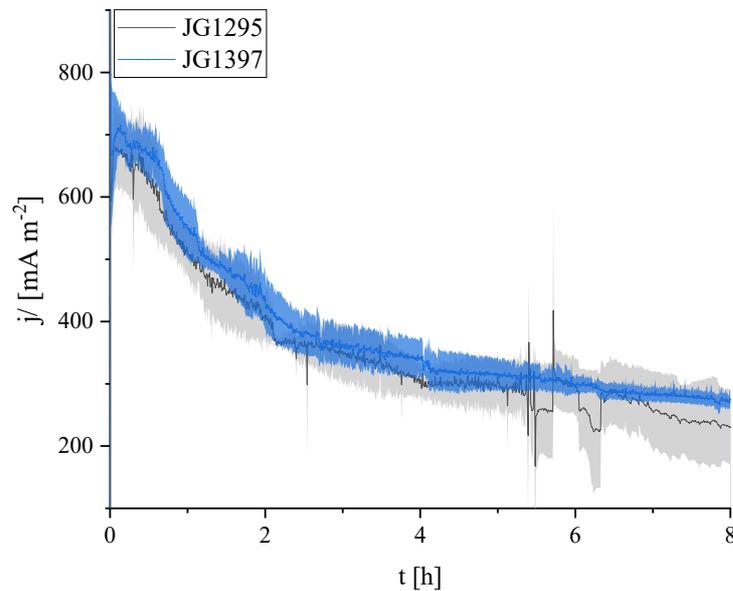


Abb. 23: Chronoamperometrische Messung von JG1295 und JG1397: Anoden-gestützte Fermentation in MOPS-gepuffertem Medium mit 10 mM Glukose und 0,1 % Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle. Dargestellt ist die Stromdichte über 8 h für den Kontrollstamm JG1295 und den Stamm JG1397.

Zum Zeitpunkt t_0 und t_8 wurden jeweils Proben zur Quantifizierung von Glukose und Acetoin mittels HPLC und Voges-Proskauer-Nachweis (II.7.2 und II.7.1) entnommen. Anhand der Quantifizierung von Glukose und Acetoin sowie der gemessenen Stromdichte wurde die durchschnittliche Stromdichte über 8 h des Experiments (j), die coulombsche Effizienz (CE), der Ertrag (Y) und die Produktivität (Q) berechnet und in Abbildung 24 a-d dargestellt. Die jeweiligen Parameter wurden wie in Abschnitt II.6.4 beschrieben berechnet. Trotz einer 2,45-fachen Steigerung der MB-Reduktionsrate konnte verglichen mit dem Kontrollstamm JG1295 weder eine signifikante Steigerung der Stromdichte, der coulombschen Effizienz, des Ertrags noch der Produktivität festgestellt werden.

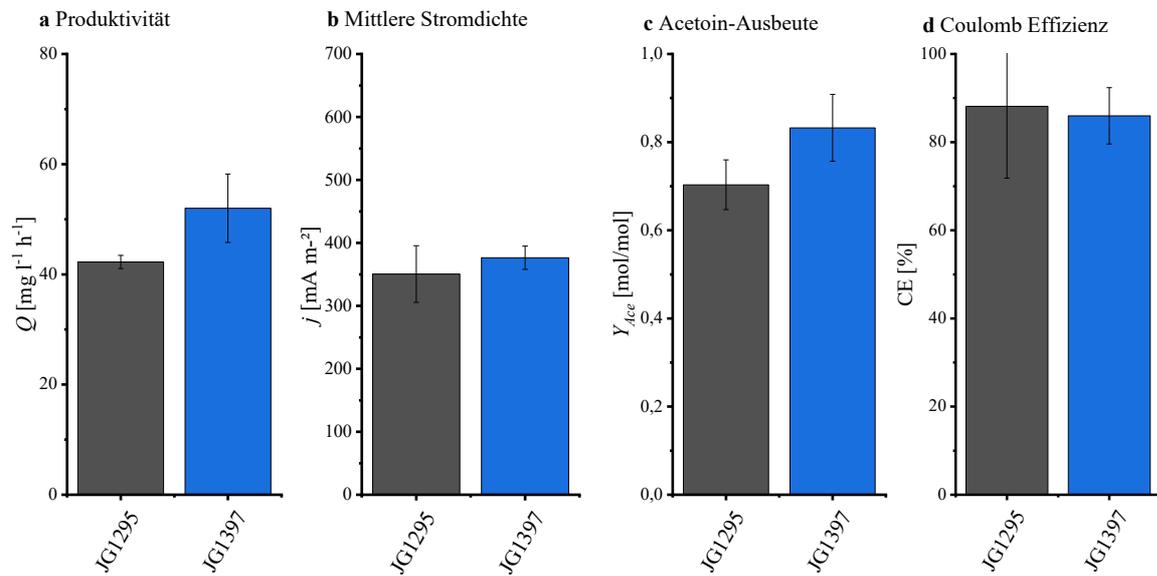


Abb. 24: Auswertung der Anoden-gestützten Fermentation von JG1295 und JG1397. In **a** ist die Produktivität (Q), in **b** die mittlere Stromdichte (j), in **c** die Acetoin-Ausbeute (Y_{Acc}) und in **d** die Coulomb-Effizienz (CE) aufgezeigt. Der Unterschied aller Parameter ist zwischen den beiden Stämmen JG1295 und JG1397 nicht signifikant. Abbildung aus Beblawy *et al.*, 2020.

IV. Diskussion

Die motivationsgebende Problemstellung des ersten Teils der Arbeit ergibt sich aus der hohen Diskrepanz der erreichbaren Elektronentransferraten zwischen dem nativen exoelektrogenen Organismus *S. oneidensis* und einem *E. coli*-Stamm mit transplantierte heterologer EET-Kette. Aus diesem Grund war das Ziel dieses Teils eine Aufklärung neuer, am EET beteiligter Faktoren, um einen funktionalen EET auch in nicht-nativen exoelektrogenen Mikroorganismen zu gewährleisten. Darüberhinaus wurde sowohl ein detailliertes Verständnis der Grundlagen des EETs generiert, als auch eine Möglichkeit aufgezeigt, mit diesem Wissen Produktionsstämme zur Nutzung in Elektroden-gestützten Fermentationen hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute zu optimieren. Dies sollte zum einen durch eine gezielte Adressierung EET assoziierter Faktoren ermöglicht werden. Zum anderen sollten durch die Entwicklung eines *gain-of-function* Screenings weitere, bislang nicht im Zusammenhang mit dem EET stehende Faktoren identifiziert werden können, die im blinden Fleck korrespondierender *loss-of-function* Screenings liegen.

1. Analyse des Einflusses heterolog exprimierter Proteine des EETs

Zunächst wurden *E. coli*-Stämme unterschiedlicher Ausbaustufen durch schrittweise Integration von Teilen des theoretischen minimalen Proteinsetups generiert und die jeweiligen Reduktionsraten systematisch analysiert. Um die Motivation der Arbeit zu verdeutlichen wurden korrespondierende Reduktionsraten von *S. oneidensis*-Stämmen ermittelt. Daraus ergab sich (siehe III.1.1), dass die Reduktionsraten der entsprechenden *S. oneidensis*-Stämme um Faktor ~410 (Δ OMC MtrAB^s), ~315 (Δ OMC) und ~300 (CymA, STC und MtrCAB) höher lagen als die, der jeweiligen *E. coli*-Stämme obwohl jeweils alle heterolog exprimierten Proteine nachgewiesen werden konnten. Bei AQDS handelt es sich um ein Huminsäure-Analog, das häufig als Elektronen-*shuttle* in Untersuchungen zum EET eingesetzt wird (Shyu *et al.*, 2002). Inwiefern AQDS die Membran passieren kann, ist nicht abschließend geklärt. In der Publikation von Shyu *et al.* (2002) wurde zwar gezeigt, dass sowohl *E. coli*- als auch *S. oneidensis*-Stämme mit Deletionen in einer wichtigen Efflux-Pumpe sensitiv gegenüber der Toxizität von AQDS waren, allerdings wurde dieser Effekt lediglich für höhere Mengen ab 10 mM AQDS, nicht jedoch für Mengen von 0 – 1 mM AQDS beobachtet. Außerdem konnte in

einer aktuellen Publikation von Xiao *et al.* (2020) gezeigt werden, dass eine *S. oneidensis* Δ cymA-Deletionsmutante AQDS nicht als Elektronen-*shuttle* nutzen kann, während Riboflavin und Anthraquinon-2-Sulfonat (AQS) in den Intrazellularraum diffundieren und dort von der *S. oneidensis* Δ cymA-Deletionsmutante reduziert werden können. AQDS hat aufgrund der beiden Sulfonsäuregruppen eine relativ hohe Polarität, was die Diffusion durch hydrophobe Membranen mutmaßlich stark einschränkt. Auch in einer früheren Publikation von Gescher *et al.* (2008) wird eine beeinträchtigte Permeabilität und/oder eingeschränkte Diffusion durch den periplasmatischen Raum in Bezug auf AQDS postuliert. Diese Studien berücksichtigend ist der Effekt intrazellulärer AQDS-Reduktion vermutlich zum Großteil vernachlässigbar (Gescher *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2020). Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass *E. coli per se* nicht zur AQDS-Reduktion befähigt ist, was sich mit anderen Studien zur AQDS-Reduktion in *E. coli* deckt (Shyu *et al.*, 2002; Gescher *et al.*, 2008). Auch die alleinige heterologe Expression von CymA oder CymA und STC führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der AQDS-Reduktionsrate. Dies konnte im Falle einer heterologen CymA Expression auch in der von Gescher *et al.*, (2008) publizierten Studie gezeigt werden und verdeutlicht nochmals die Diffusionslimitierung von AQDS durch die Membran. Nachdem das MtrAB^s Modul, welches die äußere Membran durchspannt, integriert wurde, konnte eine ca. 5,4-fach gesteigerte AQDS-Reduktionsrate verglichen mit dem Vorgängerstamm *E. coli* CymA STC erzielt werden. Da nach heutigem Wissensstand der Großteil der AQDS-Reduktion außerhalb der Zelle stattfindet, war zu erwarten, dass eine signifikante Steigerung der AQDS-Rate erst nach Integration des äußeren Membran-Moduls stattfindet. Überraschend war jedoch, dass ein *E. coli*-Stamm mit dem MtrAB-Modul Reduktionsraten ohne signifikanten Unterschied zum MtrAB^s-Modul zeigte. Der *E. coli* CymA, STC, MtrAB-Stamm entspricht im relevanten Proteinsetup dem *S. oneidensis* Δ OMC-Stamm. Dieser erreichte jedoch verglichen mit dem *S. oneidensis* Δ OMC MtrAB^s-Stamm lediglich eine Reduktionsrate von 52 % zu 81 % (bzw. 32 % zu 81 % Bücking *et al.*, 2012). Bücking *et al.* (2012) konnten in ihrer Publikation zeigen, dass die Unterschiede in der Reduktion der Stämme *S. oneidensis* Δ OMC, *S. oneidensis* Δ OMC MtrAB^s und *S. oneidensis* WT nicht auf eine veränderte Membranpermeabilität zurückzuführen sind. Da sowohl MtrB als auch MtrB^s in *E. coli* ein Faltungsdefizit aufweisen und der korrekte Einbau von β -barrel Proteinen die Integrität der äußeren Membran maßgeblich beeinflusst, ist durchaus vorstellbar, dass der Einbau von MtrB^(s) Auswirkungen auf die Membranpermeabilität hat, und so AQDS im *E. coli*

CymA, STC, MtrAB-Stamm im Gegensatz zum *S. oneidensis* Δ OMC-Stamm in höherem Maße intrazellulär reduziert wird (Stephan, 2015; Storek *et al.*, 2018; Marin, 2020). Eine Co-Expression von MtrC in *E. coli* MtrAB steigert die maximale Reduktionsrate nochmals um das 1,8-Fache. Da MtrC in *E. coli* nicht in den Extrazellularraum sekretiert und MtrC somit nicht auf der Außenseite der äußeren Membran lokalisiert ist (Richter, 2014), ist unwahrscheinlich, dass die gesteigerte Reduktionsrate auf einer funktionalen EET-Kette basiert. Wahrscheinlicher ist, dass eine quantitative Steigerung des *c*-Typ Cytochromgehalts, die mit einer Co-Expression von MtrC einhergeht, für den Effekt verantwortlich ist. Dass eine Steigerung des *c*-Typ Cytochromgehalts mit gesteigerten EET-Raten korrelieren kann, konnte sowohl für *S. oneidensis* als auch für *E. coli* unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der einzelnen *c*-Typ Cytochrome zueinander gezeigt werden (Vellingiri *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2020 a). Ungeachtet der Veränderung der maximalen Reduktionsrate einzelner *E. coli*-Ausbaustufen wird beim direkten Vergleich mit Reduktionsraten von *S. oneidensis* ersichtlich, dass die maximale Reduktionsrate hier zwischen 300- und 410-fach höher ist. Dies lässt die Frage zu, ob es sich bei den gemessenen Reduktionsraten in *E. coli* überhaupt um einen funktionalen EET handeln kann, oder, ob lediglich die Hintergrundreduktion von AQDS durch freigesetzte Cytochrome lysierter Zellen gemessen wird.

2. Analyse des Einflusses von MK-7 in *E. coli*

Um den limitierenden Schritt der AQDS-Reduktion von *E. coli* CymA STC MtrAB^(s) zu identifizieren, wurden aus *S. oneidensis* bekannte, mit einem erfolgreichen EET assoziierte Faktoren adressiert. Zunächst wurde dazu der initiale Schritt des EETs, der Elektronenübertrag aus dem Menachinonpool auf CymA, untersucht. Spezifisch sollte hierbei untersucht werden, ob sich der Elektronentransfer auf CymA in Abhängigkeit der Isoprenoideinheiten von Menachinon verändert. Da *S. oneidensis* nahezu ausschließlich MK-7, *E. coli* allerdings MK-8 synthetisiert, wurde ein *E. coli*-Stamm zur MK-7-Synthese befähigt (Campbell und Bentley, 1969; Collins und Jones, 1981; McMillan *et al.*, 2012). *Bacillus subtilis natto* wurde schon früh als nativer Produktionsstamm zur Synthese von MK-7 genutzt und ist neben anderen nativen MK-7 Produzenten der bekannteste industriell genutzte Stamm (Sato *et al.*, 2001, Mahdunia *et al.*, 2016). Durch heterologe Expression der Gene zur MK-7-Synthese, namentlich *hepS*, *hepT* und einem Gen, welches eine putative Heptaprenyltransferase kodiert, konnte von

Thomas Schlösser in einem Patent der Wacker AG gezeigt werden, dass MK-7 zur industriellen Nutzung erfolgreich in *E. coli* synthetisiert werden kann (Schlösser, 2011). Gao *et al.* (2020) konnten zeigen, dass auch die heterologe Expression von *hepS* und *hepT* ausreichend für die MK-7 Synthese ist. Da die erreichten MK-7 Mengen jedoch unter Expression aller drei Gene höher war, wurden im Rahmen der Arbeit die drei von Schlösser beschriebenen Gene zur MK-7 Synthese aus *B. subtilis* erfolgreich in einen Vektor integriert. Die Analyse der Chinonzusammensetzung (Abschnitt II.1.2) zeigte, dass der Stamm mit den entsprechend exprimierten MK-7-Genen (JG1673) zum einen, einen um ca. 62 % erhöhten Menachinon-Anteil relativ zum Kontrollstamm (JG1359) aufwies, und zum anderen sowohl MK-7 (70 %), MK-6 (8,9 %) und MK-8 (1,5 %) synthetisiert wurden. Im Vergleich dazu konnte im Kontrollstamm MK-8 (29,7 %) als einzige Menachinonspezies detektiert werden. UK-8 war mit 57,9 % das Hauptchinon in JG1359, während in JG1673 keinerlei Ubichinonspezies nachgewiesen werden konnten. JG1359 synthetisierte außerdem 12,4 % DMK-8 und JG1673 zum Vergleich 19,7 % DMK-7. Dass der Kontrollstamm JG1359 keine detektierbaren Mengen MK-, UK-, oder DMK-7 synthetisiert, deckt sich mit Daten aus anderen Publikationen (Polglase *et al.* 1966; Wallace und Young, 1977; Søballe und Poole, 1999; Schlösser, 2011; Bekker *et al.* 2007; Gao *et al.*, 2020). Die synthetisierten DMK-Mengen liegen außerdem in derselben Größenordnung verglichen mit den publizierten Werten von Unden und Bongaerts (1997) für *E. coli* unter DMSO-atmenden Bedingungen. Auch die Werte für MK in JG1673 korrelieren mit den Daten aus der Publikation von Unden und Bongaerts. Überraschend war allerdings, dass JG1359 anstelle von 10 % UK (Unden und Bongaerts, 1997) einen Anteil von 57,9 % UK aufwies. Allerdings wurde der von Unden und Bongaerts publizierte Chinongehalt bei Wachstum mit Glukose als Elektronendonator und DMSO als Elektronenakzeptor ermittelt. In dieser Arbeit wurde Glycerin als Elektronendonator gewählt, um Wachstum unter Gärungsbedingungen auszuschließen. Publizierte Daten für Wachstum mit Nitrat als Elektronenakzeptor und unterschiedlichen Kohlenstoff- bzw- Elektronendonoren zeigen, dass sich die Chinonzusammensetzung unabhängig vom Elektronenakzeptor auch in Abhängigkeit des Elektronendonors unterscheiden kann (Unden, 1988). Dies könnte die Diskrepanz in den hier untersuchten Chinonzusammensetzungen erklären. Da die Gene zur MK-7-Synthese im Vergleich zu nativ exprimierten Genen zur MK-8-Synthese stark überexprimiert wurden, war das Verhältnis in JG1673 möglicherweise zugunsten der MK-(7)-Synthese verschoben (de Boer *et al.*, 1983; Lin-Chao und Bremer, 1986).

Bevor das Reduktionsverhalten beider Stämme untersucht wurde, sollte sowohl ein negativer Effekt bezogen auf die *metabolic burden* des Stamms ausgeschlossen werden, als auch sichergestellt werden, dass *E. coli* MK-7 analog zu MK-8 funktional nutzen kann (Bentley *et al.*, 1989). Dazu wurden die Wachstumsraten beider Stämme unter oxischen und DMSO-atmenden Bedingungen ermittelt. Die oxischen Wachstumsversuche ergaben zwischen der spezifischen Wachstumsrate $\mu = 0,369 \pm 0,044$ für JG1673 und $\mu = 0,385 \pm 0,044$ für JG1359 keinen signifikanten Unterschied (unpaired t-test, $p < 0,05$). Trotz der hohen Effizienz des P_{tac} -Promotors und einer mittleren Kopienzahl des Plasmids kann davon ausgegangen werden, dass die *metabolic burden* durch die Expression der drei heterologen Gene als vernachlässigbar angesehen werden kann (de Boer *et al.*, 1983; Lin-Chao und Bremer, 1986). Die Wachstumsversuche unter DMSO-atmenden Bedingungen ergaben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Wachstumsrate μ , der Unterschied war jedoch deutlicher als der beobachtete Effekt unter oxischen Bedingungen. In *E. coli* ist MK obligat für den Elektronentransfer sauerstoffunabhängiger Atmungsprozesse (Haddock und Jones, 1977). Dabei ist MK besonders für die Reduktion von Fumarat und DMSO erforderlich (Wissenbach *et al.*, 1989). MK-8 defiziente *E. coli*-Stämme zeigten kein Wachstum mit Glycerin und DMSO als Elektronendonator/-akzeptor sofern MK nicht supplementiert wurde (Miguel und Meganthan, 1991). Da JG1673 mit vernachlässigbaren Mengen MK-8 (1,5 %) Wachstum mit Glycerin und DMSO als Elektronendonator/-akzeptor zeigte, kann postuliert werden, dass heterolog synthetisiertes MK-7 funktional ist und von *E. coli* zur Reduktion von DmsABC bzw. DMSO genutzt werden kann.

Bezogen auf die AQDS-Reduktionsrate beider Stämme konnte keine Steigerung der Rate durch die Synthese von MK-7 festgestellt werden. JG1673 erreichte eine nicht signifikante, um ca. 10 % verringerte Reduktionsrate als der entsprechende Kontrollstamm JG1359. Da JG1673 auch in den oxischen und anoxischen Wachstumsversuchen geringere Wachstumsraten zeigte, ist möglicherweise ein genereller Fitness-Nachteil für die verringerte Rate verantwortlich. Erwähnenswert ist außerdem, dass auf dem Plasmid in JG1673 *cctA* hinter den Genen zur MK-7 Synthese kodiert ist. Der vergrößerte Abstand von ca. 3000 bp zwischen Promotor und *cctA* könnte zu einer verringerten Transkriptstärke des Gens und damit einhergehend zu einem geringeren Anteil STC führen, was sich in der Reduktionsrate widerspiegeln könnte (Lim *et al.*, 2011). Um diese Hypothese zu untermauern, könnte in zukünftigen Versuchen die STC Menge der beiden Stämme quantifiziert werden. Zusammenfassend kann kein positiver Effekt von

MK-7 auf den EET festgestellt werden. Dies lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen ist möglich, dass MK-8 und MK-7 keinen Unterschied in der Leistungsfähigkeit bezogen auf die Reduktion von CymA zeigen. In einer Publikation von McMillan *et al.*, (2012) konnte MK-7 zwar als spezifischer Co-Faktor von CymA identifiziert werden, selbige Studie zeigte aber lediglich, dass eine Reduktion von CymA durch MK-7 möglich und durch UK-10 und MK-0 nicht möglich ist. Eine Interaktion von MK-8 und CymA wurde bislang nicht untersucht und aufgrund der geringeren strukturellen Unterschiede als derer zwischen MK-7 und den beiden unersuchten Spezies ist denkbar, dass eine Interaktion stattfinden kann (Abbildung 25). Zum anderen kann ein etwaiger positiver Effekt von MK-7 auf den EET durch eine Limitierung an anderer Stelle des EETs maskiert sein. Sollte beispielsweise aufgrund des Faltungsdefizits in MtrB^(s) der EET kaum oder nicht möglich sein, würde durch Verbesserung der CymA-Reduktion der geschwindigkeitslimitierende Schritt des EETs lediglich an andere Stelle verschoben werden (Stephan, 2015; Marin, 2020). Über spezifische Kinetiken des Elektronentransfers von MK-8 und MK-7 auf CymA durch beispielsweise Membranassays oder einer Synthese von MK-8 in *S. oneidensis* könnten hier exaktere Aussagen getroffen werden.

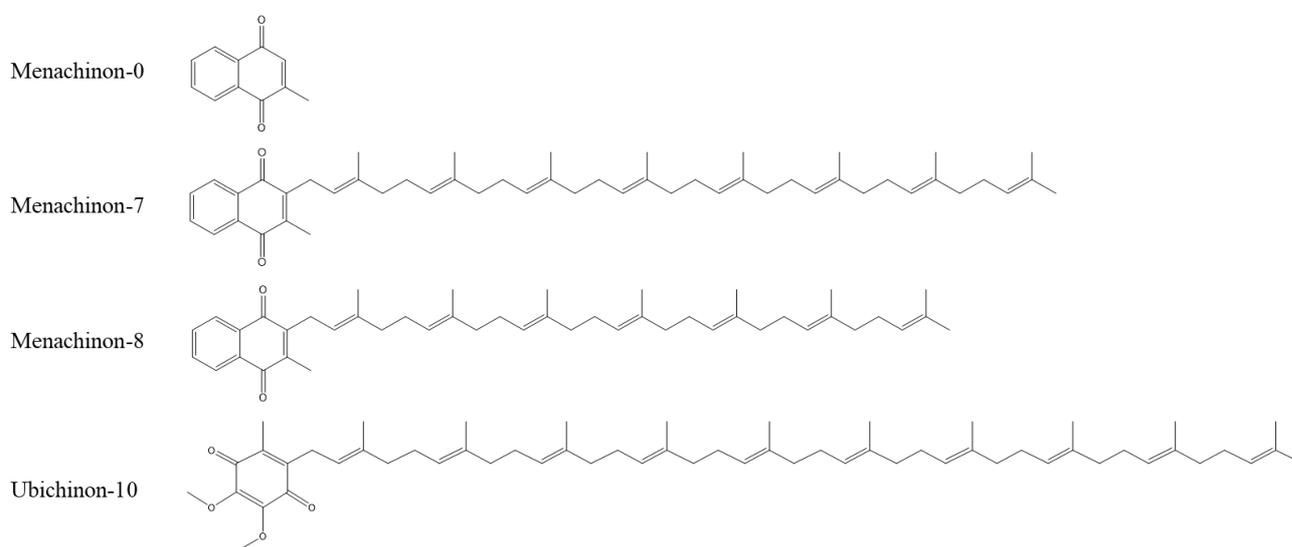


Abb. 25: Übersicht über die Struktur unterschiedlicher MK- und UK-Spezies: Die Struktur von MK-0 bis MK-8 unterscheidet sich lediglich in der Anzahl der Isoprenoideinheiten der Seitenkette. UK-10 unterscheidet sich zusätzlich in der Kopfgruppe.

3. Analyse des Einflusses des heterolog exprimierten *ccm*-Operons

Nachdem ein möglicher Einfluss von MK-7 auf die EET-Raten untersucht wurde, wurde im Anschluss die Cytochrom *c*-Maturationsmaschinerie aus *S. oneidensis* heterolog in *E. coli* exprimiert und mit der nativen Cytochrom *c*-Maturationsmaschinerie verglichen werden. Unterschiede im Aufbau der beiden Operon-Strukturen und auch der einzelnen Gene sind bekannt, bisher wurde jedoch in keiner Publikation das gesamte Operon bzw. alle beteiligten Gene transplantiert und heterolog exprimiert (Su *et al.*, 2020 a; Su *et al.*, 2020 b). Nach erfolgreicher Integration der Gene in das pEC86-Rückgrat wurde zunächst die Cytochromqualität und -quantität untersucht. In den beiden Stämmen JG1359 (*E. coli_{ccm}*) und JG1679 (*S. oneidensis_{ccm}*) war ein deutliches Signal im Bereich von 14-25 kDa in der periplasmatischen Fraktion detektierbar. Das theoretische Molekulargewicht von STC liegt bei 12,9 kDa, trotzdem kann von einer erfolgreichen Expression von STC ausgegangen werden, da dieses Laufverhalten für STC schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Sturm *et al.*, 2015; Philipp, 2017). Die beiden Membranfraktionen zeigen Banden auf Höhe von ~20 kDa und ~32 kDa, was mit dem theoretischen Molekulargewicht von CymA (20,3 kDa) und MtrA (32 kDa) korreliert. In beiden Stämmen konnten also erfolgreich alle drei heterolog exprimierten *c*-Typ Cytochrome unabhängig des *ccm*-Clusters exprimiert, maturiert und lokalisiert werden. Jedoch zeigt JG1359 ein deutlicheres Signal für MtrA während JG1679 ein deutlicheres Signal für CymA zeigt. Ein vergleichbares Ergebnis konnte in einer aktuellen Publikation von Su *et al.* (2020 a) gezeigt werden. Dort konnte die Abundanz von CymA durch Expression eines hybriden CcmH-Proteins mit Proteindomänen aus *E. coli* und *S. oneidensis* um 60 % gesteigert werden. Die Hämquantifizierung zeigte insgesamt einen signifikant verringerten Häm-Gehalt in der Membranfraktion und einen signifikant erhöhten Häm-Gehalt in der periplasmatischen Fraktion von JG1679 gegenüber JG1359. Der Gesamthämgehalt lag bei beiden Stämmen innerhalb desselben Bereichs. Dies korreliert mit publizierten Daten zur Veränderung der Stöchiometrie der einzelnen Cytochrome bei unterschiedlicher *ccm*-Expression und unterschiedlicher Induktorstärke (Goldbeck *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2020 a). Da gezeigt werden konnte, dass MtrA essenziell für einen korrekten Einbau von MtrB in *S. oneidensis* ist, wurde überprüft, ob durch eine etwaig veränderte MtrA-Expression durch Transplantation des *S. oneidensis ccm*-Clusters indirekt Einfluss auf die Güte der Maturation und die Quantität des β -barrel Proteins MtrB^(s) genommen werden kann (Bücking *et al.*, 2012).

Dazu konnte zunächst erstmals gezeigt werden, dass das MtrB-Faltungsdefizit, welches durch Stephan, 2015 und Marin, 2020 beschrieben wurde, in *E. coli* auch bei der Suppressorvariante MtrB^s auftritt, während in *S. oneidensis* korrespondierend zu wildtypischem MtrB kein Faltungsdefizit detektiert wird. Anschließend wurde die Güte der Maturation von MtrB^s in den Membranfraktionen beider Stämme untersucht. Sowohl im Kontrollstamm als auch im Stamm mit *S. oneidensis* *ccm*-Cluster konnte MtrB^s bei Inkubation der Probe bei 37 °C detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Wahl der *ccm*-Gene keinen indirekten Einfluss auf die Maturation von MtrB^s hat. Allerdings konnte ein indirekter Einfluss der *ccm*-Gene auf die Quantität von MtrB^s nachgewiesen werden. Durch heterologe Expression des *S. oneidensis* *ccm*-Clusters konnte die Abundanz von MtrB^s in der Membranfraktion um das ~6-Fache gesteigert werden. Bislang gab es keinen Hinweis auf einen Zusammenhang der Cytochrom *c*-Maturationsmaschinerie und der Expression von MtrB^(s). Su *et al.*, (2020 b) konnten zwar eine Veränderung in Stöchiometrie und Menge der synthetisierten *c*-Typ Cytochrome feststellen, ein Einfluss auf die Quantität von MtrB wurde allerdings nicht untersucht. Dies ist die erste Arbeit, in der Daten vorliegen, welche darauf hindeuten, dass das *ccm*-Cluster bzw. die Stöchiometrie der exprimierten *c*-Typ Cytochrome einen Einfluss auf die Expression und Maturation eines β -barrel Proteins haben könnte. Dabei ist jedoch wahrscheinlich, dass ein Einfluss eher indirekt gegeben ist, da gezeigt werden konnte, dass zumindest MtrA ein wichtiger Faktor für den Einbau von MtrB ist (Schicklberger *et al.*, 2012). Da allerdings die Hämgruppenfärbung (Abb. 9a) auf eine verringerte Abundanz von MtrA hindeutet, besteht die Möglichkeit, dass neben MtrA auch andere Cytochrome Einfluss auf den Einbau von MtrB haben. Möglich wäre auch, dass durch die Expression des *S. oneidensis* *ccm*-Clusters die heterologe Expression der *c*-Typ Cytochrome verbessert und so der Stress für die Zelle verringert würde. Eine hochregulierte Stressantwort kann zu einer veränderten Expression von Chaperonen und Proteasen, die den Einbau von β -barrel Proteinen katalysieren, führen. Durch fehlgefaltete periplasmatische und/oder Proteine der inneren Membran wird das Cpx-System als Hüllstress-System aktiviert. Dieses reguliert unter anderem zusammen mit dem Stressfaktor σ E die Expression von DegP und anderen periplasmatischen Chaperonen und Proteasen (Danese *et al.*, 1995; Redford und Welch, 2006; Vogt und Raivio, 2012). Marin (2020) konnte zeigen, dass Skp und DegP eine wichtige Rolle bei der Integration von MtrB spielen, während SurA eher von untergeordneter Relevanz zu sein scheint. Dabei konnte zwar in *E. coli* ein Abbau von MtrB durch DegP noch nicht belegt werden, jedoch konnten Interaktionen der

beiden Proteine gezeigt werden (Marin, 2020). Eine veränderte Regulation von DegP aufgrund der verbesserten Cytochrommaturation könnte sich also auf den Einbau von MtrB in die äußere Membran auswirken.

Abschließend sollte auch in diesem Stamm die AQDS-Reduktionsrate untersucht werden. Dabei zeigten die beiden Stämme trotz signifikanter Unterschiede in der Abundanz der heterologen Proteine beider Fraktionen keinen signifikanten Unterschied in ihren jeweiligen Reduktionsraten. Die Ergebnisse stehen teilweise im Gegensatz zu den von Su *et al.* (2020 b) publizierten Ergebnissen, die besagen, die Quantität von CymA sei der ratenlimitierende Schritt. Jedoch gab die Expression der *ccm*-Gene aus *S. oneidensis* auch hier zumindest einen Hinweis auf eine gesteigerte Quantität von CymA, wobei dabei nicht ermittelt werden konnte, ob es sich um einen signifikanten Unterschied handelt. Durch Expression der *S. oneidensis ccm*-Gene konnte keine, über MtrA vermittelte, indirekte Optimierung der Maturation von MtrB^(s) erreicht werden. Das Faltungsdefizit konnte trotz deutlicher Steigerung der MtrB-Quantität nicht behoben werden. Auch dieser Faktor konnte weder als ratenlimitierend identifiziert werden, noch Einfluss auf die Güte der Maturation von MtrB nehmen, sodass ein weiterer Faktor in Betracht gezogen wurde.

4. Analyse des Einflusses des heterolog exprimierten *gsp*-Operons

Die Sekretion äußerer Membrancytochrome wie MtrC aus dem Periplasma durch die äußere Membran wird vom TISS katalysiert. Um zu untersuchen, ob durch das *S. oneidensis* TISS in *E. coli* eine erfolgreiche Sekretion von MtrC möglich ist, und, inwiefern sich die eventuell erfolgreiche Sekretion auf die Reduktionsrate eines CymA, STC MtrCAB exprimierenden Stamms auswirkt, wurden die entsprechenden Gene (*gsp*-Gene) heterolog exprimiert. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des nativen T2SSs in *E. coli* nicht zu einer korrekten Orientierung heterolog exprimierter OMCs oder zur Sekretion von löslichen Cytochromen aus *S. oneidensis* ausreicht. Demnach wird heterolog exprimiertes MtrC zwar maturiert und ist mittels Hämgruppenfärbung in der äußeren Membran von *E. coli* detektierbar, jedoch ist MtrC dabei der periplasmatischen Seite der äußeren Membran zugewandt und kann so nicht als terminale Reduktase fungieren (Richter, 2009). In einer darauf aufbauenden Arbeit von Richter (2014) konnte festgestellt werden, dass nach Integration der für eine Sekretion von MtrC obligaten Teile des *gsp*-Operons aus *S. oneidensis* nicht alle Gene transkribiert wurden.

Deshalb wurden die Gene des Operons von Windhorst (2016) zum einen für eine Expression in *E. coli* kodonoptimiert und zum anderen in drei IPTG-induzierbare Operons unterteilt, wobei die Reihenfolge der entsprechenden Gene so gewählt wurde, dass sie der Transkriptstärke von *S. oneidensis* unter eisenreduzierenden Bedingungen entsprach. Somit wurden aus dem nativen Operon *gspCDEFGHIJKLMN* die drei Operons *gspDEFC*, *gspHIJK* und *gspGLMN* für die Expression in *E. coli* konstruiert. In der Arbeit von Windhorst (2016) konnten bereits zwei der drei Teile stabil ins *E. coli* Genom integriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das finale Konstrukt – *gspDEFC* – an der *attP21-site* des *E. coli* Genoms erstmals erfolgreich integriert werden. Zusätzlich wurde *pilD* über ein Plasmid zusammen mit *mtrC_{snap}* exprimiert. Anschließend wurde auch in dieser Arbeit das Transkriptionsmuster der einzelnen *gsp*-Gene sowie *pilD* untersucht. Es konnten erstmals alle, mutmaßlich an der Sekretion von MtrC beteiligten Gene des TISS aus *S. oneidensis* erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Auch die Transkription der Gene *gspF*, *gspG*, *gspL* und *gspN* konnte durch die Umstellung der Reihenfolge der Gene im Operon im Unterschied zu Richter (2014) erreicht werden. Bei der qualitativen Kontrolle der Transkription fiel außerdem auf, dass die Transkriptstärke nicht immer mit der Position im jeweiligen Operon korreliert. So scheinen vor allem die Transkriptionsstärken der Gene *gspI* und *gspJ* sowie *gspL* und *gspM* nicht in Korrelation zu ihrer entsprechenden Entfernung vom Promotor abzunehmen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch Richter (2014) und Windhorst (2016) machen. Dies deutet auf eine Induktor- bzw. Promotor-unabhängige Möglichkeit der Transkriptionskontrolle hin, wobei die tatsächliche Transkriptstärke zunächst mittels qPCR verifiziert werden sollte um diese Hypothese zu stützen (Shen-Orr *et al.*, 2002; Martínez-Antonio *et al.*, 2008; Mandin und Guillier, 2013). Nachdem die Transkription aller heterolog exprimierter Gene nachgewiesen werden konnte, wurde nachfolgend deren Einfluss in Bezug auf die Sekretion von MtrC_{snap} evaluiert. Publierte Methoden zum Nachweis der Orientierung äußerer Membrancytochrome weisen eine relativ geringe Sensitivität auf, sodass die Abundanz heterolog exprimierter äußerer Membrancytochrome für einen erfolgreichen Nachweis hoch sein muss (Richter *et al.*, 2010; Richter, 2014; Dietrich *et al.*, 2019). Da es allerdings Hinweise darauf gibt, dass eine Überexpression von MtrC in *S. oneidensis* einen toxischen Effekt verursacht (Popp, 2009; Golitsch *et al.*, 2012), wurde in dieser Arbeit ein neuer Assay entwickelt, um eine erfolgreiche Sekretion von MtrC_(snap) nachweisen zu können. Dieser Assay kann im Gegensatz zu der von

Richter *et al.* (2010) etablierten Methode auch zum Screening von Mutantenbanken und Fosmid-Bibliotheken mit einer Vielzahl an Klonen genutzt werden.

Dazu wurde zunächst das Verhältnis von MtrC_{snap} exprimierenden *S. oneidensis*-Zellen mit funktionalem und ohne funktionalen TISS an *SNAP-Capture Magnetic Beads* ermittelt. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit funktionalem TISS ($72,11 \pm 6,87 \%$) und Zellen ohne funktionalen TISS ($27,9 \pm 6,87 \%$) festgestellt werden. Zellen, welche MtrC_{snap} auf die Zelloberfläche sekretieren, konnten durch den entwickelten *pull-down* Assay also deutlich angereichert werden. Nachdem die Methode verifiziert wurde, folgte die Untersuchung des *E. coli*-Stamms mit heterologem TISS verglichen mit einem entsprechenden Kontrollstamm. Auch hier ergaben sich beim *pull-down* Assay signifikante Unterschiede von $71,61 \pm 8,38 \%$ (*E. coli* TISS_{*S. oneidensis*}) zu $28,4 \pm 8,38 \%$ (*E. coli* WT). Aufgrund der nahezu gleichen Ergebnisse aus der Methodvalidierung und der Untersuchung der *E. coli*-Stämme kann von einer erfolgreichen Sekretion von MtrC_{snap} in *E. coli* mit TISS aus *S. oneidensis* ausgegangen werden. Sowohl in *E. coli* als auch in *S. oneidensis* konnte keine 100 %-ige Anreicherung der MtrC_{snap}-sekretierenden Zellen erreicht werden. Dies kann eventuell durch eine etwaige Affinität der Zellen an die Beads erklärt werden (Chalmers *et al.*, 2010). Da in dem bereits beschriebenen vorherigen Versuch von Richter (2014) GspF, GspG, GspL und GspN als wichtige Komponenten des Pseudopilus und der Plattform in der inneren Membran des TISS fehlten, und MtrC nicht sekretiert werden konnte, kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass die erfolgreiche Transkription aller integrierter Gene zu einer Sekretion von MtrC beiträgt.

Abschließend wurde der Stamm auf eine verbesserte AQDS-Reduktion untersucht. Innerhalb der Untersuchung der Module war das TISS und die damit adressierte Sekretion der terminalen Reduktase MtrC_(snap) das erste Modul, was eine signifikant gesteigerte AQDS-Reduktionsrate gegenüber des entsprechenden Vergleichsstamms zeigte. Dies ist umso beachtlicher, als dass es sich bei den Genen *gspCDEFGHIJKLMN* und *pilD* um einen insgesamt ~12.500 bp transkribierenden Bereich handelt und eine erhöhte *metabolic burden* im Vergleich zum Kontrollstamm mutmaßlich gegeben ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AQDS-Reduktion eines *S. oneidensis* Δ OMC-Stamms um das ~1,7-Fache zum *S. oneidensis* WT verringert ist. Der korrespondierende Faktor eines *E. coli* „ Δ OMC-Stamms“ zu einem Stamm, welcher MtrC_(snap) sekretiert, betrug ~1,4. Der Unterschied kann zum einen mit der etwas geringeren Leistungsfähigkeit von MtrC_{snap} zu MtrC (maximale Reduktionsrate von

Fe(III) $\sim 1,8$) erklärt werden. Zum anderen exprimiert der *S. oneidensis* WT vier weitere terminale Reduktasen, MtrF, OmcA, SO_1659 und SO_2931, welche zur Reduktion von AQDS beitragen und in der Δ OMC-Mutante deletiert wurden (Bücking *et al.*, 2010). Da die beiden Stämme nicht identisch in ihrer *c*-Typ Cytochrom Ausstattung sind, ist ein Vergleich der beiden ermittelten Steigerungen nur als Anhaltspunkt zu interpretieren. Trotzdem wird deutlich, dass die AQDS-Reduktionsrate durch Sekretion bzw. korrekte Lokalisation der terminalen Reduktase MtrC signifikant ansteigt, und, dass dieser Anstieg in nativen sowie in nicht nativen exoelektrogenen Mikroorganismen in derselben Größenordnung liegt.

5. Analyse des Einflusses einer Kombination aller untersuchten Module

Um auszuschließen, dass Limitierungen in unterschiedlichen Modulen zeitgleich den EET beeinträchtigen und so etwaige positive Effekte einzelner Module nicht detektierbar sind, wurden alle Module in einem Stamm kombiniert. Dieser Stamm (JG1711¹²) wurde im AQDS-Reduktionsassay verglichen mit dem entsprechenden Kontrollstamm JG1712¹³. Im Reduktionsassay ergab sich jedoch entgegen der Erwartungen eine Verringerung der Reduktionsrate des Stammes mit allen Modulen um den Faktor $\sim 1,7$ verglichen mit dem Kontrollstamm. Da der Einfluss der einzelnen Module entweder keinen signifikanten oder, im Falle des TISS, einen positiven Effekt auf die AQDS-Rate hatte, stellte sich die Frage, warum die Kombination keinen synergistischen Effekt ergibt. Die verringerte Reduktionsrate könnte hauptsächlich durch die *metabolic burden* bedingt sein. Die Diskrepanz zwischen Kontrollstamm und dem zu untersuchenden Stamm beträgt hinsichtlich des transkribierenden Bereichs durch die Integration der Module über 16.000 bp, wovon ca. 1500 bp Plasmid-integriert vorliegen. Für die Replikation und Aufrechterhaltung der (mittleren) Kopienzahl wird beispielsweise eine gewisse Energie- und Ressourcenmenge benötigt, welche durch zunehmende Plasmidgröße steigt (Cheah *et al.*, 1987; Ryan *et al.*, 1989; Khosravi *et al.*, 1990; Glick, 1995). So konnte in der Publikation von Cheah *et al.* (1987) gezeigt werden, dass in Wachstumsversuchen mit *E. coli* die maximale Zelldichte mit zunehmender Plasmidgröße abnahm. Auch die Abundanz heterolog exprimierter Proteine zeigte eine negative Korrelation

¹² *E. coli* DH5 α ZI Δ (*napC-F*) Δ (*frdA-D*)::Ptet_ *cymA* KII::Plac_ *gspHIJK* KIII::Plac_ *gspGLMN* attP21::Plac_ *gspDEFC* attTn7::*hepST_heptaprenyltransferase* pEC86_{*S.oneidensis*} *gentR_mtrAB* pMAL_ *cctA_mtrC_{snap}* *pilD*

¹³ *E. coli* DH5 α ZI Δ (*napC-F*) Δ (*frdA-D*)::Ptet_ *cymA* pEC86_ *gentR_mtrAB* pMAL_ *cctA_mtrC_{snap}* *pilD*

mit zunehmender Plasmidgröße bzw. Kopienzahl (Seo und Bailey, 1985; Cheah *et al.*, 1987). Neben der Replikation von DNA müssen auch zur Biosynthese von Proteinen Energie und Ressourcen in Form von tRNA und AS aufgewendet werden. Es ist also naheliegend, dass die (Über)-Expression sowohl endogener als auch heterologer Proteine eine höhere Belastung für die Zellen bedeutet (Lee und Edlin, 1985; Bentley *et al.*, 1990; Katayama und Nagata, 1990; Wood und Peretti, 1991; Diaz-Ricci *et al.*, 1992; Kaprálek und Ječmen, 1992; Glick, 1995). Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die zusätzliche Expression jedes heterologen Proteins, die Überexpression jedes heterologen oder endogenen Proteins sowie die Replikation der zusätzlichen DNA einen Teil der Energie und Ressourcen der Wirtszelle verbrauchen und somit immer eine metabolische Belastung verursachen. Wie viel höher diese Belastung für den hier untersuchten Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm ist, kann nicht explizit bestimmt werden. Da es sich aber um einen sehr großen transkribierenden Bereich handelt und die entsprechend exprimierten Proteine komplex hinsichtlich der Maturation und Translokation sind, kann von einem deutlichen Effekt ausgegangen werden. Es wäre neben der generell erhöhten *metabolic burden* auch möglich, dass die Module untereinander dysergistisch wirken und sich gegenseitig in ihrer Funktion beeinträchtigen. Dabei ist zwar unwahrscheinlich, dass die Module direkt interferieren, jedoch müssen Komponenten des TIISS, der *ccm*-Machinerie und die entsprechenden *c*-Typ Cytochrome durch das Sec-Translokon ins Periplasma transferiert werden. Das Sec-Translokon kann bei Überexpression entsprechend zu translozierender Proteine an die Kapazitätsgrenze kommen, was zu einer Aggregation der Proteine im Cytoplasma einhergehend mit hohem Stress für die Zellen führt (Wagner *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2008; Schlegel *et al.*, 2012). Außerdem wurde der Einfluss des *ccmS.oneidensis*-Clusters in einem *E. coli*-Stamm getestet, der CymA, STC und MtrA^s als heterologe *c*-Typ Cytochrome exprimiert. Um einen negativen Einfluss auf die AQDS-Rate final ausschließen zu können, stünde allerdings noch die Untersuchung des Einflusses des *ccmS.oneidensis*-Clusters in einem Stamm, der CymA, STC, MtrA und MtrC exprimiert, aus. Über die bisher erhobenen Daten lässt sich nicht ausschließen, dass sich die Söchiometrie der Cytochrome bei Co-Expression von MtrC und (Über)-Expression des *ccm*-Clusters verschiebt, was sich auf die AQDS-Reduktionsrate auswirken kann (Goldbeck *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2020 b).

Trotz der verringerten Reduktionsrate bei Kombination aller Module wurde dieser Stamm als Ausgangsstamm für einen *gain-of-function* Screen verwendet, da ein positiver Einfluss des

CCMS.oneidensis- und des MK-7 Moduls nicht auszuschließen und durchaus wahrscheinlich ist, und weiterhin die heterologe Expression des TIISS Moduls innerhalb dieser Arbeit als obligat beschrieben werden konnte. Langfristig sollten alle heterolog exprimierte Gene stabil ins *E. coli* Genom integriert werden, um die *metabolic burden* möglichst gering zu halten. Auch Induktionsstudien der jeweiligen Promotoren könnten in Zukunft Aufschluss über eine Optimierung der Expression geben und so einen negativen Effekt durch Übersättigung des Sec-Translokons oder Veränderung der Stöchiometrien minimieren.

6. Evaluierung eines *gain-of-function* Screenings nach weiteren Faktoren des EETs

Durch Expression des TIISS-Moduls konnte erstmals eine Sekretion von MtrC auf die Zelloberfläche eines *E. coli*-Stamms gezeigt werden. Trotz einer dadurch erreichten Steigerung der AQDS-Reduktionsrate ist die Reduktionsrate verglichen mit *S. oneidensis* weiterhin mehrere hundert-fach geringer. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass weitere Faktoren den Elektronentransfer maßgeblich beeinflussen. Unklar ist dabei, ob es sich um den zentralen Stoffwechsel betreffende Faktoren oder um direkt EET-assoziierte Faktoren handelt. Da die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass die erfolgreiche Transplantation von EET-Ketten ein hoch komplexes, multifaktorielles Unterfangen ist, wurde zur weiteren Aufklärung ein *gain-of-function* Screen etabliert. Der *E. coli*-Stamm der finalen Ausbaustufe stellte den dazu verwendeten Chassis-Stamm dar. In diesem Stamm, in dem alle Module vereint waren, die eine bekannte oder vermutete essenzielle Funktion im EET haben, wurde eine Fosmid-Bibliothek, basierend auf dem Genom von *S. oneidensis*, erstellt. Um im erhaltenen Konsortium Stämme bzw. Fosmide mit verbessertem EET zu identifizieren, wurde dieses im BES je einmal mit und einmal ohne Zugabe von MB selektiert. Da der Stamm erfolgreich MtrC sekretiert, kann die Selektion theoretisch auch ohne MB als membrangängiges *shuttle* erfolgen. Nach dreimaliger Überführung der Anode beider BES wurden die erhaltenen Konsortien in einem Zellsuspensionsassay im BES mit einem Kontrollstamm mit leerem Fosmid verglichen. Entsprechend der Selektion wurden die Zellsuspensionsassays jeweils mit und ohne MB durchgeführt. Sowohl das mit MB selektierte Konsortium als auch das ohne *shuttle* selektierte Konsortium zeigten eine zum Kontrollstamm um Faktor 1,6 bzw. 1,5 signifikant erhöhte mittlere Stromdichte im BES. Da mittels HPLC keine organischen Säuren als Stoffwechselprodukte detektiert werden, können zwei metabolische Szenarien als Grenzfälle

des realen Stoffwechsels angenommen werden. Entweder Glycerin wurde zu CO₂ oxidiert oder Glycerin wurde zu Biomasse umgesetzt. Da der Versuchsaufbau keine Aussage darüber ermöglichte, zu welchen Anteilen diese Szenarien stattfanden, wurden die beiden Grenzfälle berechnet. Beide Konsortien zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Coulomb-Effizienz der beiden angenommenen Szenarien, jedoch ist die Tendenz der Coulomb-Effizienz, korrespondierend zu den erreichten Stromdichten, in den beiden Fosmid-Konsortien höher als in den Kontrollstämmen. Der erste betrachtete Grenzfall führt bei der Oxidation von Glycerin zu CO₂ zu einer Nettofreisetzung von 12,6 mol Elektronen pro Mol Glycerin, der gemessene Strom entspricht jedoch lediglich 8 – 15 % dieser Elektronen. Die Assimilation von Biomasse geht mit einer Nettofreisetzung von 0,6 mol Elektronen pro Mol Glycerin einher. Dies entspräche einer CE von > 100 %. Diese Beobachtung lässt zwei Interpretationen zu: Entweder der Anteil eines der beiden metabolischen Szenarien lag nicht bei 100 %, sondern es handelte sich um eine Mischform der beiden Szenarien, oder die Versuche verliefen unter Anwesenheit eines alternativen Elektronenakzeptors. Oft ist dies bei Sauerstoffkontaminationen im BES der Fall, wo Sauerstoff aufgrund seines hohen Redoxpotentials als bevorzugter Elektronenakzeptor fungiert (Unden *et al.*, 1994). Da die Versuche allerdings in einer Anaerobenkammer mit kontinuierlicher Sauerstoffüberwachung durchgeführt wurden, ist diese Hypothese vernachlässigbar. Es muss daher angenommen werden, dass es sich um eine Mischform der beiden metabolischen Szenarien handelt, in der ein Teil des Glycerins zu CO₂ oxidiert und ein Teil zu Biomasse umgesetzt wird.

Anschließend an die Untersuchung im BES sollte mittels Sequenzierung untersucht werden, welche der *S. oneidensis* Gene und/oder welche Mutationen des *E. coli*-Genoms Einfluss auf die beobachtete Diskrepanz in der Leistungsfähigkeit zwischen dem Fosmid-Konsortium nach Selektion ohne MB gegenüber der des Kontrollstamms hatten. Mittels Brückensynthese-Sequenzierung wurden dazu sowohl die Fosmide als auch das Genom des Konsortiums und des Kontrollstamms sequenziert. Ersteres, um zu ermitteln, welche der *S. oneidensis*-Gene gegebenenfalls zu den gesteigerten Stromdichten beitragen, zweiteres, um zu überprüfen, ob durch Adaptation bei der Selektion eine genomische Varianz entstand, die ebenfalls Einfluss auf die Stromdichte haben könnte.

Die Sequenzierung zeigte, dass der dreimalige Transfer unter stetigem Selektionsdruck ausreichte, um das gesamte Konsortium, welches initial aus 24.000 Klonen bestand, auf das Auftreten lediglich zweier Fosmide zu dezimieren. Es ist daher anzunehmen, dass einige der

auf den Fosmiden kodierten Gene einen deutlich positiven Effekt auf die Vitalität des Stamms unter Anoden-atmenden Bedingungen haben. Die Analyse der insgesamt 46 kodierten Gene auf den Fosmiden (Tabelle 24) ergab außerdem, dass für keines der Gene bislang ein direkter Zusammenhang mit EET-Prozessen gezeigt werden konnte. Unter den identifizierten Genen fanden sich 4 für Transposasen kodierende Gene sowie 12 Gene, deren Funktion nicht näher bekannt ist (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000). Unter den übrigen 30 identifizierten Genen konnte der Großteil entsprechend der postulierten Funktion des jeweiligen Genprodukts als für eine regulatorische Funktion kodierend zusammengefasst werden. Diese sind beispielsweise an der globalen Stressantwort (*recX*, *recA*, *rpoS*, *surE*, *SO_3442*, *relV*), bei Antworten auf Energie und Nährstoffmangel (*relA*) oder an der Regulation des Energiestoffwechsels und der Substratverwertung (*barA*, *lldR*) beteiligt. Außerdem konnten drei ECF-like Sigma- bzw. Anti-Sigma-Faktoren (*extracytoplasmic function sigma factors*) (*SO_3838*, *SO_3840*, *SO_3841*) identifiziert werden. Neben Genen mit regulatorischer Funktion sind Gene, welche am Energiestoffwechsel (*sfcA*, *eno*), und Gene, welche an der Organisation der Zellhülle beteiligt sind (*nlpD*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*), kodiert (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000).

Gene der globalen Stressantwort konnten bereits in Transkriptom-Analysen von *S. oneidensis*-Stämmen unter Eisen- bzw. Anoden-atmenden Bedingungen als positiv reguliert identifiziert werden (Beliaev *et al.*, 2005; Rosenbaum *et al.*, 2012). ECF-Sigma-Faktoren spielen in dem Stamm eine Schlüsselrolle bei der Koordination der Gentranskription während verschiedener Stressreaktionen (Beliaev *et al.*, 2005). Da anzunehmen ist, dass auch in *E. coli* unter Anoden-atmenden Bedingungen erhöhte Stressantworten induziert sind, könnten sich die zusätzlich exprimierten Gene aus *S. oneidensis* positiv auswirken. Interessanterweise führte auch die Adaptation eines *E. coli*-Stamms mit Glycerin als Kohlenstoffquelle zu einer Mutation in *rpoS* (Cheng *et al.*, 2014). Somit scheint RpoS ein wichtiger Faktor unter sowohl Anoden-atmenden als auch unter Glycerin-verstoffwechelnden Bedingungen zu sein. Für *S. oneidensis* wurde postuliert, dass die positiv regulierte Stressantwort unter Anoden-atmenden Bedingungen zu einem erhöhten Energiebedarf der Zelle führt, weshalb ein erhöhter Stoffwechselumsatz zur Deckung des Energiebedarfs notwendig ist (Rosenbaum *et al.*, 2012). Für *E. coli* wurde ebenfalls postuliert, dass der Zentralstoffwechsel eine mögliche Limitierung in der Leistungsfähigkeit in BES darstellt (Beblawy *et al.*, 2020). Für das Sensorkinase-Gen *barA* konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten einen deutlich verlangsamten

Wachstumsphänotyp bei Wachstum mit Kohlenstoffquellen, welche in die Glykolyse eingespeist werden, aufweisen (Pernestig *et al.*, 2003). BarA aktiviert in wildtypischen Stämmen neben RpoS auch die Transkription der nicht-kodierenden RNAs CsrB und CsrC, die wiederum mit dem globalen Regulator CsrA interagieren (Mukhopadhyay *et al.*, 2000; Chavez *et al.*, 2010). Die CsrA-Aktivität, reguliert partiell neben Biofilmentwicklung und Motilität auch den zentralen und sekundären Kohlenstoffmetabolismus in *E. coli* und anderen Mikroorganismen (Babitzke und Romeo, 2007). Eine Überexpression von *barA* könnte dem Stamm einen Wachstumsvorteil vermitteln, da während der Selektion Glycerin anaerob respiratorisch umgesetzt wurde. Interessanterweise resultierten bisherige Versuche einer *barA*-Überexpression stets in Mutationen in *barA* einhergehend mit einer veränderten BarA-Aktivität (Tomenius *et al.*, 2005). Dies liegt mutmaßlich an pleiotropen Signal- und *Cross-Talk*-Effekten von BarA mit beispielsweise RpoS sowie bislang unbekanntem Regulatoren (Mukhopadhyay *et al.*, 2000; Tomenius *et al.*, 2005). Diese Effekte scheinen allerdings unter den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen im Gegensatz zu vorherigen Studien einen positiven Effekt auf die Zellen haben. Weiterhin ist erwähnenswert, dass Selektionsstudien von *S. oneidensis*-Stämmen, die Glukose in BES verwerten, zu Variationen im Gen, welches UvrY kodiert, geführt (Edel, 2021). UvrY bildet mit BarA ein Zweikomponentensystem. Anscheinend ist damit die Funktion von BarA sowohl für *S. oneidensis* als auch für den hier erstellten *E. coli*-Stamm entscheidend für die Leistungsfähigkeit in BES.

Weitere interessante Gene sind diejenigen, deren Genprodukte an der Zellwandsynthese bzw. an der Zusammensetzung der äußeren Membran beteiligt sind. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der äußeren Membran sind wesentlich für den korrekten Einbau von Membranproteinen wie dem EET-assoziierten β -barrel Protein MtrB (Phillips *et al.*, 2009; Pogozheva *et al.*, 2013; Horne *et al.*, 2020). Mutanten mit einer Defizienz in dem in der äußeren Membran verankerten Lipoprotein NlpD zeigen einen in der Zellteilung gestörten Phänotyp (Uehara *et al.*, 2010; Tsang *et al.*, 2017). IspF und IspD sind Enzyme im Methylerythritolphosphatweg-Weg, die die Synthese von 2-C-Methyl-d-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphat (MEC) katalysieren und durch ihre Beteiligung an der Isoprenoid-Synthese auch an der Synthese des Lipidträgers Undecaprenol und damit an der Biogenese der Zellwand beteiligt sind (Bongers *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018). Eine Deletion in *ispF* verminderte das Zellwachstum und zeigte einen filamentösen Phänotyp (Campbell und Brown, 2002). Durch Expression der drei Gene könnte die Polarität und Zusammensetzung der äußeren Membran

verändert sein, was sich möglicherweise positiv auf das beobachtete Faltungsdefizit von MtrB bei Expression in *E. coli* auswirken könnte (Stephan, 2015; Marin, 2020). Neben dem Einfluss auf die Zellwandsynthese besitzen IspF und IspD durch ihre Rolle in der Isopentenyl-Diphosphat-Synthese eine wichtige Funktion in der Synthese von Chinonen bzw. deren Isoprenoideinheiten (Wilding *et al.*, 2000). So konnte beispielsweise IspD als eines der ratenlimitierenden Enzyme für den Methylerythritolphosphatweg-Weg und die Chinon-Synthese in *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert werden (Lu *et al.*, 2013). Da bekannt ist, dass Chinone durch spezifische Interaktion mit CymA eine zentrale Rolle im EET spielen, ist die weitere Analyse des Effekts einer Expression von *ispF* und *ispD* von großem Interesse (McMillan *et al.*, 2012).

Über die reine Identifikation der Fosmid-kodierten Gene kann allerdings keine abschließende Aussage über deren Beteiligung am beobachteten Phänotyp getroffen werden, da im Rahmen dieser Arbeit beispielsweise nicht untersucht werden konnte, welche der kodierten Gene unter den gewählten Bedingungen exprimiert wurden. Um zu identifizieren, welche der kodierten Gene sich tatsächlich positiv auf den EET, die Maturation von MtrB bzw. die Leistung des *E. coli*-Stamms im BES auswirken, könnte zunächst eine Transkriptom-Analyse Aufschluss geben, welche der Gene exprimiert werden. Diese könnten dann sub-kloniert und die entsprechenden Stämme individuell untersucht werden. Allerdings ist hervorzuheben, dass durch den hier gewählten *gain-of-function Screen* Gene, die bislang nicht in direkten Zusammenhang mit EET-Prozessen gebracht werden konnten, möglicherweise einen maßgeblichen Einfluss auf die Funktionalität transplantierte EET-Ketten haben. Da sich lediglich zwei der Fosmide in der Selektion des Konsortiums durchsetzen konnten, scheinen diese einen deutlichen Selektionsvorteil zu bieten. Dies bestätigte den Erfolg des hier gewählten *gain-of-function Screening*-Ansatzes.

Um außerdem zu überprüfen, ob durch selektive Laborevolution eine genomische Varianz entstand, die ebenfalls Einfluss auf die Stromdichte haben könnte, wurde das Genom des resultierenden Konsortiums und das des Ausgangsstamms mittels Brückensynthese-Sequenzierung sequenziert und analysiert. Dabei wurden insgesamt 18 Gene identifiziert, in denen mindestens ein AS-Austausch auftrat. Einige dieser Mutationen betrafen Gene, deren Genprodukte putative Funktionen im Nuklein- und Aminosäurestoffwechsel (*endA*, *ppnN*, *rbsR*, *rbsK*, *scpC*, *scpA*, *oppA*, *asnC*, *bglH*, *ygfS*) innehaben (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000). Außerdem konnte ein Gen identifiziert werden, dessen Produkt der

Atmungskette (*narG*) zugeordnet werden kann, sowie ein Gen, dessen Produkt in die Peptidoglykan- und Lipopolysaccharid-Synthese involviert ist (*glmU*) (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000; Mengin-Lecreulx und van Heijenoort, 1993). Glycerin wird als Kohlenstoffquelle weniger effektiv verwertet als Glukose, was sich durch eine, durch Kohlenstofflimitation induzierte Stressreaktion in *E. coli* zeigt (Martínez-Gómez *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 2020). Interessanterweise konnte keine Mutation identifiziert werden, welche zuvor in *E. coli*-Stämmen bei Adaptationen mit Glycerin als Kohlenstoffquelle auftraten (Cheng *et al.*, 2014). Somit scheinen die Mutationen spezifisch für die hier untersuchte extrazelluläre Atmung zu sein. Die identifizierten Mutationen im Nuklein- und Aminosäure-Stoffwechsel könnten allerdings darauf hindeuten, dass eine potentielle Anpassung des Stamms in Bezug auf die Substratverwertung stattgefunden hat. Um einer Kohlenstofflimitation vorzubeugen, wäre es möglich, dass Mutationen in Genen des Nuklein- und Aminosäure-Stoffwechsels des Stamms diesen zur partiellen Nutzung der alternativen Kohlenstoffquellen befähigen (Maser *et al.*, 2020). Diese sind theoretisch durch das im Medium vorhandene Hefeextrakt verfügbar. Die Mutation im Repressor des Ribose-Operons *rbsR* führt zum Einbau eines Stop-Codons und somit zum Abbruch der Translation nach ca. 30 % des Proteins. Die Reprimierung des Ribose-Operons ist deshalb möglicherweise abgeschwächt oder nicht mehr gegeben, was zu einer Aktivierung des Ribose-Operons sowie des Rückgewinnungswegs der Purinnukleotid-Synthese führen könnte (Shimada *et al.*, 2013).

Eine Mutation in Genen, welche in der Atmungskette relevant sind, könnte als adaptive Antwort von *E. coli*, eine neue Atmungskette aufzubauen, interpretiert werden. Der AS-Austausch in NarG führte zu einem Translationsabbruch durch Einfügen eines Stop-Codons nach Translation von ca. 75 % des Proteins. NarG ist ein periplasmatisches 4Fe-4S-Schwefel-Molybdoprotein, welches *E. coli* zur Nutzung von Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor befähigt (Jormakka *et al.*, 2004; Iobbi-Nivola und Leimkühler, 2013). Die Deletion hat vermutlich keinen Einfluss auf die Anbindung der Kofaktoren. Das Eisen-Schwefel-Cluster wird von Domäne I (AS 29-110 und 789-814) des Enzyms gebunden. Die Molybdän-Bindestelle ist an Aminosäureposition 222 (Jormakka *et al.*, 2004). Allerdings bildet NarG einen Komplex mit den Untereinheiten NarI und NarH, der an der Cytoplasmamembran gebunden ist (Ballard und Ferguson, 1988; Berks *et al.*, 1995, Guigliarelli *et al.*, 1996; Jormakka *et al.*, 2004). Die Deletion betrifft einige Aminosäuren, die an der Bildung des Komplexes beteiligt sind, und es wäre somit möglich, dass NarG dadurch nicht mehr in den Komplex eintritt und als diffusibles periplasmatisches

Elektronen-Shuttle fungieren könnte. Interessanterweise kodiert eines der auf Fosmid 1 lokalisierten Gene (*SO_3449*) für ein regulatorisches Protein des Molybdän-Metabolismus. Somit könnte es hier zu einem synergistischen Zusammenspiel des Fosmids mit einer Mutation in dem *E. coli*-Stamm gekommen sein, um die Genese des verkürzten NarG-Proteins zu ermöglichen. Interessant ist weiterhin die Mutation im Gen *glmU*. Das bifunktionelle Enzym GlmU katalysiert die CoA-abhängige Acetylierung von GlcN-1-PO₄ und die metallabhängige Kondensation des resultierenden GlcNAc-1-PO₄ mit UTP zu dem aktivierten Nukleotidzucker UDP-GlcNAc (Olsen *et al.*, 2007). UDP-GlcNAc nimmt die Position eines zentralen Metaboliten ein, der zur Bildung von Peptidoglycan, Lipopolysaccharid und Teichonsäure-Komponenten der bakteriellen Zellwand führt (Anderson *et al.*, 1987). Einige der Gene auf den selektierten Fosmiden deuten auf einen Selektionsvorteil durch Veränderungen in der äußeren Membran des Organismus hin. Hier könnte auch die Mutation in *glmU* eine Rolle spielen. Die veränderte Zusammensetzung der äußeren Membran könnte eine Rolle für die Funktion des heterotrimeren Schlüsselenzyms der extrazellulären Atmung, des MtrCAB-Komplexes, spielen. Es wäre hier interessant, in weiteren Untersuchungen zu analysieren, ob sich die chemische Zusammensetzung der äußeren Membran des selektierten *E. coli*-Stammes der eines *S. oneidensis* WT angepasst hat. Da aus den, in dieser Arbeit identifizierten Mutationen nicht explizit auf einen Funktionsverlust oder -gewinn geschlossen werden kann, ist eine Einordnung zu diesem Zeitpunkt nur spekulativ und es bedarf weiterer Untersuchungen, um den Einfluss der einzelnen Mutationen in Bezug auf die beobachtete Leistungssteigerung im BES zu analysieren.

7. Evaluierung möglicher Limitierungen der Leistungsfähigkeit eines Produktionsstamms

Anoden-gestützte Fermentationen vereinen positive Aspekte anoxischer und oxischer Fermentationsroutinen mit dem Vorteil, dass der Einsatz eines nicht abbaubaren Elektronenakzeptors die Herstellung von Endprodukten mit einer vom Substrat unabhängigen Oxidationsstufe ermöglicht. Der Produktionsstamm muss dazu in der Lage sein, den Elektronenüberschuss auf eine Elektrode zu übertragen. Bisher konnte gezeigt werden, dass Anoden-gestützte Fermentationen zwar hohe Kohlenstoff-Effizienzen aufweisen, jedoch verglichen mit oxischen Produktionsroutinen nicht kompetitiv hinsichtlich der Raum-Zeit-

Ausbeute sind (Yang *et al.*, 2017; Förster *et al.*, 2018; Beblawy *et al.*, 2020). In dieser Arbeit wurde ein in Vorarbeiten entwickelter *E. coli*-Produktionsstamm auf mögliche Ursachen der Limitierung untersucht. Die Experimente bauen auf einem obligat respiratorischen *E. coli*-Stamm mit heterologer Expression von Proteinen zur Acetoin synthese auf. Neben den Modifikationen im Zentralstoffwechsel wurde der Stamm durch Einbringen von Teilen der EET-Kette aus *S. oneidensis* dazu befähigt, respiratorische Elektronen aus dem Metabolismus ins Periplasma auf das Redox-*shuttle* MB zu transferieren. Für die Limitierung in der Raum-Zeit-Ausbeute ergaben sich daraus zwei mögliche Ursachen. Zum einen können geringe Elektronentransferraten zu einem Elektronenrückstau in der EET-Kette führen, zum anderen können die Modifikationen des Zentralstoffwechsels die Oxidation von Glukose so verlangsamen, dass nicht genügend e^- auf die *c*-Typ Cytochrome und infolgedessen auf MB und die Anode transferiert werden. In der Arbeit von Beblawy (2019) konnte durch Adaptation des Stammes die anaerobe Wachstumsrate um das 3-Fache gesteigert werden. Dies führte zu einer 2-fach gesteigerten Produktivität im BES. In dieser Arbeit sollte daraufhin untersucht werden, ob dies an einem kinetischen Effekt aufgrund einer unzureichenden Interaktion zwischen *c*-Typ Cytochromen und MB liegt, und sich somit die Limitierung vom Zentralstoffwechsel hin zum EET verschoben hat. Dazu wurde die Expressionsrate von CymA und STC durch Einführung einer zusätzlichen Plasmid-kodierten Kopie der beiden Gene (Stamm JG1397) erhöht. Die Einführung des Plasmids und die Expression der Gene erhöhte die MB-Reduktionsrate um das 2,45-Fache (Abbildung 22 b). Die Experimente stimmen mit publizierten Ergebnissen überein, die zeigen, dass eine Überexpression von CymA und STC zu gesteigerten Elektronentransferraten führen, und die Expressionsstärke der *c*-Typ Cytochrome einen entscheidenden Einfluss auf die Elektronentransferrate haben kann (Goldbeck *et al.*, 2013; Vellingiri *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2019).

Dennoch führte die Untersuchung dieses Stammes im BES nicht zu einer signifikanten Erhöhung von Stromdichte und Acetoinausbeute im Vergleich zum Kontrollstamm (JG1295). Dieses Ergebnis lässt die Hypothese zu, dass die Stromdichte trotz vorheriger Steigerung der anaeroben Wachstumsrate noch immer durch den zentralen Metabolismus und nicht durch die Elektronentransferkinetik begrenzt wird. Im Hinblick auf eine Weiterentwicklung des Produktionsstamms scheint es daher sinnvoll, weitere Limitierungen im Stoffwechsel ausfindig zu machen und diese gezielt zu adressieren. Der Diskrepanz zwischen der in Beblawy (2019) beschriebenen DMSO- und MB-Reduktionskinetik kann neben einer Limitierung der

Elektronentransferkinetik auch die toxische Wirkung von MB zugrundeliegen. MB kann neben der äußeren auch die innere Membran passieren und es ist bislang unklar, inwiefern cytoplasmatisches MB den Metabolismus beeinflusst (Tuite und Kelly, 1993; Usacheva *et al.*, 2001; de Aguiar Coletti *et al.*, 2017). Deshalb ist neben Untersuchungen zu Limitierungen bestehender Produktionsstämme/-routinen auch die Etablierung der gesamten EET-Kette mit relevanten Elektronentransferraten unabdingbar, sodass kein externes *shuttle*-Molekül zugegeben werden muss, um den Elektronentransfer auf die Anode zu ermöglichen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Da die Transplantation von EET-Ketten in nicht-native exoelektrogene Mikroorganismen bislang stets mit einem enormen Verlust der Reduktionsraten einhergeht, ist anzunehmen, dass durch bisherige Forschung nicht alle obligaten Faktoren des EETs identifiziert werden konnten. Ziel der Arbeit war deshalb die Etablierung mobiler genetischer Elemente, die zu einer Ratensteigerung transplanteder EET-Ketten führen. Diese genetischen Elemente sollten zum einen mittels systematischer Adressierung verschiedener EET-assoziiierter Faktoren und zum anderen durch Etablierung eines Screens zur Identifikation weiterer, bislang nicht im Zusammenhang mit EET-Prozessen stehender Faktoren identifiziert werden. Außerdem sollte ein bereits etablierter Produktionsstamm auf weitere Limitierungen hinsichtlich der Leistungsfähigkeit, neben der Limitierung durch die entsprechenden EET-Raten untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die erfolgreiche Sekretion sowie korrekte Lokalisation der terminalen Reduktase MtrC bei heterologer Expression in *E. coli* nachgewiesen werden. Hierzu wurde das TISS aus *S. oneidensis* in *E. coli* transplantiert und heterolog exprimiert. Neben der Transplantation des TISS, einhergehend mit einer 1,4-fachen Steigerung der EET-Rate, konnte die Transplantation weiterer genetischer Module mit dem Ziel der funktionalen Transplantation von EET-Ketten etabliert werden. Durch deren anschließende Expression konnte der Einfluss des jeweiligen genetischen Moduls auf den EET bzw. die EET-Raten untersucht werden. Dieses Vorgehen erlaubte nicht nur die systematische Untersuchung etwaiger ratenlimitierender Schritte, sondern ermöglichte auch die Identifikation weiterer obligater EET-Faktoren und somit die Postulierung eines erweiterten minimalen Proteinsetups für einen erfolgreichen EET um die Proteine des TISS aus *S. oneidensis*. Die Einbringung und

Untersuchung der bisherigen Module ergab bislang keine Verbesserung des Faltungsdefizits von MtrB. Hinsichtlich einer gerichteten Untersuchung weiterer Module stellt deshalb die Transplantation des BAM-Komplexes, welcher den Einbau von MtrB katalysiert den wichtigsten nächsten Schritt dar.

Neben der gerichteten Untersuchung EET-assoziiierter Module konnte ein *gain-of-function Screen* etabliert werden, welcher eine randomisierte Untersuchung aller genetischen Elemente aus *S. oneidensis* in *E. coli* im Hinblick auf verbesserte EET-Raten ermöglicht. Der entscheidende Vorteil gegenüber bislang angewendeten *loss-of-function Screens* lag vor allem in der Möglichkeit, auch genetische Elemente, welche in *knock-out* Studien letal sind, identifizieren zu können. Dadurch konnte ein Konsortium selektiert und untersucht werden, das 1,5-fach gesteigerte EET-Raten aufwies. Dieser Anstieg wurde durch eingebrachte genetische Elemente aus *S. oneidensis*, durch genomische Mutationen oder durch eine Kombination von beidem erreicht. Da die eingebrachten Elemente aus *S. oneidensis* auf lediglich zwei Fosmiden kodiert waren, die sich im Laufe des Selektionsprozesses alleinig durchsetzen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass einige der kodierten *S. oneidensis*-Gene einen deutlich positiven Effekt vermitteln konnten. Identifiziert wurden vielversprechende Gene der globalen Stressantwort, des Kohlenstoffmetabolismus sowie der Membran-/Zellwandsynthese. Diese im Einzelnen zu analysieren, stellt den nächsten wichtigsten Schritt zur Charakterisierung des EETs sowie zur weiteren Steigerung der EET-Raten in nativen und nicht-nativen exoelektrogenen Mikroorganismen dar. Dazu sollten die per Sequenzierung ermittelten Gene sub-kloniert werden, um schlussendlich weitere mobile genetische Module zu generieren, über deren (Über-)Expression eine Möglichkeit zur weiteren Steigerung der EET-Raten besteht. Außerdem sollte auch der Einfluss der aufgetretenen genomischen Mutationen des *E. coli*-Stamms weitergehend untersucht werden.

Zu der bestehenden Dringlichkeit zur Untersuchung weiterer EET-assoziiierter Proteine bzw. Module konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben ratenlimitierenden Schritten im EET auch Limitierungen des Zentralstoffwechsels des Produktionsstamms eine maßgebliche Rolle in der Anwendbarkeit der Stämme in Anoden-gestützten Fermentationen spielen. So ergaben Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Verbesserung eines Produktionsstamms hinsichtlich der EET-Raten nicht mit einer Steigerung der Leistungsfähigkeit im BES einherging. Aus diesem Grund sollte das Augenmerk zukünftiger Forschung auch in der Identifikation der Limitierungen des Zentralstoffwechsels liegen. Hier konnte durch die

erfolgreiche Sekretion von MtrC und der damit theoretisch möglichen direkten Anodeninteraktion ein wichtiger Beitrag zum Betrieb von BES mit *E. coli* unabhängig von redoxaktiven, membrangängigen Shuttle-Molekülen, geleistet werden. Dadurch könnte in Zukunft sichergestellt werden, dass keine Moleküle, welche potentiell mit dem Zentralstoffwechsel interagieren, in Anoden-gestützten Fermentationen eingesetzt werden müssen. Erst dann können sinnvoll weitere Limitationen identifiziert werden. Dies kann beispielsweise ungerichtet über Adaptationen unter den gewünschten Bedingungen mit anschließender Re-Sequenzierung des Genoms erreicht werden (Beblawy *et al.*, 2020). Denkbar sind aber auch gerichtete Verfahren wie die Erhöhung des intrazellulären NADH/NAD⁺-Verhältnisses. Dies erwies sich beispielsweise in nativen exoelektrogenen Mikroorganismen als vielversprechend. So wurde ein *S. oneidensis*-Stamm hinsichtlich einer schnelleren NADH-Regeneration und einer Erhöhung des NADH/H⁺-Spiegels modifiziert, was zu einer ~3,0-fachen bzw. 4,4-fachen Steigerung der maximalen Leistung in BES führte (Li *et al.*, 2018 a, b). Die Adressierung des NADH/NAD⁺-Verhältnisses sowie die Erhöhung des gesamten NADH/NAD⁺-Spiegels führte auch in anderen Organismen zu vergleichbar positiven Effekten hinsichtlich der Leistungsfähigkeit in BES (Yong *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2016).

V. Literatur

- Ahuja, U., & Thöny-Meyer, L. (2005). CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem*, 280(1), 236–243.
- Albrecht, R., Schütz, M., Oberhettinger, P., Faulstich, M., Bermejo, I., Rudel, T., Diederichs, K., Zeth, K., & Ikerbasque, F. (2014). Biological crystallography structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta Cryst*, 70, 1779–1789.
- Alves, M. N., Neto, S. E., Alves, A. S., Fonseca, B. M., Carrêlo, A., Pacheco, I., Paquete, C. M., Soares, C. M., & Louro, R. O. (2015). Characterization of the periplasmic redox network that sustains the versatile anaerobic metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol*, 6, 665.
- Anderson, M. S., Robertson, A. D., Macher, I., & Raetz, C. R. H. (1988). Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*: Identification of UDP-3-*O*-[(*R*)-3-hydroxymyristoyl]- α -D-glucosamine as a precursor of UDP-*N*²,*O*³-bis[(*R*)-3-hydroxymyristoyl]- α -d-glucosamine. *Biochemistry*, 27(6), 1908–1917.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P., & Thöny-Meyer, L. (1998). Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. *BBRC*, 251(3), 744–747.
- Babanova, S., Matanovic, I., Cornejo, J., Bretschger, O., Nealson, K., & Atanassov, P. (2017). Outer membrane cytochromes/flavin interactions in *Shewanella* spp.—A molecular perspective. *Biointerphases*, 12(2), 021004.
- Babitzke, P., & Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *COMICR*, 10(2), 156–163.
- Ballard, A. L., & Ferguson, S. J. (1988). Respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence for two *b*-type haems in the γ subunit and properties of a water-soluble active enzyme containing α and β subunits. *Eur j biochem*, 174(1), 207–212.
- Bardischewsky, F., & Friedrich, C. G. (2001). Identification of *ccdA* in *Paracoccus pantotrophus* GB17: Disruption of *ccdA* causes complete deficiency in *c*-type cytochromes. *J Bacteriol*, 183(1), 257–263.
- Beblawy, S., Bursac, T., Paquete, C., Louro, R., Clarke, T. A., & Gescher, J. (2018). Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol*, 109(5), 571–583.
- Beblawy, S. (2019). Anodische Elektrofermentation von Acetoin in *Escherichia coli*. PhD-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.

- Beblawy, S., Philipp, L.-A., & Gescher, J. (2020). Accelerated electro-fermentation of acetoin in *Escherichia coli* by identifying physiological limitations of the electron transfer kinetics and the central metabolism. *Microorganisms*, 8(11), 1843.
- Bekker, M., Kramer, G., Hartog, A. F., Wagner, M. J., De Koster, C. G., Hellingwerf, K. J., & Teixeira De Mattos, M. J. (2007). Changes in the redox state and composition of the quinone pool of *Escherichia coli* during aerobic batch-culture growth. *Microbiology*, 153(6), 1974-1980.
- Beliaev, A. S., & Saffarini, D. A. (1998). *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol*, 180(23), 6292–6297.
- Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L., & Hunnicutt, D. (2001). MtrC, an outer membrane decahaem *c* cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol Microbiol*, 39(3), 722–730.
- Beliaev, A. S., Klingeman, D. M., Klappenbach, J. A., Wu, L., Romine, M. F., Tiedje, J. M., Nealson, K. H., Fredrickson, J. K., & Zhou, J. (2005). Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *J Bacteriol*, 187(20), 7138–7145.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng*, 35(7), 668–681.
- Berks, B. C., Page, M. D., Richardson, D. J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F., & Ferguson, S. J. (1995). Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Mol Microbiol*, 15(2), 319–331.
- Bhagchandani, D. D., Babu, R. P., Sonawane, J. M., Khanna, N., Pandit, S., Jadhav, D. A., Khilari, S., & Prasad, R. (2020). A comprehensive understanding of electro-fermentation. *Fermentation*, 6(3), 92.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462.
- Bongers, M., Chrysanthopoulos, P. K., Behrendorff, J. B. Y. H., Hodson, M. P., Vickers, C. E., & Nielsen, L. K. (2015). Systems analysis of methylerythritol-phosphate pathway flux in *E. coli*: insights into the role of oxidative stress and the validity of lycopene as an isoprenoid reporter metabolite. *Microb Cell Fact*, 14(1), 193.
- Bonnard, G., Corvest, V., Meyer, E. H., & Hamel, P. P. (2010). Redox processes controlling the biogenesis of *c*-type cytochromes. *Antioxid Redox Signal*, 13(9), 1385–1401.

- Bouhenni, R. A., Vora, G. J., Biffinger, J. C., Shirodkar, S., Brockman, K., Ray, R., Wu, P., Johnson, B. J., Biddle, E. M., Marshall, M. J., Fitzgerald, L. A., Little, B. J., Fredrickson, J. K., Beliaev, A. S., Ringeisen, B. R., & Saffarini, D. A. (2010). The role of *Shewanella oneidensis* MR-1 outer surface structures in extracellular electron transfer. *Electroanalysis*, 22(7–8), 856–864.
- Bretschger, O., Obraztsova, A., Sturm, C. A., In, S. C., Gorby, Y. A., Reed, S. B., Culley, D. E., Reardon, C. L., Barua, S., Romine, M. F., Zhou, J., Beliaev, A. S., Bouhenni, R., Saffarini, D., Mansfeld, F., Kim, B. H., Fredrickson, J. K., & Nealson, K. H. (2008). Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl Environ Microbiol*, 74(2), 553.
- Bücking, C., Piepenbrock, A., Kappler, A., & Gescher, J. (2012). Outer-membrane cytochrome-independent reduction of extracellular electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Microbiology*, 158(8), 2144–2157.
- Bücking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S., & Gescher, J. (2010). Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett*, 306(2), 144–151.
- Bursac, T., Gralnick, J. A., & Gescher, J. (2017). Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Bioeng*, 114(6), 1283–1289.
- Campbell, I. M., & Bentley, R. (1969). Inhomogeneity of vitamin K₂ in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 8(11), 4651–4655.
- Campbell, T. L., & Brown, E. D. (2002). Characterization of the depletion of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 184(20), 5609–5618.
- Chalmers, J. J., Xiong, Y., Jin, X., Shao, M., Tong, X., Farag, S., & Zborowski, M. (2010). Quantification of non-specific binding of magnetic micro- and nanoparticles using cell tracking velocimetry: Implication for magnetic cell separation and detection. *Biotechnol Bioeng*, 105(6), 1078–1093.
- Chaturvedi, D., & Mahalakshmi, R. (2017). Transmembrane β -barrels: Evolution, folding and energetics. *BBA*, 1859(12), 2467–2482.
- Chavez, R. G., Alvarez, A. F., Romeo, T., & Georgellis, D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol*, 192(7), 2009–2012.
- Cheah, U. E., Weigand, W. A., & Stark, B. C. (1987). Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 18(2), 127–134.
- Chen, X., Zhou, L., Tian, K., Kumar, A., Singh, S., Prior, B. A., & Wang, Z. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol Adv*, 31(8), 1200–1223.

- Cheng, K. K., Lee, B. S., Masuda, T., Ito, T., Ikeda, K., Hirayama, A., Deng, L., Dong, J., Shimizu, K., Soga, T., Tomita, M., Palsson, B. O., & Robert, M. (2014). Global metabolic network reorganization by adaptive mutations allows fast growth of *Escherichia coli* on glycerol. *Nat Commun*, 5(1), 1–9.
- Chiang, C. J., Ho, Y. J., Hu, M. C., & Chao, Y. P. (2020). Rewiring of glycerol metabolism in *Escherichia coli* for effective production of recombinant proteins. *Biotechnol Biofuels*, 13(1), 205.
- Christensen, O., Harvat, E. M., Thöny-Meyer, L., Ferguson, S. J., & Stevens, J. M. (2007). Loss of ATP hydrolysis activity by CcmAB results in loss of *c*-type cytochrome synthesis and incomplete processing of CcmE. *FEBS J*, 274(9), 2322–2332.
- Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J., Hall, A., White, G. F., Bradley, J., Reardon, C. L., Shi, L., Beliaev, A. S., Marshall, M. J., Wang, Z., Watmough, N. J., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Butt, J. N., & Richardson, D. J. (2011). Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *PNAS*, 108(23), 9384–9389.
- Collins, M. D., & Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev*, 45(2), 316–354.
- Costelloa, S. M., Plummera, A. M., Fleminga, P. J., & Fleming, K. G. (2016). Dynamic periplasmic chaperone reservoir facilitates biogenesis of outer membrane proteins. *PNAS*, 113(33), 4794–4800.
- Coursolle, D., & Gralnick, J. A. (2010). Modularity of the *mtr* respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Mol Microbiol*, 77(4), 995–1008.
- Coursolle, D., & Gralnick, J. A. (2012). Reconstruction of extracellular respiratory pathways for iron(III) reduction in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Front Microbiol*, 3, 56.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. B., & Silhavy, T. J. (1995). The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev*, 9(4), 387–398.
- De Aguiar Coletti, T. M. S. F., De Freitas, L. M., Almeida, A. M. F., & Fontana, C. R. (2017). Optimization of antimicrobial photodynamic therapy in biofilms by inhibiting efflux pump. *Photomed Laser Surg*, 35(7), 378–385.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., & Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *PNAS*, 80(1), 21–25.
- Delgado, V. P., Paquete, C. M., Sturm, G., & Gescher, J. (2019). Improvement of the electron transfer rate in *Shewanella oneidensis* MR-1 using a tailored periplasmic protein composition. *Bioelectrochemistry*, 129, 18–25.

- Deshmukh, M., Brasseur, G., & Daldal, F. (2000). Novel *Rhodobacter capsulatus* genes required for the biogenesis of various *c*-type cytochromes. *Mol Microbiol*, 35(1), 123–138.
- Diaz-Ricci, J. C., Tsu, M., & Bailey, J. E. (1992). Influence of expression of the *pet* operon on intracellular metabolic fluxes of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 39(1), 59–65.
- Dietrich, H. M., Edel, M., Bursac, T., Meier, M., Sturm-Richter, K., & Gescher, J. (2019). Soluble versions of outer membrane cytochromes function as exporters for heterologously produced cargo proteins. *Microb Cell Fact*, 18(1).
- Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Arey, B. W., Williams, K. H., Buck, E. C., & Fredrickson, J. K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: Comparative analysis by electron microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 77(4), 1254–1262.
- Donald, J. W., Hicks, M. G., Richardson, D. J., & Palmer, T. (2008). The *c*-type cytochrome OmcA localizes to the outer membrane upon heterologous expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190(14), 5127–5131.
- Douzi, B., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2012). On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1592), 1059–1072.
- Doyle, M. T., & Bernstein, H. D. (2019). Bacterial outer membrane proteins assemble via asymmetric interactions with the BamA β -barrel. *Nat Commun*, 10(1), 1–13.
- Edel, M. (2021). Verbesserung der Produktivität von *Shewanella oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen durch erhöhte Biofilmbildung. PhD-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Edwards, M. J., White, G. F., Lockwood, C. W., Lawes, M. C., Martel, A., Harris, G., Scott, D. J., Richardson, D. J., Butt, J. N., & Clarke, T. A. (2018). Structural modeling of an outer membrane electron conduit from a metal-reducing bacterium suggests electron transfer via periplasmic redox partners. *J Biol Chem*, 293(21), 8103–8112.
- Edwards, M. J., White, G. F., Butt, J. N., Richardson, D. J., & Clarke, T. A. (2020). The crystal structure of a biological insulated transmembrane molecular wire. *Cell*, 181(3), 665–673.
- El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., Lau, W. M., Nealson, K. H., & Gorby, Y. A. (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *PNAS*, 107(42), 18127–18131.
- Erlendsson, L. S., & Hederstedt, L. (2002). Mutations in the thiol-disulfide oxidoreductases BdbC and BdbD can suppress cytochrome *c* deficiency of CcdA-defective *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol*, 184(5), 1423–1429.
- Facey, S. J., & Kuhn, A. (2010). Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 67(14), 2343–2362.

- Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) Federal Government of Germany (2020) National Bioeconomy Strategy.
- Feissner, R. E., Richard-Fogal, C. L., Frawley, E. R., & Kranz, R. G. (2006). ABC transporter-mediated release of a haem chaperone allows cytochrome *c* biogenesis. *Mol Microbiol*, 61(1), 219–231.
- Filloux, A., Michel, È., & Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*, 22(3), 177–198.
- Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A., Bond, D. R., & Gralnick, J. A. (2010). Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *MBio*, 1(5), 190–200.
- Fonseca, B. M., Paquete, C. M., Neto, S. E., Pacheco, I., Soares, C. M., & Louro, R. O. (2013). Mind the gap: Cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem J*, 449(1), 101–108.
- Förster, A. H., Beblawy, S., Golitsch, F., & Gescher, J. (2017). Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol. Biofuels*, 10(1), 65.
- Francetic, O., Belin, D., Badaut, C., & Pugsley, A. P. (2000). Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *EMBO J*, 19(24), 6697–6703.
- Francetić, O., Lory, S., & Pugsley, A. P. (1998). A second prepilin peptidase gene in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 27(4), 763–775.
- Fu, H., Jin, M., Wan, F., & Gao, H. (2015). *Shewanella oneidensis* cytochrome *c* maturation component CcmI is essential for heme attachment at the non-canonical motif of nitrite reductase NrfA. *Mol Microbiol*, 95(3), 410–425.
- Gao, C., Zhang, L., Xie, Y., Hu, C., Zhang, Y., Li, L., Wang, Y., Ma, C., & Xu, P. (2013). Production of (3S)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase. *Bioresour Technol*, 137, 111–115.
- Gao, H., Barua, S., Liang, Y., Wu, L., Dong, Y., Reed, S., Chen, J., Culley, D., Kennedy, D., Yang, Y., He, Z., Nealson, K. H., Fredrickson, J. K., Tiedje, J. M., Romine, M., & Zhou, J. (2010). Impacts of *Shewanella oneidensis* *c*-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microb Biotechnol*, 3(4), 455–466.
- Gescher, J. S., Cordova, C. D., & Spormann, A. M. (2008). Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: Identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Mol Microbiol*, 68(3), 706–719.

- Gessmann, D., Chung, Y. H., Danoff, E. J., Plummer, A. M., Sandlin, C. W., Zaccai, N. R., & Fleming, K. G. (2014). Outer membrane β -barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA. *PNAS*, 111(16), 5878–5883.
- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv*, 13(2), 247–261.
- Goldbeck, C. P., Jensen, H. M., Teravest, M. A., Beedle, N., Appling, Y., Hepler, M., Cambray, G., Mutalik, V., Angenent, L. T., & Ajo-Franklin, C. M. (2013). Tuning promoter strengths for improved synthesis and function of electron conduits in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2(3), 150–159.
- Goldman, B. S., Beckman, D. L., Bali, A., Monika, E. M., Gabbert, K. K., & Kranz, R. G. (1997). Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome *c* biogenesis. *J Mol Biol*, 268(4), 724–738.
- Goldman, B. S., & Kranz, R. G. (2001). ABC transporters associated with cytochrome *c* biogenesis. *Res Microbiol*, 152(3–4), 323–329.
- Golitsch, F., Bücking, C., & Gescher, J. (2013). Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens Bioelectron*, 47, 285–291.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *PNAS*, 103(30), 11358–11363.
- Gralnick, J. A., & Newman, D. K. (2007). Extracellular respiration. *Mol Microbiol*, 65(1), 1–11.
- Gray, H. B., & Winkler, J. R. (2005). Long-range electron transfer. *PNAS*, 102(10), 3534–3539.
- Grove, J., Busby, S., & Cole, J. (1996). The role of the genes *nrf EFG* and *ccmFH* in cytochrome *c* biosynthesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 252(3), 332–341.
- Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Bertrand, P., Frixon, C., Giordano, G., & Blasco, F. (1996). Complete coordination of the four Fe-S centers of the β subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutants lacking the highest or lowest potential [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry*, 35(15), 4828–4836.
- Han, S., Gao, X. Y., Ying, H. J., & Zhou, C. C. (2016). NADH gene manipulation for advancing bioelectricity in *Clostridium ljungdahlii* microbial fuel cells. *Green Chem*, 18(8), 2473–2478.

- Hartshorne, R. S., Jepson, B. N., Ae, T. A. C., Field, S. J., Jim, A. E., Ae, F., Zachara, J., Liang, A. E., Ae, S., Butt, J. N., David, A. E., & Richardson, J. (2007). Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors. *J Biol Inorg Chem*, 12(7), 1083-94.
- Hartshorne, R. S., Reardon, C. L., Ross, D., Nuester, J., Clarke, T. A., Gates, A. J., Mills, P. C., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Shi, L., Beliaev, A. S., Marshall, M. J., Tien, M., Brantley, S., Butt, J. N., & Richardson, D. J. (2009). Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *PNAS*, 106(52), 22169–22174.
- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D., Eisen, J. A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., Clayton, R. A., Meyer, T., Tsapin, A., Scott, J., Beanan, M., Brinkac, L., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Fraser, C. M. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol*, 20(11), 1118–1123.
- Hein S. (2019). Struktur, Funktion und mikrobielle Biosynthese methylierter Menachinon-Derivate. PhD-Thesis, University of Darmstadt.
- Hernandez, M. E., & Newman, D. K. (2001). Extracellular electron transfer. *Cell Mol Life Sci*, 58(11), 1562–1571.
- Horne, J. E., Brockwell, D. J., & Radford, S. E. (2020). Role of the lipid bilayer in outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *J Biol Chem*, 295(30), 10340–10367.
- Iadanza, M. G., Higgins, A. J., Schiffrin, B., Calabrese, A. N., Brockwell, D. J., Ashcroft, A. E., Radford, S. E., & Ranson, N. A. (2016). Lateral opening in the intact β -barrel assembly machinery captured by cryo-EM. *Nat Commun*, 7(1), 1–12.
- Iobbi-Nivol, C., & Leimkühler, S. (2013). Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *BBA - Bioenergetics*, 1827(8–9), 1086–1101.
- Jensen, Heather M., Alberse, A. E., Malley, K. R., Londerd, Y. Y., Cohen, B. E., Helms, B. A., Weigele, P., Groves, J. T., & Ajo-Franklin, C. M. (2010). Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *PNAS*, 107(45), 19213–19218.
- Jin, M., Jiang, Y., Sun, L., Yin, J., Fu, H., Wu, G., & Gao, H. (2013). Unique Organizational and Functional Features of the Cytochrome *c* Maturation System in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE*, 8(9).
- Jones, C. W. (1985). Bacterial Respiration. *Compr Biotech, The Princip, Appl and Regul of Biotechnol in Ind, Agric and Med*, 1(1).
- Jones, C. M., & Niederweis, M. (2010). Role of porins in iron uptake by *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 192(24), 6411–6417.

- Jormakka, M., Richardson, D., Byrne, B., & Iwata, S. (2004). Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD Enzymes. *Structure*, 12(1), 95–104.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 27–30
- Kaprálék, F., & Ječmen, P. (1992). The structural stability of an expression plasmid bearing a heterologous cloned gene depends on whether this gene is expressed or not. *Biotechnol Lett*, 14(4), 251–256.
- Katayama, T., & Nagata, T. (1990). Inhibition of cell growth and stable DNA replication by overexpression of the bla gene of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *MGG*, 223(3), 353–360.
- Kerisit, S., Rosso, K. M., Dupuis, M., & Valiev, M. (2007). Molecular computational investigation of electron-transfer kinetics across cytochrome-iron oxide interfaces. *J. Phys. Chem. C*, 111, 30, 11363–11375.
- Khosravi, M., Ryan, W., Webster, D. A., & Stark, B. C. (1990). Variation of oxygen requirement with plasmid size in recombinant *Escherichia coli*. *Plasmid*, 23(2), 138–143.
- Kim, S., Malinverni, J. C., Sliz, P., Silhavy, T. J., Harrison, S. C., & Kahne, D. (2007). Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science*, 317(5840), 961–964.
- Koch, C., & Harnisch, F. (2016). Is there a specific ecological niche for electroactive microorganisms? *ChemElectroChem*, 3(9), 1282–1295.
- Sure, S., Ackland, M. L., Torriero, A. A. J., Adholeya, A. & Kochar, M. (2016). Microbial nanowires: an electrifying tale. *Microbiology*, 162(12), 2017-2028.
- Kolb, D. (2021). Gerichtete und ungerichtete Verfahren zur Steigerung der Methylenblaureduktionsrate von *Escherichia coli*. Master-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., & Hol, W. G. J. (2012). The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*, 10(5), 336–351.
- Kotloski, C. J., & Gralnick, N. J. (2013). Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio*, 4(1), 553–565.
- Kouzuma, A., Hashimoto, K., & Watanabe, K. (2012). Roles of siderophore in manganese-oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiol Lett*, 326(1), 91–98.
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., & Merchant, S. (1998). Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. *Mol Microbiol*, 29(2), 383–396.

- Kublik, A., Deobald, D., Hartwig, S., Schiffmann, C. L., Andrades, A., von Bergen, M., Sawers, R. G., & Adrian, L. (2016). Identification of a multi-protein reductive dehalogenase complex in *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1 suggests a protein-dependent respiratory electron transport chain obviating quinone involvement. *Environ Microbiol*, 18(9), 3044–3056.
- Kwon, O., & Meganathan, R. (2009). Biosynthesis of menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q). *EcoSal Plus*, 3(2).
- Lee, J., Tomasek, D., Santos, T. M., May, M. D., Meuskens, I., & Kahne, D. (2019). Formation of a β -barrel membrane protein is catalyzed by the interior surface of the assembly machine protein BamA. *ELife*, 8.
- Lee, J. H., Harvat, E. M., Stevens, J. M., Ferguson, S. J., & Saier, M. H. (2007). Evolutionary origins of members of a superfamily of integral membrane cytochrome *c* biogenesis proteins. *BBA Biomembranes*, 1768(9), 2164–2181.
- Lee, S. W., & Edlin, G. (1985). Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene*, 39(2–3), 173–180.
- Leys, D., Meyer, T. E., Tsapin, A. S., Neelson, K. H., Cusanovich, M. A., & Van Beeumen, J. J. (2002). Crystal structures at atomic resolution reveal the novel concept of “electron-harvesting” as a role for the small tetraheme cytochrome *c*. *J Biol Chem*, 277(38), 35703–35711.
- Li, J. X., Huang, Y. Y., Chen, X. R., Du, Q. S., Meng, J. Z., Xie, N. Z., & Huang, R. B. (2018). Enhanced production of optical (S)-acetoin by a recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst with NADH regeneration. *RSC Advances*, 8(53), 30512–30519.
- Li, F., Li, Y., Sun, L., Chen, X., An, X., Yin, C., Cao, Y., Wu, H., & Song, H. (2018 a). Modular engineering intracellular NADH regeneration boosts extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1. *ACS Synth Biol*, 7(3), 885–895.
- Li, F., Li, Y.-X., Cao, Y.-X., Wang, L., Liu, C.-G., Shi, L., & Song, H. (2018 b). Modular engineering to increase intracellular NAD(H⁺) promotes rate of extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis*. *Nat Commun*, 9, 3637
- Lies, D. P., Hernandez, M. E., Kappler, A., Mielke, R. E., Gralnick, J. A., & Newman, D. K. (2005). *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 71(8), 4414–4426.
- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T., Ajo-Franklin, C. M., & Portnoy, D. A. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 562(7725), 140–157.

- Lin-Chao, S., & Bremer, H. (1986). Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *MGG*, 203(1), 143–149.
- Lindeberg, M., Salmond, G. P. C., & Collmer, A. (1996). Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* out genes with *Erwinia carotovora* out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. *Mol Microbiol*, 20(1), 175–190.
- Liu, F., Xu, M., Chen, X., Yang, Y., Wang, H., & Sun, G. (2015). Novel strategy for tracking the microbial degradation of azo dyes with different polarities in living cells. *environ sci technol*, 49(19), 11356–11362.
- Liu, G., Yang, H., Wang, J., Jin, R., Zhou, J., & Lv, H. (2010). Enhanced chromate reduction by resting *Escherichia coli* cells in the presence of quinone redox mediators. *Bioresour Technol*, 101(21), 8127–8131.
- Liu, T., & Khosla, C. (2010). Genetic Engineering of *Escherichia coli* for Biofuel Production. *Annu Rev Genet*, 44(1), 53–69.
- Liu, Z., Jin, Y., Liu, W., Tao, Y., & Wang, G. (2018). Crystal structure of IspF from *Bacillus subtilis* and absence of protein complex assembly amongst IspD/IspE/IspF enzymes in the MEP pathway. *Biosci Rep*, 38(1).
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol*, 7(5), 375–381.
- Lovley, D. R., & Walker, D. J. F. (2019). *Geobacter* Protein Nanowires. *Front Microbiol*, 10, 2078.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. P. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol*, 54(6).
- Lu, W., Ye, L., Xu, H., Xie, W., Gu, J., & Yu, H. (2014). Enhanced production of coenzyme Q10 by self-regulating the engineered MEP pathway in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Bioeng*, 111(4), 761–769.
- Mahdinia, E., Demirci, A., & Berenjian, A. (2017). Production and application of menaquinone-7 (vitamin K2): a new perspective. *World J Microbiol Biotechnol*, 33(1), 1-7.
- Mandin, P., & Guillier, M. (2013). Expanding control in bacteria: Interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. *COMICR*, 16(2), 125–132.
- Marin, L. (2020). Charakterisierung des β -Fass-Proteins MtrB. PhD-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.

- Marritt, S. J., Lowe, T. G., Bye, J., Mcmillan, D. G. G., Shi, L., Fredrickson, J., Zachara, J., Richardson, D. J., Cheesman, M. R., Jeuken, L. J. C., & Butt, J. N. (2012). A functional description of CymA, an electron-transfer hub supporting anaerobic respiratory flexibility in *Shewanella*. *Biochem J*, 444(3), 465–474.
- Marritt, S. J., McMillan, D. G. G., Shi, L., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Richardson, D. J., Jeuken, L. J. C., & Butt, J. N. (2012). The roles of CymA in support of the respiratory flexibility of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem Soc Trans*, 40(6), 1217–1221.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *PNAS*, 105(10), 3968–3973.
- Martínez-Antonio, A., Janga, S. C., & Thieffry, D. (2008). Functional organisation of *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. *J Mol Biol*, 381(1), 238–247.
- Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H. M., Martínez-Batallar, G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O. T., Gosset, G., Encarnación, S., & Bolivar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: Carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microb Cell Fact*, 11(1), 1–21.
- Martins, F., Felgueiras, C., Smitkova, M., & Caetano, N. (2019). Analysis of fossil fuel energy consumption and environmental impacts in european countries. *Energies*, 12(6), 964.
- Maser, A., Peebo, K., Vilu, R., & Nahku, R. (2020). Amino acids are key substrates to *Escherichia coli* BW25113 for achieving high specific growth rate. *Res Microbiol*, 171(5–6), 185–193.
- McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N., & Jeuken, L. J. C. (2012). Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *J Biol Chem*, 287(17), 14215–14225.
- Meyer, T. E., Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., De Smet, L., Frishman, D., Nealon, K. H., Cusanovich, M. A., & Van Beeumen, J. J. (2004). Identification of 42 possible cytochrome *c* genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *OMICS*, 8(1), 57–77.
- Miguel, L., & Meganathan, R. (1991). electron donors and the quinone involved in dimethyl sulfoxide reduction in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 22, 109–115.
- Moon, C. P., Zaccai, N. R., Fleming, P. J., Gessmann, D., Fleming, K. G., & Jenkins, T. C. (2013). Membrane protein thermodynamic stability may serve as the energy sink for sorting in the periplasm. *PNAS*, 110(11), 4285–90.
- Mukhopadhyay, S., Audia, J. P., Roy, R. N., & Schellhorn, H. E. (2000). Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol Microbiol*, 37(2), 371–381.

- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1997). Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol*, 179(4), 1143–1152.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1997). Outer membrane cytochromes of *Shewanella putrefaciens* MR-1: Spectral analysis, and purification of the 83-KDa *c*-type cytochrome. *BBA - Biomembranes*, 1326(2), 307–318.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (2002). MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5585–5594.
- Myers, C. R., & Nealson, K. H. (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 240(4857), 1319-21.
- Myers, J. M., & Myers, C. R. (2001). Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Appl Environ Microbiol*, 67(1), 260–269.
- Myers, J. M., & Myers, C. R. (2000). Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J Bacteriol*, 182(1), 67–75.
- Myers, J. M., & Myers, C. R. (2002). Genetic complementation of an outer membrane cytochrome *omcB* mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 requires *omcB* plus downstream DNA. *Appl Environ Microbiol*, 68(6), 2781–2793.
- Nakashima, N., Akita, H., & Hoshino, T. (2014). Establishment of a novel gene expression method, BICES (biomass-inducible chromosome-based expression system), and its application to the production of 2,3-butanediol and acetoin. *Metab Eng*, 25, 204–214.
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms. *BBA - Biomembranes*, 1778(9), 1735–1756.
- Neal, A. L., Rosso, K. M., Geesey, G. G., Gorby, Y. A., & Little, B. J. (2003). Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochim Cosmochim Acta*, 67(23), 4489–4503.
- Nealson, K. H., & Saffarini, D. (1994). Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Annu Rev Microbiol*, 48(1), 311–343.
- Neto, S. E., de Melo-Diogo, D., Correia, I. J., Paquete, C. M., & Louro, R. O. (2017). Characterization of OmcA mutants from *Shewanella oneidensis* MR-1 to investigate the molecular mechanisms underpinning electron transfer across the microbe-electrode interface. *Fuel Cells*, 17(5), 601–611.

- Ni, D., Wang, Y., Yang, X., Zhou, H., Hou, X., Cao, B., Lu, Z., Zhao, X., Yang, K. & Huang, Y. (2014). Structural and functional analysis of the-barrel domain of BamA from *Escherichia coli*. *FASEB J*, 28(6), 2677-85.
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Balusek, C., Gumbart, J. C., & Buchanan, S. K. (2014). Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. *Structure*, 22(7), 1055–1062.
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Gumbart, J. C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N. C., Lithgow, T., & Buchanan, S. K. (2013). Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature*, 501(7467), 385–390.
- Nowicka, B., & Kruk, J. (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *BBA - Bioenergetics*, 1797(9), 1587–1605.
- Okamoto, A., Hashimoto, K., Nealson, K. H., & Nakamura, R. (2013). Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *PNAS*, 110(19), 7856–7861.
- Okamoto, A., Kalathil, S., Deng, X., Hashimoto, K., Nakamura, R., & Nealson, K. H. (2014 a). Cell-secreted flavins bound to membrane cytochromes dictate electron transfer reactions to surfaces with diverse charge and pH. *Sci Rep*, 4(1), 1–8.
- Okamoto, A., Nakamura, R., Nealson, K. H., & Hashimoto, K. (2014 b). Bound flavin model suggests similar electron-transfer mechanisms in *Shewanella* and *Geobacter*. *ChemElectroChem*, 1(11), 1808–1812.
- Olsen, L. R., Vetting, M. W., & Roderick, S. L. (2007). Structure of the *E. coli* bifunctional GlmU acetyltransferase active site with substrates and products. *Protein Sci*, 16(6), 1230–1235.
- Page, M. D., Pearce, D. A., Norris, H. A. C., & Ferguson, S. J. (1997). The *Paracoccus denitrificans* *cmaA*, *B* and *C* genes: Cloning and sequencing, and analysis of the potential of their products to form a haem or apo- *c*-type cytochrome transporter. *Microbiology*, 143(2), 563–576.
- Paramasivam, N., Habeck, M., & Linke, D. (2012). Is the C-terminal insertional signal in Gram-negative bacterial outer membrane proteins species-specific or not? *BMC Genomics*, 13(1), 510.
- Patel, G. J., Behrens-Kneip, S., Holst, O., & Kleinschmidt, J. H. (2009). The periplasmic chaperone Skp facilitates targeting, insertion, and folding of OmpA into lipid membranes with a negative membrane surface potential. *Biochemistry*, 48(43), 10235–10245.
- Pernestig, A. K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., & Melefors, Ö. (2003). The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol*, 185(3), 843–853.

- Philipp, L. A. (2017). Untersuchungen zur Etablierung und Charakterisierung einer extrazellulären Elektronentransportkette in *Escherichia coli*. Master-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Philipp, L. A., Edel, M., & Gescher, J. (2020). Genetic engineering for enhanced productivity in bioelectrochemical systems. *Adv Appl Microbiol*, 111, 1–31.
- Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., & Sens, P. (2009). Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*, 459(7245), 379–385.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Shi, L., Gorby, Y. A., Golbeck, J. H., & El-Naggar, M. Y. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *PNAS*, 111(35), 12883–12888.
- Pitts, K. E., Dobbin, P. S., Reyes-Ramirez, F., Thomson, A. J., Richardson, D. J., & Seward, H. E. (2003). Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: Expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *J Biol Chem*, 278(30), 27758–27765.
- Pogozheva, I. D., Tristram-Nagle, S., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2013). Structural adaptations of proteins to different biological membranes. *BBA - Biomembranes*, 1828(11), 2592–2608.
- Polglase, W. J., Pun, W. T., & Withaar, J. (1966). Lipoquinones of *Escherichia coli*. *BBA*, 118(2), 425–426.
- Prognos AG und Verband der chemischen Industrie eV (VCI) (2017). Die deutsche chemische Industrie 2030 - Update 2015/2016.
- Qian, Y., Paquete, C. M., Louro, R. O., Ross, D. E., LaBelle, E., Bond, D. R., & Tien, M. (2011). Mapping the iron binding site(s) on the small tetraheme cytochrome of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochemistry*, 50(28), 6217–6224.
- Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol*, 23, 291–298.
- Reguera, G., & Tuominen, M. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435, 1098–1101.
- Richard-Fogal, C. L., Frawley, E. R., & Kranz, R. G. (2008). Topology and function of CcmD in cytochrome *c* maturation. *J Bacteriol*, 190(10), 3489–3493.
- Richter, K. (2009). Synthetische Biologie am Beispiel der dissimilatorischen Eisenreduktion. Diploma-thesis Faculty of Biology, University of Freiburg.

- Richter, K., Bücking, C., Schicklberger, M., & Gescher, J. (2010). A simple and fast method to analyze the orientation of *c*-type cytochromes in the outer membrane of Gram-negative bacteria. *J Microbiol Methods*, 82(2), 184–186.
- Richter, K., Schicklberger, M., & Gescher, J. (2012). Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol*, 78(4), 913–921.
- Richter, K. (2014). Etablierung und Intensivierung von Mikroben-Anoden-Interaktionen in synthetischen und natürlichen exoelektrogenen Stämmen. PhD-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Riggs, P. (2001). Expression and purification of maltose-binding protein fusions. *Curr Protoc Molec Biol*, 16, 16.6.
- Rizzitello, A. E., Harper, J. R., & Silhavy, T. J. (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(23), 6794–6800.
- Robert, V., Volokhina, E. B., Senf, F., Bos, M. P., Van Gelder, P., & Tommassen, J. (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biology*, 4(11), 1984–1995.
- Robertson, D. E., Farid, R. S., Moser, C. C., Urbauer, J. L., Mulholland, S. E., Pidikiti, R., Leart, J. D., Wandt, A. J., Degrado, W. F., & Dutton, B. P. L. (1994). Design and synthesis of multi-haem proteins. *Nature*, 368, 425–432.
- Rollauer, S. E., Soorshjani, M. A., Noinaj, N., & Buchanan, S. K. (2015). Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1679).
- Romine, M. F., Carlson, T. S., Norbeck, A. D., McCue, L. A., & Lipton, M. S. (2008). Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome. *Appl Environ Microbiol*, 74(10), 3257–3265.
- Ross, D. E., Ruebush, S. S., Brantley, S. L., Hartshorne, R. S., Clarke, T. A., Richardson, D. J., & Tien, M. (2007). Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol*, 73(18), 5797–5808.
- Rouvière, P. E., & Gross, C. A. (1996). SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev*, 10(24), 3170–3182.
- Ryan, W., Parulekar, S. J., & Stark, B. C. (1989). Expression of β -lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes—effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng*, 34(3), 309–319.
- Salar-García, M. J., Gajda, I., Ortiz-Martínez, V. M., Greenman, J., Hanczyc, M. M., de los Ríos, A. P., & Ieropoulos, I. A. (2016). Microalgae as substrate in low cost terracotta-

- based microbial fuel cells: Novel application of the catholyte produced. *Bioresour Technol*, 209, 380–385.
- Sanders, C., Turkarslan, S., Lee, D. W., Onder, O., Kranz, R. G., & Daldal, F. (2008). The cytochrome *c* maturation components CcmF, CcmH, and CcmI form a membrane-integral multisubunit heme ligation complex. *J Biol Chem*, 283(44), 29715–29722.
- Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun*, 69(6), 3523–3535.
- Sato, T., Yamada, Y., Ohtani, Y., Mitsui, N., Murasawa, H., & Araki, S. (2001). Production of menaquinone (vitamin K₂)-7 by *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioeng* 91(1), 16–20.
- Sauvonnet, N., Gounon, P., & Pugsley, A. P. (2000). PpdD type IV pilin of *Escherichia coli* K-12 can be assembled into pili in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182(3), 848–854.
- Schaechter, M. (2001). *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the view from here. *MMBR*, 65(1), 119–130.
- Schäfer, U., Beck, K., & Müller, M. (1999). Skp, a molecular chaperone of Gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem*, 274(35), 24567–24574.
- Schicklberger, M., Sturm, G., & Gescher, J. (2013). Genomic Plasticity Enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol*, 79(4), 1150–1159.
- Schicklberger, M., Bücking, C., Schuetz, B., Heide, H., & Gescher, J. (2011). Involvement of the *Shewanella oneidensis* decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the β -barrel protein MtrB. *Appl Environ Microbiol*, 77(4), 1520–1523.
- Schlegel, S., Löfblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew, D., Slotboom, D. J., & De Gier, J. W. (2012). Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J Mol Biol*, 423(4), 648–659.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A. M., & Gescher, J. (2009). Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* Mr-1. *Appl Environ Microbiol*, 75(24), 7789–7796.
- Schulz, H., Fabianek, R. A., Pelliccioli, E. C., Hennecke, H., & Thöny-Meyer, L. (1999). Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *PNAS*, 96(11), 6462–6467.
- Schwalb, C., Chapman, S. K., & Reid, G. A. (2002). The role of membrane bound tetraheme CymA in the anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem. Soc. Trans*, 30(3), 75.

- Schwalb, C., Chapman, S. K., & Reid, G. A. (2002). The membrane-bound tetrahaem *c*-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*. *Biochem Soc Trans*, 30(4), 658–662.
- Schwalb, C., Chapman, S. K., & Reid, G. A. (2003). The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry*, 42(31), 9491–9497.
- Scott, J. H., & Nealson, K. H. (1994). A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol*, 176(11), 3408–3411.
- Seo, J. -H., & Bailey, J. E. (1985). Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 27(12), 1668–1674.
- Serres, M. H., & Riley, M. (2006). Genomic analysis of carbon source metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus experiments. *J Bacteriol*, 188(13), 4601–4609.
- Shafiee, S., & Topal, E. (2009). When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*, 37(1), 181–189.
- Sharma, P., Stagge, S., Bekker, M., Bettenbrock, K., & Hellingwerf, K. J. (2013). Kinase activity of ArcB from *Escherichia coli* is subject to regulation by both ubiquinone and demethylmenaquinone. *PLoS ONE*, 8(10).
- Shen-Orr, S. S., Milo, R., Mangan, S., & Alon, U. (2002). Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 31(1), 64–68.
- Shi, L., Chen, B., Wang, Z., Elias, D. A., Mayer, M. U., Gorby, Y. A., Ni, S., Lower, B. H., Kennedy, D. W., Wunschel, D. S., Mottaz, H. M., Marshall, M. J., Hill, E. A., Beliaev, A. S., Zachara, J. M., Fredrickson, J. K., & Squier, T. C. (2006). Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: Two outer membrane decaheme *c*-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol*, 188(13),
- Shi, L., Deng, S., Marshall, M. J., Wang, Z., Kennedy, D. W., Dohnalkova, A. C., Mottaz, H. M., Hill, E. A., Gorby, Y. A., Beliaev, A. S., Richardson, D. J., Zachara, J. M., & Fredrickson, J. K. (2008). Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. *J Bacteriol*, 190(15), 5512–5516.
- Shi, L., Rosso, K. M., Clarke, T. A., Richardson, D. J., Zachara, J. M., & Fredrickson, J. K. (2012). Molecular Underpinnings of Fe(III) Oxide Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol*, 3, 50.
- Shimada, T., Kori, A., & Ishihama, A. (2013). Involvement of the ribose operon repressor RbsR in regulation of purine nucleotide synthesis in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 344(2), 159–65.

- Shyu, J. B. H., Lies, D. P., & Newman, D. K. (2002). Protective role of *tolC* in efflux of the electron shuttle anthraquinone-2,6-disulfonate. *J Bacteriol*, 184(6), 1806–1810.
- Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2007). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 21(19), 2473–2484.
- Søballe, B., & Poole, R. K. (1999). Microbial ubiquinones: Multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology*, 145(8), 1817–1830.
- Spiess, C., Beil, A., & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), 339–347.
- Stephan, S. (2015) Untersuchung der Integration des MtrABC-Komplexes in die äußere Membran bei *Shewanella oneidensis* MR-1. PhD-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Stevens, J. M., Mavridou, D. A. I., Hamer, R., Kritsiligkou, P., Goddard, A. D., & Ferguson, S. J. (2011). Cytochrome *c* biogenesis System I. *FEBS J*, 278(22), 4170–4178.
- Storek, K. M., Auerbach, M. R., Shi, H., Garcia, N. K., Sun, D., Nickerson, N. N., Vij, R., Lin, Z., Chiang, N., Schneider, K., Wecksler, A. T., Skippington, E., Nakamura, G., Seshasayee, D., Koerber, J. T., Payandeh, J., Smith, P. A., & Rutherford, S. T. (2018). Monoclonal antibody targeting the β -barrel assembly machine of *Escherichia coli* is bactericidal. *PNAS*, 115(14), 3692–3697.
- Struyvé, M., Moons, M., & Tommassen, J. (1991). Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol*, 218(1), 141–148.
- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O., & Gescher, J. (2015). A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J*, 9(8), 1802–1811.
- Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., Kerzenmacher, S., & Gescher, J. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresour Technol*, 186, 89–96.
- Su, L., Fukushima, T., & Ajo-Franklin, C. M. (2020 a). A hybrid *cyt c* maturation system enhances the bioelectrical performance of engineered *Escherichia coli* by improving the rate-limiting step. *Biosens Bioelectron*, 165, 112312.
- Su, L., Fukushima, T., Prior, A., Baruch, M., Zajdel, T. J., & Ajo-Franklin, C. M. (2020 b). Modifying cytochrome *c* maturation can increase the bioelectronic performance of engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 9(1), 115–124.
- TerAvest, M. A., & Ajo-Franklin, C. M. (2016). Transforming exoelectrogens for biotechnology using synthetic biology. *Biotechnol Bioeng*, 113(4), 687–697.

- TerAvest, M. A., Zajdel, T. J., & Ajo-Franklin, C. M. (2014). The Mtr pathway of *Shewanella oneidensis* MR-1 couples substrate utilization to current production in *Escherichia coli*. *ChemElectroChem*, 1(11), 1701–1701.
- The UniProt Consortium (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*, 49(1), 480–489.
- Thöny-Meyer, L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *MMBR*, 61(3).
- Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Kunzler, P., Ritz, D., & Hennecke, H. (1995). *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J Bacteriol*, 177(15), 4321–4326.
- Tikhonova, T. V., & Popov, V. O. (2014). Structural and functional studies of multiheme cytochromes *c* involved in extracellular electron transport in bacterial dissimilatory metal reduction. *Biochemistry*, 79(13), 1584–1601.
- Tomasek, D., Rawson, S., Lee, J., Wzorek, J. S., Harrison, S. C., Li, Z., & Kahne, D. (2020). Structure of a nascent membrane protein as it folds on the BAM complex. *Nature*, 583.
- Tomenius, H., Pernestig, A. K., Méndez-Catalá, C. F., Georgellis, D., Normark, S., & Melefors, Ö. (2005). Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: Point mutations in the HAMP linker of the *barA* sensor give a dominant-negative phenotype. *J Bacteriol*, 187(21), 7317–7324.
- Tsang, M. J., Yakhnina, A. A., & Bernhardt, T. G. (2017). NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*, 13(7).
- Tuite, E. M., & Kelly, J. M. (1993). New trends in photobiology. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B*, 21(2–3), 103–124.
- Turkarslan, S., Sanders, C., Ekici, S., & Daldal, F. (2008). Compensatory thio-redox interactions between DsbA, CcdA and CcmG unveil the apocytochrome *c* holdase role of CcmG during cytochrome *c* maturation. *Mol Microbiol*, 70(3), 652–666.
- Uehara, T., Parzych, K. R., Dinh, T., & Bernhardt, T. G. (2010). Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J*, 29(8), 1412–1422.
- Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J., & Six, S. (1994). Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. *AvL*, 66(1–3), 3–22.
- Unden, G., & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *BBA - Bioenergetics*, 1320(3), 217–234.
- Unden, G. (1988). Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their *fnr*-independent expression. *Arch Microbiol*, 150.

- Usacheva, M. N., Teichert, M. C., & Biel, M. A. (2001). Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*, 29(2), 165–173.
- Velasquez-Orta, S. B., Head, I. M., Curtis, T. P., Scott, K., Lloyd, J. R., & Von Canstein, H. (2010). The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(5), 1373–81.
- Vellingiri, A., Song, Y. E., Munussami, G., Kim, C., Park, C., Jeon, B.-H., Lee, S.-G., & Kim, J. R. (2019). Overexpression of *c*-type cytochrome, *CymA* in *Shewanella oneidensis* MR-1 for enhanced bioelectricity generation and cell growth in a microbial fuel cell. *J Chem Technol Biotechnol*, 94(7), 2115–2122.
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., Ringelberg, D. B., White, D. C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E., & Nealson, K. H. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 49(2), 705–724.
- Verissimo, A. F., & Daldal, F. (2014). Cytochrome *c* biogenesis system I: An intricate process catalyzed by a maturase supercomplex? *BBA - Bioenergetics*, 1837(7), 989–998.
- Verissimo, A. F., Yang, H., Wu, X., Sanders, C., & Daldal, F. (2011). CcmI subunit of CcmFHI heme ligation complex functions as an apocytochrome *c* chaperone during *c*-type cytochrome maturation. *J Biol Chem*, 286(47), 40452–40463.
- Verissimo, A. F., Khalfaoui-Hassani, B., Hwang, J., Steimle, S., Selamoglu, N., Sanders, C., Khatchikian, C. E., & Daldal, F. (2017). The thioreduction component CcmG confers efficiency and the heme ligation component CcmH ensures stereo-specificity during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem*, 292, 13154–13167.
- Wagegg, W., & Braun, V. (1981). Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein FecA. *J Bacteriol*, 145(1), 156–163.
- Wagner, S., Baarst, L., Ytterberg, A. J., Klussmerer, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P. Å., Van Wijk, K. J., & De Gier, J. W. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteom*, 6(9), 1527–1550.
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., Van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O., & De Gier, J. W. (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *PNAS*, 105(38), 14371–14376.
- Wallace, B. J., & Young, I. G. (1977). Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA- menA-* double quinone mutant. *BBA - Bioenergetics*, 461(1), 84–100.
- Werpy, T. A., Holladay, J. E. und White, J. F. (2004). Top value added chemicals from biomass: I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. PNNL-14808. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA (US).

- White, G. F., Shi, Z., Shi, L., Wang, Z., Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Butt, J. N., Richardson, D. J., & Clarke, T. A. (2013). Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals. *PNAS*, 110(16), 6346–6351.
- Wilding, E. I., Brown, J. R., Bryant, A. P., Chalker, A. F., Holmes, D. J., Ingraham, K. A., Iordanescu, S., So, C. Y., Rosenberg, M., & Gwynn, M. N. (2000). Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in Gram-positive cocci. *J Bacteriol*, 182(15), 4319–4327.
- Windhorst, C. (2016). Etablierung extrazellulärer Atmungsvorgänge in *Escherichia coli*. Master-Thesis, Institute of Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology.
- Wissenbach, U., Kröger, A., & Uden, G. (1990). The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 154.
- Wood, T. K., & Peretti, S. W. (1991). Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 38(4), 397–412.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J., & Kahne, D. (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, 121(2), 235–245.
- Xiao, X., Ma, X. L., Wang, L. G., Long, F., Li, T. T., Zhou, X. T., Liu, H., Wu, L. J., & Yu, H. Q. (2021). Anaerobic reduction of high-polarity nitroaromatic compounds by electrochemically active bacteria: Roles of Mtr respiratory pathway, molecular polarity, mediator and membrane permeability. *Environ Pollut*, 268, 115943.
- Xu, Q., Xie, L., Li, Y., Lin, H., Sun, S., Guan, X., Hu, K., Shen, Y., & Zhang, L. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (R)-acetoin. *J Chem Technol. Biotechnol*, 90(1), 93–100.
- Xu, S., Jangir, Y., & El-Naggar, M. Y. (2016). Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electrochim Acta*, 198, 49–55.
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., & Yang, S. T. (2017). Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects. *Crit Rev Biotechnol*, 37(8), 990–1005.
- Yong, X. Y., Feng, J., Chen, Y. L., Shi, D. Y., Xu, Y. S., Zhou, J., Wang, S. Y., Xu, L., Yong, Y. C., Sun, Y. M., Shi, C. L., OuYang, P. K., & Zheng, T. (2014). Enhancement of bioelectricity generation by cofactor manipulation in microbial fuel cell. *Biosens Bioelectro*, 56, 19–25.
- Zhang, X., Zhang, R., Bao, T., Rao, Z., Yang, T., Xu, M., Xu, Z., Li, H., & Yang, S. (2014). The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of

acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 23, 34–41.

Zhang, X., Tervo, C. J., & Reed, J. L. (2016). Metabolic assessment of *E. coli* as a biofactory for commercial products. *Metab Eng*, 35, 64–74.

VI. Danksagung

Lieber Johannes, ich danke dir von ganzem Herzen für dein Vertrauen, deine Ideen, deine Unterstützung und für deinen grenzenlosen Optimismus, der mich während des Studiums für die Mikrobiologie begeistert hat, und der mich während der ein oder anderen schweren Phase der Promotion daran erinnert hat, warum ich so gerne hier bin, und dass ich kann, was ich tue. Du hast mir geholfen nicht nur als Wissenschaftlerin, sondern auch als Mensch über mich hinauszuwachsen, dafür bin ich dir sehr dankbar.

Liebe AG Gescher, ich kann mir nicht vorstellen, irgendwo auf der Welt in einer schöneren Atmosphäre arbeiten zu können! Es macht so viel Spaß, ein Teil dieses kompetenten, lustigen, chaotischen und hilfsbereiten Haufens zu sein, dass ich, egal zu welcher Tages- und Nachtzeit, gerne ins Labor gekommen bin. Okayokay, das ist natürlich nicht ganz die Wahrheit, aber es ist dank und mit euch sogar eine Freude gewesen, ab und an ein bisschen zu motzen und zu jammern, und das will wirklich etwas heißen. Ein besonders großer Dank gilt den „Gemüsefrauen“ für die schönen Mittagspausen. Danke Miri dafür, dass du den ganzen weiten Weg vom ersten Tag des Studiums mit mir gegangen bist und wir uns immer noch sehr gerne mögen. Liebe Edi, ich bin so froh dich zu haben! Danke für Urlaube und Busausflüge, Pétanque und Rosé, drei ??? und Kraftwerk, Pizza und Snäcks und bald für das Zimmer. Danke vor allem dafür, dass du mich mit deiner Tiefenentspantheit immer beruhigen konntest, wenn Ergebnisse nicht ganz so waren wie erhofft oder ich mal auf der anderen Straßenseite nach Hause laufen musste. Lieber Sebastian, dich als Mitstreiter zu haben ist als hätte man FeSaZus dabei – es ist von allem das Beste verpresst – und deshalb danke ich dir nicht nur für deine unendliche Geduld bei allen fachlichen Problemen (wie z. B. Gravitation), deine aufopferungsvolle Korrektur und die Endlosdiskussionen über Probleme unseres Elektriker:innen Daseins, sondern auch für deine Freundschaft und dein immer offenes Ohr. Danke Jonas für die Lösung aller Computerprobleme, auch wenn sie aufgrund von Update-Verweigerung selbstverschuldet waren und mit der gesamten Palette an Kraftausdrücken einhergingen. Danke auch für die Hilfe bei allen bioinformatischen Problemen und das Lösen von Knoten in meinem Kopf, wenn ich versucht habe, Standardfehler vom Standardfehler vom Standardfehler zu berechnen. Lieber Tobi, es war so schön, dein kluges und lustiges Köpfchen neben mir im Büro zu wissen.

Herzlich danken möchte ich auch den Bachelor- und Masterstudierenden, Daniela Domeradzki, Maximilian Klein, Cosima Timpe und David Kolb, die mit mir zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Simon, Sascha Hein und Dennis Wilken danke ich für die Möglichkeit und die Durchführung der Chinon-Bestimmung an der TU Darmstadt.

Herzlich danken möchte ich außerdem Frau Prof. Dr. Lang für die hilf- und lehrreiche Mentoring-Partnerschaft über die letzten Jahre. Vielen Dank für Ihr Interesse und ihre Unterstützung.

Dankedanke liebe WSC131, es war so schön mit euch! Danke, Magda, Jaya, Elisa, Fine und Nora, dass ihr mich aufgefangen habt, egal mit welcher Laune ich aus dem Labor kam. Ich hätte mir die letzten Jahre in keiner schöneren Umgebung vorstellen können. Danke für die extragroßen Portionen, die ihr für mich mitgekocht habt, danke für Kaffeerunden im Bett, lachen in der Küche, fürs Arbeiten an einer Alternativkarriere als Rapstars und all die unendlich vielen anderen schönen Momente. Ihr werdet mir schrecklich fehlen, ich hoffe wir landen irgendwann wieder in derselben Stadt!

Liebe Mama, lieber Papa, ich danke euch so sehr für eure Unterstützung und, dass ihr immer bedingungslos da wart, wenn ich euch gebraucht habe! Liebe Amelie, liebe Brigit, liebe Leonie und Flori, ich bin so froh, dass es euch gibt, vielen Dank für die moralische Unterstützung und euer Verständnis, danke für alles!