

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Entwicklung eines Systems zur Expression von membranständigen Dehydrogenasen aus einem Metagenom von Essigsäurebakterien in *Gluconobacter oxydans*

Björn Peters

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Ingrid Kögel-Knabner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
3. Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 19.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.10.2013 angenommen.

für Tine

Parts of this thesis are published in international papers:

Peters B, Junker A, Brauer K, Mühlthaler B, Kostner D, Mientus M, Liebl W, Ehrenreich A (2013) **Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans***. Applied Microbiology and Biotechnology 2013 Mar; 97(6):2521-30. Epub 2012 Sep 1. (contribution: paper writing, verification of deletion system, execution and evaluation of growth experiments)

Peters B, Mientus M, Kostner D, Junker A, Liebl W, Ehrenreich A (2013) **Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multi-deletion strains**. Applied Microbiology and Biotechnology 2013 Mar 22. [Epub ahead of print] (contribution: paper writing, planning, developing of methods, execution and evaluation of all experiments)

Peters B, Mientus M, Kostner D, Liebl W, Ehrenreich A (2013) **Expression of membrane bound dehydrogenases from a metagenome of acetic acid bacteria in *Gluconobacter oxydans***. In preparation (contribution: paper writing, planning, developing of *in silico* methods, execution and evaluation of assays)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Stoffwechsel von <i>G. oxydans</i>	2
1.1.1. Zentralstoffwechsel	3
1.1.2. Acetatstoffwechsel	3
1.1.3. Membranständige Dehydrogenasen	5
1.2. Metagenom von Essigsäurebakterien	8
1.2.1. Prinzipielle Analyse von Metagenomen	9
1.2.2. Eine Essigmutter als Quelle für ein Metagenom	10
1.2.3. <i>Gluconobacter oxydans</i> als Expressionsstamm	11
1.3. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	15
2.1. Molekularbiologische Arbeitsmethoden	15
2.1.1. Chemikalien	15
2.1.2. Isolation von DNA	15
2.1.2.1. Isolation von genomischer DNA aus <i>G. oxydans</i>	15
2.1.2.2. Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	16
2.1.3. DNA-Analytik	16
2.1.3.1. DNA-Konzentrationsbestimmung	16
2.1.3.2. Analytische Agarosegelelektrophorese	17
2.1.3.3. Präparative Agarosegelelektrophorese	17
2.1.3.4. DNA-DNA Hybridisierung mittels Southern Blot	18
2.1.3.5. DNA – Sequenzierung	21
2.1.4. Enzymatische Modifikationen von DNA	21
2.1.4.1. Restriktionsverdau	21
2.1.4.2. Alkalischer Phosphatase Verdau	22
2.1.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten	22
2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.1.5.1. Konstruierende PCR	23
2.1.5.2. Kolonie-PCR	24
2.1.5.3. Long Flanking Homology (LFH)-PCR	25
2.2. Mikrobiologische Arbeitsmethoden	26
2.2.1. Organismen und Plasmide	26

2.2.2. Nährmedien	30
2.2.2.1. Nährmedium für <i>G. oxydans</i>	30
2.2.2.2. Luria-Bertani Medium für <i>E. coli</i>	30
2.2.2.3. Medienzusätze	30
2.2.3. Zellanzucht	31
2.2.3.1. Zellanzucht von <i>G. oxydans</i>	31
2.2.3.2. Zellanzucht von <i>E. coli</i>	31
2.2.4. Stammhaltung und Reinheitskontrollen	31
2.2.5. Bestimmung der optischen Dichte	32
2.2.6. Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	32
2.2.6.1. Vorbereitung von <i>E. coli</i> Zellen für das Hitzeschockverfahren	32
2.2.6.2. Transformation mittels Hitzeschock	32
2.2.7. Konjugation	33
2.2.8. Deletion von Genen in <i>G. oxydans</i> mittels homologer Rekombination	34
2.2.9. Integration von Genen mittels homologer Rekombination	36
2.2.10. Wachstumsexperimente	37
2.2.10.1. Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	37
2.2.10.2. Wachstumskurven	38
2.3. Analytik	38
2.3.1. Enzymatische Metabolitkonzentrationsbestimmung	38
2.3.2. HPLC-Analytik	38
2.3.3. Enzymtest zur Messung der Aktivität membranständiger Dehydrogenasen mittels Aufreinigung der Membranfraktion	39
2.3.3.1. Präparation der Membranfraktion von <i>G. oxydans</i>	39
2.3.3.2. Aktivitätsmessung von Membranfraktionen mittels DCPIP-PMS- Reduktionsverfolgung	40
2.3.4. Test zur Messung der Aktivität membranständiger Dehydrogenasen in ganzen Zellen	40
2.3.4.1. Vorbereitung der Zellen	41
2.3.4.2. Messung der DCPIP-PMS Reduktion an ganzen Zellen	41
2.4. Arbeitsmethoden zur Metagenombankerstellung	41
2.4.1. Kultivierung einer Essigmutter	41
2.4.2. Isolation von DNA aus einer Essigmutter	42
2.4.3. Bestimmung der Diversität	42
2.4.4. Erstellung und Sequenzierung der Metagenombank	43
2.4.5. Expression von membranständigen Dehydrogenasen	44

2.5. <i>in silico</i> -Techniken	45
2.5.1. BLAST	46
2.5.2. Pfam-Scan	46
2.5.3. PSORTb	46
3. Ergebnisse.....	47
3.1. Deletion aller membranständiger Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> 621H	47
3.1.1. Deletion der Alkohol-Dehydrogenase	47
3.1.2. Deletion der Inositol-Dehydrogenase	49
3.1.3. Deletion der Aldehyd-Dehydrogenase.....	50
3.1.4. Deletion der Sorbitol-Dehydrogenase.....	50
3.1.5. Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase	51
3.1.6. Deletion der Glucose-Dehydrogenase	52
3.1.7. Deletion der Polyol-Dehydrogenase	53
3.1.8. Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 2	55
3.1.9. Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 3	57
3.1.10. Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 4	58
3.1.11. Deletion der membranständigen D-Lactat-Dehydrogenase.....	59
3.1.12. Deletionen putativer membranständiger L-Lactat-Dehydrogenase	60
3.1.13. Suche nach weiteren membranständigen Dehydrogenasen	62
3.2. Physiologische Untersuchungen der Deletionsmutanten	63
3.2.1. Wachstumsexperimente auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	64
3.2.1.1. Wachstumsverhalten auf Fructose.....	65
3.2.1.2. Wachstumsverhalten auf Mannitol.....	67
3.2.1.3. Wachstumsverhalten auf Glucose.....	68
3.2.1.4. Vergleich der erzeugten Metabolite.....	69
3.2.2. Oxidationsvermögen der einzelnen Deletionsmutanten	70
3.2.2.1. Etablierung eines Ganzzell-DCPIP-Assay.....	71
3.2.2.2. Substratscreening mit dem Ganzzell-DCPIP-Assay.....	72
3.2.2.3. Vergleich mit einem klassischen DCPIP-Assay	83
3.3. Integration von membranständigen Dehydrogenasen in das Chromosom von <i>G. oxydans</i>	84
3.3.1. Erstellung der Integrationmutanten.....	84
3.3.1.1. Integration der Alkohol-Dehydrogenase	85
3.3.1.2. Integration der Polyol-Dehydrogenase an die Stelle der Alkohol-Dehydrogenase	85
3.3.2. Physiologie der Integrationsmutanten.....	86

3.3.2.1. Physiologie der Reintegrationsmutante <i>G. oxydans</i> BP.9:ADH.....	86
3.3.2.2. Physiologie der Integrationsmutante <i>G. oxydans</i> BP.8.1 $\Delta madh::sldAB$	87
3.4. Das Metagenom einer Essigmutter	88
3.4.1. Kultivierung einer Essigmutter und Isolation der DNA	88
3.4.2. Untersuchung der Diversität	91
3.4.3. Etablierung einer <i>in silico</i> Screeningmethode für membranständige Dehydrogenasen	94
3.5. Expression metagenomischer Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i>	100
3.5.1. Erstellung der Expressionsplasmide	100
3.5.2. Substratscreening mit Ganzzell-DCPIP-Assays	100
3.5.2.1. Oxidationsaktivität von mmGDH.....	101
3.5.2.2. Oxidationsaktivität von mPQQ4.....	102
3.5.2.3. Oxidationsaktivität von msldAB	102
3.5.2.4. Oxidationsaktivität von mmADH.....	103
3.5.2.5. Oxidationsaktivität von mmAcDH.....	105
3.5.2.6. Oxidationsaktivität von mmDLDH	106
3.6. Untersuchung des Acetatstoffwechsels in <i>G. oxydans</i>	106
3.6.1. Erstellung der Deletionsmutanten.....	106
3.6.1.1. Deletion der Pyruvat-Decarboxylase.....	106
3.6.1.2. Deletion der cytoplasmatischen Acetaldehyd-Dehydrogenasen GOX1122 und GOX2018.....	107
3.6.1.3. Deletion der Acetyl-CoA-Synthetase	108
3.6.2. Physiologie der Deletionsmutanten	109
3.6.2.1. Wachstumsexperimente.....	109
3.6.2.2. Vergleich der Metabolite	110
4. Diskussion	113
4.1. Membranständige Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> 621H.....	113
4.1.1. Wachstumsverhalten der Deletionsstämme	113
4.1.2. Substratspektren membranständiger Dehydrogenasen	115
4.2. Membranständige Dehydrogenasen aus einem Metagenom.....	124
4.2.1. Diversität eines Essigmuttermetagenoms	124
4.2.2. Substratspektren der metagenomischen Dehydrogenasen.....	125
4.3. Acetatstoffwechsel von <i>G. oxydans</i> 621H	134
5. Zusammenfassung	139
6. Literaturverzeichnis	141

7. Anhang	149
8. Danksagung	179
9. Lebenslauf	181

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
c	centi- (10^{-2})
°C	Grad Celsius
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und weitere (<i>et alii</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m s}^{-2}$ (bei Zentrifugen)
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
k	Kilo (10^3)
L	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli- (10^{-3})
M	Molar (mol L^{-1})
μ	Mikro- (10^{-6})
MCS	Multiklonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute
min^{-1}	Umdrehungen pro Minute
n	Nano- (10^{-9})
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration
PMS	Phenazinmethosulfat
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SldA	große Untereinheit der Polyol-Dehydrogenase
SldB	kleine Untereinheit der Polyol-Dehydrogenase
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Nukleotidbasen

A	Purinbase Adenin
C	Pyrimidinbase Cytosin
G	Purinbase Guanin
T	Pyrimidinbase Thymidin

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1. Einleitung

Essigsäurebakterien, insbesondere *Gluconobacter oxydans*, sind dafür bekannt, Kohlenhydrate, Alkohole und andere organische Verbindungen unvollständig zu oxidieren. Aus diesem Grund finden Essigsäurebakterien eine vielfältige Anwendung in biotechnologischen Prozessen (Gupta *et al.* 2001). Die Familie der Essigsäurebakterien, die *Acetobacteraceae*, hat ihren Namen der Essigproduktion zu verdanken, bei der der Ethanol eines alkoholischen Lebensmittels zu Essigsäure oxidiert und dieses so zu Essig fermentiert wird (Pasteur 1864). Essigsäurebakterien sind obligat aerobe, Gram-negative Stäbchen und gehören zur Ordnung der *Rhodospirillales*, die wiederum der Klasse der α -Proteobakterien im Phylum der Proteobakterien untergeordnet sind (Madigan *et al.* 2006). Essigsäurebakterien lassen sich in zwei verschiedene Gruppen einteilen. Die erste Gruppe, die Gattungen *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter* und *Kozakia*, die sogenannten Peroxidierer, kann Acetat und Lactat oxidativ über den Citrat- bzw. Glyoxylatzyklus komplett zu CO₂ abbauen (Leisinger 1965; Chinnawirotpisan *et al.* 2003). Die zweite Gruppe, der Genus *Gluconobacter*, hat keinen vollständigen Citratzyklus, da ihm die Succinat-Dehydrogenase fehlt (Greenfield und Claus 1972; Prust *et al.* 2005). Aus diesem Grund kann er Kohlenstoffquellen nicht komplett zu CO₂ oxidieren und zählt somit zu den Suboxidierern, bei denen die Oxidation der Kohlenstoffquellen mit dem Metabolit Acetat endet. Der Genus *Gluconobacter* lässt sich in fünf Spezies untergliedern: *G. frateurii*, *G. cerinus*, *G. albidus*, *G. thailandicus* und *G. oxydans* (Yamada *et al.* 1999; Euzéby 2005). Da besonders Stämme von *G. oxydans* eine hohe Oxidationsleistung bei wenig Biomassebildung zeigen (Olijve und Kok 1979), sind die Voraussetzungen für eine biotechnologische Anwendung von *G. oxydans* ideal (Deppenmeier *et al.* 2002).

So wird z.B. freie Gluconsäure aus Glucose mit *G. oxydans* hergestellt (Velizarov und Beschkov 1994). Dieser Fermentationsprozess wird auch in der Produktion nicht-

alkoholischer Getränke verwendet (Leipold und Peter 1994). *G. oxydans* ist ebenfalls in der Lage, D-Sorbitol zu L-Sorbose zu oxidieren (Trifonov *et al.* 1991), ein essentieller Schritt in der Reichstein-Synthese zur Herstellung von Vitamin C (Reichstein und Grüssner 1934). Eine weitere wichtige Anwendung ist die Produktion von Dihydroxyaceton aus Glycerin, die und deren Verbesserung in diversen Abhandlungen beschrieben werden (Bories *et al.* 1991; Hekmat *et al.* 2003). Eine pharmazeutisch relevante Anwendung ist die Oxidation von 1-(2-Hydroxyethyl)-amino-1-deoxy-D-sorbitol zu 6-(2-Hydroxyethyl)-amino-6-deoxy-L-sorbose, einer Vorstufe für das Antidiabetikum Miglitol (Schedel 2000; Landis *et al.* 2002).

Die natürlichen Habitate von *G. oxydans* sind, wie für alle *Gluconobacter* Spezies, nicht alkoholreiche Umgebungen wie bei anderen Essigsäurebakterien, sondern zuckerreiche wie Früchte, Blüten oder Honigbienen (De Ley *et al.* 1984). Neben diesen natürlichen Vorkommen gilt er auch als Verderber von zuckerhaltigen Getränken wie Wein, Bier oder Cider (Battey und Schaffner 2001). *G. oxydans*-Zellen kommen meistens einzellig oder in Zellpaaren vor und sind durch polare Flagellen schwach beweglich. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 25 - 30 °C und der optimale pH bei 5,5 - 6,0 (De Ley *et al.* 1984). *G. oxydans* kann allerdings auch bei pH 3 wachsen und ist sehr osmotolerant (Olijve und Kok 1979). Auch wenn *Gluconobacter sp.* allgemein als nicht-pathogen gelten, wurden manche Spezies als ungewöhnliche opportunistische Keime aus Kleinkindern isoliert, die an Mukoviszidose leiden (Alauzet *et al.* 2010).

1.1. Stoffwechsel von *G. oxydans*

Um *G. oxydans* optimal biotechnologisch nutzen zu können, ist ein fundiertes Wissen über seinen Stoffwechsel erforderlich. Dieser Stoffwechsel ist durch den Nährstoffüberfluss der natürlichen Habitate von *G. oxydans* geprägt.

1.1.1. Zentralstoffwechsel

G. oxydans kann Kohlenstoffquellen auf Grund des unvollständigen Citratzyklus nur bis zum Acetat oxidieren (Greenfield und Claus 1972). Auch wurde bei der Annotation des Genoms kein Gen, das für eine Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase oder ein anderes Phosphoenolpyruvat-synthetisierendes Enzym codiert, gefunden, welche eine Gluconeogenese ermöglichen würden (Prust *et al.* 2005). Ein Wachstum auf Acetat oder Lactat ist somit ausgeschlossen (De Ley *et al.* 1984). Auch der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg ist unvollständig, da ein Schlüsselenzym, die 6-Phosphofructokinase, fehlt (Prust *et al.* 2005). Aus diesem Grund sind nur der Entner-Doudoroff-Weg und der Pentose-Phosphat-Weg als mögliche Abbauewege für Kohlenstoffquellen in *G. oxydans* vorhanden. Diese Abbauewege generieren aber im Gegensatz zum Embden-Meyerhof-Parnas-Weg statt zwei nur ein Molekül ATP pro Molekül Glucose (Kitos *et al.* 1958; Kersters und Ley 1968). Dadurch verliert *G. oxydans* in diesem Schritt die Hälfte der Energie, die ein Abbau von Glucose zu Pyruvat bringen könnte. Es wurde auch gezeigt, dass sich der Pentose-Phosphat- und der Entner-Doudoroff-Weg auf Komplexmedium gegenseitig kompensieren können, falls einer von ihnen ausgeschaltet wurde. Der Pentose-Phosphat-Weg ist allerdings der primäre Abbaueweg für Kohlenstoffquellen in *G. oxydans*, da seine Deletion das Wachstum stark verringert (Richhardt *et al.* 2012). In Abbildung 1 sind alle wichtigen Zentralstoffwechselwege in *G. oxydans* 621H dargestellt.

1.1.2. Acetatstoffwechsel

Neben dem Zentralstoffwechsel ist der Acetatstoffwechsel in *G. oxydans* sehr interessant. *G. oxydans* besitzt eine Pyruvat-Decarboxylase (PDC) (King und Cheldelin 1954; Prust *et al.* 2005), ein Enzym das normalerweise in Pilzen und Pflanzen, aber nur selten in Bakterien vorkommt (König 1998). Falls dieses Enzym in den Bakterien vorkommt, wie es bei *Sarcina ventriculi* und *Zymomonas mobilis* der Fall ist, ist es normalerweise ein Bestandteil der Ethanolfermentation (Neale *et al.* 1987; Lowe und Zeikus 1992).

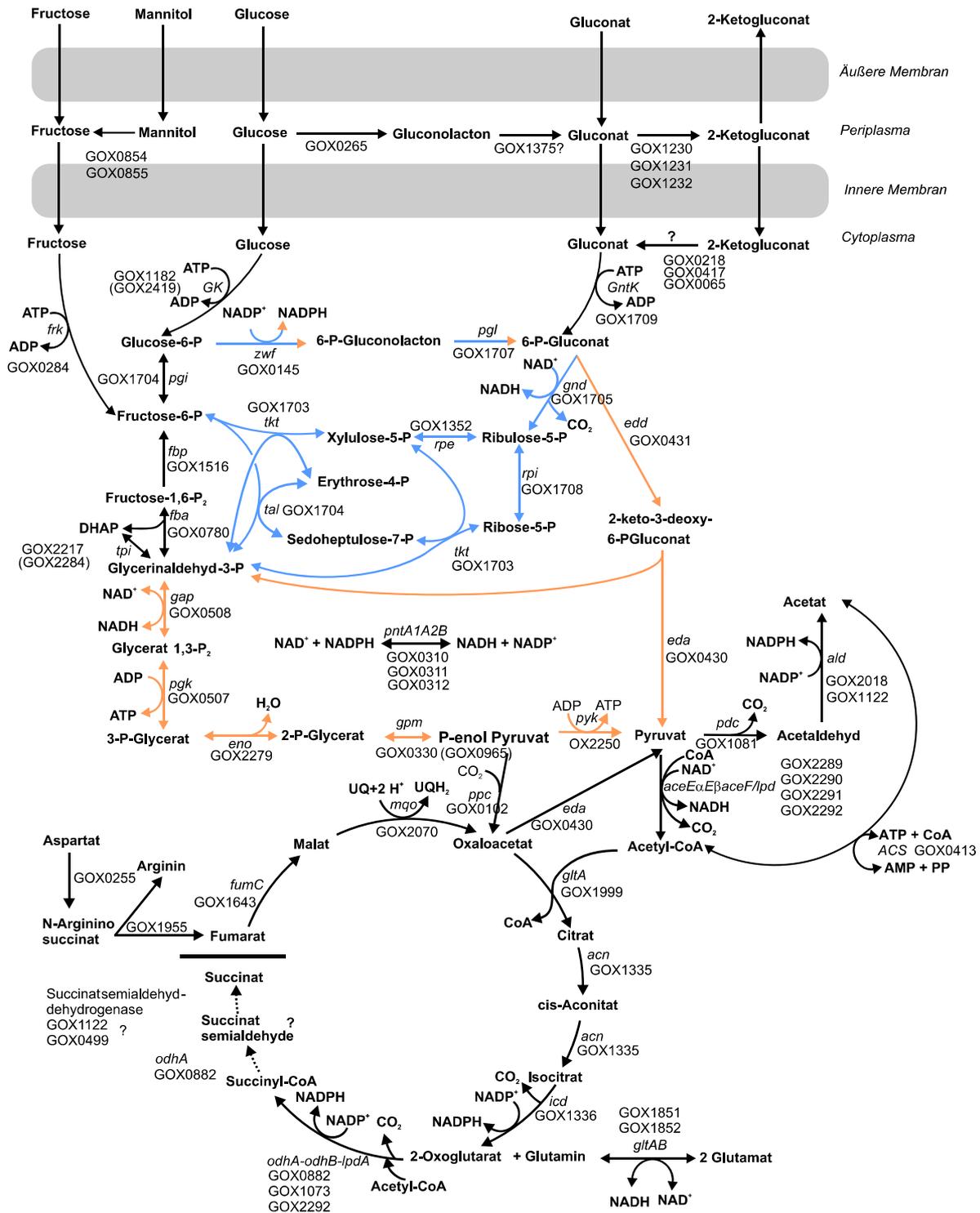


Abbildung 1: Zentralstoffwechsel von *G. oxydans* 621H modifiziert nach Richhardt *et al.* (2012) mit möglichem Acetyl-CoA-Synthetase Reaktionsweg. Der Citratzyklus ist an der Stelle der Succinat-Dehydrogenase unterbrochen. Entner-Doudoroff-Weg (orange), Pentose-Phosphat-Weg (blau). Gemeinsame Enzymreaktionen (blauer Pfeil mit oranger Spitze). P entspricht einer Phosphatgruppe.

Da *G. oxydans* obligat aerob ist und kein Ethanol bildet, ist die Funktion der PDC hier nicht bewiesen. Es wird angenommen, dass sie eine ähnliche Funktion im oxidativen Milchsäure-Metabolismus hat, wie die PDC bei *Acetobacter pasteurianus* (Chandra Raj *et al.* 2001) und

außerdem der Decarboxylierung von Pyruvat auf dem Weg zum Acetat dient. Auch ist nicht geklärt, ob eventuell andere Enzyme oder membranständige Dehydrogenasen eine Rolle in der Acetatproduktion spielen.

1.1.3. Membranständige Dehydrogenasen

Das auffälligste Merkmal von *G. oxydans* ist seine Vielzahl an Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen. So wurden alleine 75 putative Gene für Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen im Genom gefunden (Prust *et al.* 2005). Die Dehydrogenasen mit dem höchsten und schnellsten Oxidationspotential bilden die membranständigen Enzyme. Membranständige Dehydrogenasen sind im Periplasma zu finden und meist komplett, oder durch eine Untereinheit, in der cytoplasmatischen Membran verankert. Dadurch müssen die Substrate der Dehydrogenasen nicht erst in das Cytoplasma transportiert werden, sondern können schnell ins Periplasma ein- oder wieder ausgeschleust werden (Matsushita *et al.* 1994). Dies ermöglicht *G. oxydans* eine schnelle Oxidation seiner Substrate. Die membranständigen Dehydrogenasen liefern Elektronen, die in die Atmungskette eingespeist werden. Sie transferieren Elektronen zu Ubiquinon, welches dann als Elektronendonator für zwei Quinoloxidasen vom Typ *bo*₃ und *bd*-Typ dient. Als terminaler Elektronenakzeptor wird Sauerstoff verwendet (Matsushita *et al.* 1994). Diese Quinoloxidasen generieren am Ende einen Protonengradienten, der mittels F₁F_o-Typ-ATP-Synthase zur ATP-Synthese verwendet werden kann (Prust *et al.* 2005). Über eine NADH-Dehydrogenase (Typ II) können ebenfalls Elektronen aus dem intrazellulären Dehydrogenasestoffwechsel via NADH-Oxidation in die Atmungskette eingeschleust werden. Ein wichtiger Cofaktor für viele membranständige Dehydrogenasen ist Pyrrolochinolinchinon (PQQ) (Matsushita *et al.* 1994). *G. oxydans* besitzt alle Enzyme für eine PQQ *de novo* Synthese (Hölscher und Görisch 2006). Es wird angenommen, dass PQQ mit Hilfe von Ca²⁺, in einigen Fällen auch Mg²⁺, den Wasserstofftransfer bei der Oxidation übernimmt (Dewanti und Duine 1998; Duine 1999). In *G. oxydans* sind bisher folgende membranständige Dehydrogenasen bekannt:

Die membranständige Alkohol-Dehydrogenase besteht aus drei Untereinheiten, der großen, PQQ-abhängigen Untereinheit *adhA* (GOX1068), der Cytochrom *c* Untereinheit *adhB* (GOX1067) und einem 15 kDa großen, über 300 Gene *upstream* von den anderen Untereinheiten kodierten Protein *adhS* (GOX0756) (Kondo und Horinouchi 1997; Prust *et al.* 2005). In Experimenten wurde gezeigt, dass dieses Enzym vorzugsweise Ethanol oxidiert (Adachi *et al.* 1978).

Eine weitere membranständige Dehydrogenase ist die Inositol-Dehydrogenase (GOX1857), früher bekannt als PQQ-abhängige Dehydrogenase 1, die *myo*-, *allo*- und *muco*-Inositol oxidieren kann (Hölscher *et al.* 2007). Sie ist die einzige membranständige Dehydrogenase, die nicht konstitutiv, sondern abhängig von der Kohlenstoffquelle exprimiert wird. So ist die Expression dieser Dehydrogenase bei einem Wachstum der Zellen auf D-Mannitol oder D-Sorbitol wesentlich höher als beim Wachstum auf D-Glucose (Hoffmeister 2006; Hölscher *et al.* 2007).

Die Aldehyd-Dehydrogenase besteht aus einer Cytochrom *c*-Untereinheit (GOX0585), einer kleinen (GOX0586) und einer großen Untereinheit (GOX0587) und oxidiert vor allem Acetaldehyd zu Acetat (Adachi 1980; Prust *et al.* 2005).

Es wurde beobachtet, dass die Sorbitol-Dehydrogenasen in *G. oxydans* IFO 3254 und in einem thermotoleranten *G. frateurii* Stamm D-Sorbitol zu L-Sorbose oxidieren. Diese Dehydrogenasen bestehen aus drei Untereinheiten: Einer kleinen Untereinheit, einer Cytochrom *c* enthaltenden Untereinheit und einer Untereinheit, die eine FAD-Bindestelle enthält (Shinagawa *et al.* 1982; Toyama *et al.* 2005). Die Gene dieser Untereinheiten entsprechen den *open reading frames* (ORFs) für GOX2094-GOX2097 in *G. oxydans* 621H. Hier wurde allerdings eine Untereinheit (GOX2096) durch eine Punktmutation, die zu einem Stopcodon führt, abgetrennt, so dass die Sorbitol-Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H aus 4 Untereinheiten besteht (Prust *et al.* 2005).

Eine weitere FAD-abhängige Dehydrogenase ist die Gluconat- oder D-Gluconat-2-Dehydrogenase, die aus einer Cytochrom *c*-Untereinheit (GOX1230), einer FAD-abhängigen Untereinheit (GOX1231) und einer kleinen Untereinheit (GOX1232) besteht und D-Gluconat an der Position 2 zu 2-Ketogluconat oxidiert (Shinagawa *et al.* 1984).

Eine weitere Dehydrogenase ist die membranständige PQQ-abhängige Glucose-Dehydrogenase (GOX0265), die D-Glucose zu D-Gluconat oxidiert (Ameyama *et al.* 1981).

Die Polyol-Dehydrogenase macht D-Mannitol für *G. oxydans* durch Oxidation zu Fructose erst verfügbar (Voss *et al.* 2010). Dieses Enzym, auch Glycerin-Dehydrogenase genannt, mit seiner großen Untereinheit *sldA* (GOX0854) und der kleinen Untereinheit *sldB* (GOX0855) hat ein sehr breites Substratspektrum und oxidiert eine Vielfalt an Zuckeralkoholen zu den jeweiligen Ketonen (Adachi *et al.* 2001; Matsushita *et al.* 2003).

Wenig ist über die D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253) bekannt, da sie nur in entfernt verwandten Mikroorganismen von *G. oxydans* beschrieben wurde (Ma *et al.* 2007).

Drei weitere annotierte PQQ-abhängige Dehydrogenasen 2, 3 und 4 sind komplett unbekannt in ihrer Funktion (Prust *et al.* 2005). Laut Prust *et al.* (2005) gibt es 23 weitere putative Dehydrogenasen, die mindestens eine Transmembranhelix besitzen und vier weitere, die im Periplasma liegen sollen, was auf weitere unbekannte membranständige Dehydrogenasen schließen lässt.

Die membranständigen Dehydrogenasen und die intrazellulären Enzyme verwenden zum Teil die gleichen Substrate. Ein Beispiel ist Glucose, die sowohl intrazellulär als auch durch die membranständige Glucose-Dehydrogenase umgesetzt wird (Pronk *et al.* 1989). Das Produkt Gluconat wird durch die membranständige Gluconat-Dehydrogenase gleich weiter oxidiert. Das daraus resultierende 2-Ketogluconat muss *G. oxydans* erst wieder reduzieren, um es als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Es wurde allerdings am Stamm 621H gezeigt, dass

G. oxydans 2-Ketogluconat zum Teil nicht aufnimmt und somit als Kohlenstoffquelle verliert (Levering *et al.* 1988). Der evolutionäre Sinn, der laut Deppenmeier und Ehrenreich (2009) dahinter gesehen wird, ist die Strategie von *G. oxydans*, alle Kohlenstoffquellen zunächst zu oxidieren, um sie seinen Konkurrenten, die zu weit höheren Biomassekonzentrationen heranwachsen könnten, zu entziehen. Eine dabei starke Verringerung des pHs, die Möglichkeit bei niedrigem pH zu wachsen und eine hohe Osmotoleranz verschafft ihm weitere Vorteile. Da *G. oxydans* in zucker- und damit nährstoffreichen Habitaten vorkommt, ist der Vorteil durchaus ersichtlich, auch wenn der Stoffwechsel sehr unökonomisch scheint. Neben diesen konkurrierenden Enzymen gibt es auch membranständige Dehydrogenasen, die Kohlenstoffquellen wie Mannitol durch Oxidation zur Fructose erst für die Zelle verfügbar machen (Voss *et al.* 2010).

1.2. Metagenom von Essigsäurebakterien

Je nach Habitat variiert die Anzahl der in Umweltproben enthaltenen Bakterienspezies von einigen wenigen in extremen Umgebungen (Tyson *et al.* 2004) bis hin zu mehreren 10000 für z.B. ein Gramm Erde (Curtis *et al.* 2002). Wie Studien gezeigt haben, lassen sich allerdings nur bis zu 1 % der Bakterien aus den meisten Umweltproben im Labor kultivieren (Amann *et al.* 1995). Der methodische Ansatz der Metagenomik versucht die funktionelle und sequenzbasierte Analyse der Genome einer mikrobiellen Gemeinschaft, die in einer Umweltprobe enthalten sind (Handelsman *et al.* 1998). Durch die Metagenomik werden somit auch solche Bakterien erfasst, die mit den bisher üblichen Kultivierungstechniken nicht erfassbar sind. Da unbekannte Organismen wiederum auch unbekannte Enzyme enthalten können, ist die Untersuchung eines Metagenoms ein vielversprechender Ansatz, um neue Enzyme mit neuen Eigenschaften oder Reaktionswegen für neue biotechnologische Anwendungen zu finden (Schmeisser *et al.* 2007; Leis *et al.* 2013).

1.2.1. Prinzipielle Analyse von Metagenomen

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten ein Metagenom zu analysieren: die funktionsbasierte Analyse und die sequenzbasierte Analyse. Für beide Analysen muss zunächst die DNA möglichst aller Mikroorganismen der Umweltprobe isoliert werden. Hierbei sollten drei wichtige Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen sollte die DNA aus einer breiten Vielfalt von Mikroorganismen isoliert werden (Schmeisser *et al.* 2007). Dies ist manchmal nicht möglich, da vor allem chemische Isolationsstrategien die DNA einiger Organismen zerstören oder nicht isolieren können (Schloss und Handelsman 2005). Eine weitere Schwierigkeit stellt die Tatsache dar, dass die DNA nicht zu stark geschert werden sollte, da hochmolekulare DNA einfacher zu assemblieren ist und die Bildung von chimärischen Produkten verringert, die zu falschen DNA-Sequenzen führen könnten (Schmeisser *et al.* 2007). Zudem muss die DNA frei von kontaminierenden Substanzen sein, die eine weitere Verarbeitung, z.B. das Klonieren in Expressionsvektoren, verhindern würden (Schmeisser *et al.* 2007). War die DNA-Isolation erfolgreich, wird im zweiten Schritt der Metagenomanalyse eine metagenomische DNA-Bibliothek, meistens auch Metagenombank genannt, durch Ligation der DNA in Plasmiden, Cosmiden oder Fosmiden und anschließender Klonierung, z.B. in *Escherichia coli*-Zellen, erstellt. Die daraus resultierenden Klone werden vereinzelt und dienen nun für die funktionelle oder sequenzbasierte Analyse. Für die funktionelle Analyse werden die Vektoren mit der metagenomischen DNA wenn nötig in Expressionsstämme transferiert und die Enzym-kodierenden Gene mit ihren eigenen Promotern oder einem heterologen Promoter in einem geeigneten Expressionsstamm exprimiert (Leis *et al.* 2013). Durch physiologische Tests wie den Abbau von Polysacchariden oder Fetten und einer geeigneten Visualisierung, z.B. durch Hofbildung oder einen Farbumschlag, können Klone mit funktionellen und interessanten Enzymen identifiziert werden. Die anschließende Sequenzierung des enthaltenden Vektors gibt letztendlich Aufschluss über die für den Phänotyp verantwortlichen Gene (Schmeisser *et al.* 2007; Leis *et al.* 2013). Da für diesen

Ansatz allerdings geeignete physiologische Tests und Expressionsstämme, die Fosmide oder Cosmide aufnehmen können, notwendig sind, setzt sich auch immer mehr die sequenzbasierte Analyse durch (Schmeisser *et al.* 2007; Leis *et al.* 2013). Durch die sinkenden Preise für eine Sequenzierung durch *Next-Generation-Sequencing*-Methoden, die immer größere Sequenzmengen in immer kürzerer Zeit analysieren können, ist es möglich, auch ganze Metagenombibliotheken sequenzieren zu lassen. Die daraus resultierenden Sequenzen werden dann mit *in silico* Methoden analysiert, interessante Gene daraus amplifiziert und durch Expression *in vivo* charakterisiert. Auch wenn es viele verschiedene Analysesoftwarelösungen gibt, können über die sequenzbasierte Analyse keine komplett neuen, sondern nur zu den bekannten verwandte Enzyme gefunden werden, da die Analysealgorithmen auf der Wissensbasis bekannter Enzyme die Bibliotheken durchsuchen (Schmeisser *et al.* 2007; Leis *et al.* 2013).

1.2.2. Eine Essigmutter als Quelle für ein Metagenom

Auch bei Essigsäurebakterien besteht das Problem der Kultivierbarkeit in Reinkulturen (Entani *et al.* 1985; Sievers *et al.* 1992) und das des Diversitätsverlusts in Anreicherungen (Ilabaca *et al.* 2008). Durch diesen Diversitätsverlust gehen aber möglicherweise auch viele membranständige Dehydrogenasen verloren. Eine große Diversität an Essigsäurebakterien erwartet man sich in der traditionellen Essigproduktion, da diese mit Hilfe einer sogenannten Essigmutter durchgeführt wird, die normalerweise spontan durch eine Inokulation aus der Umwelt entsteht. Es wurden verschiedene Studien durchgeführt, um die Diversität von Essigsäurebakterien während der Essigproduktion zu untersuchen. In einer Studie über traditionellen *Aceto balsamico* dominierten z.B. *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter pasteurianus* und *Acetobacter aceti* in absteigender Reihenfolge das Habitat (Gullo *et al.* 2006). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass ein dominierender *Acetobacter pasteurianus* zusammen mit *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter europaeus* und *Gluconacetobacter intermedius* vorkam (Ilabaca *et al.*

2008). Es konnte auch gezeigt werden, dass *Acetobacter malorum*, *Acetobacter cerevisiae* und *Acetobacter orleanensis* ein Essighabitat dominieren können (Mamlouk *et al.* 2011). Selbst innerhalb einer Spezies wurden zum Teil hohe Diversitäten ermittelt, wie bei der Produktion von chinesischem Getreideessig, bei der verschiedene Stämme von *Acetobacter pasteurianus* eine Rolle spielen (Wu *et al.* 2010). Es wird zwar eine wesentlich geringere Diversität als in anderen Metagenomen erwartet, allerdings können selbst kleinste Unterschiede wie Punktmutationen das Substratspektrum einer Glucose-Dehydrogenase um die Oxidation von Disacchariden wie Maltose erweitern (Cleton-Jansen *et al.* 1991). Da es außerdem schon bekannte membranständige Dehydrogenasen gibt, die in einigen *G. oxydans* Stämmen nicht vorkommen, wie z.B. die L-Sorboson-Dehydrogenase von *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 (Shinjoh *et al.* 1995) oder die L-Sorbose-Dehydrogenase von *G. oxydans* T-100 (Saito *et al.* 1997), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass in einer unbekanntem Spezies der *Acetobacteraceae* weitere neue Dehydrogenasen zu finden sind.

1.2.3. *Gluconobacter oxydans* als Expressionsstamm

Ein in der Biotechnologie sehr häufig verwendeter Organismus zur heterologen Expression von Enzymen ist *Escherichia coli*. Obwohl gezeigt werden konnte, dass *E. coli* ebenfalls eine membranständige Glucose-Dehydrogenase besitzt, ist diese auf Grund der fehlenden PQQ-Produktion nur als inaktives apo-Enzym vorhanden (Hommes *et al.* 1984). Da *G. oxydans* eigenständig PQQ produzieren kann und Flavin- sowie PQQ- abhängige Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien sich sehr wahrscheinlich am besten in die Elektronentransportkette eines Essigsäurebakteriums integrieren werden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine heterologe Expression in *G. oxydans* bevorzugt. Weitere Vorteile von *G. oxydans* sind die schon erwähnt hohe Säuretoleranz und Osmostabilität sowie eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür, dass unbekannte Chaperone schon vorhanden sind, die ein korrektes *assembly* und einen korrekten Einbau der membranständigen Dehydrogenasen in die Membran ermöglichen. Nicht zuletzt sollten eventuelle Produkte mit einer geringeren

Wahrscheinlichkeit in *G. oxydans* weiter verstoffwechselt werden, als das beim vielseitigen *E. coli* der Fall ist. Es wurde auch bereits gezeigt, dass es möglich ist, membranständige Dehydrogenasen anderer *Acetobacteraceae*, z.B. die schon zuvor erwähnte L-Sorbose-Dehydrogenase von *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258, in *G. oxydans* heterolog zu exprimieren (Shinjoh *et al.* 1995).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur Expression membranständiger Dehydrogenasen aus einem Metagenom von Essigsäurebakterien in *Gluconobacter oxydans*. Auf Grund der schon genannten Argumente wird die *in silico* Untersuchung eines Metagenoms aus einer Essigmutter und die anschließende Expression der identifizierten Gene in *G. oxydans* als aussichtsreich angesehen.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine aus folgenden Schritten bestehende Strategie verfolgt:

1. Generierung eines *G. oxydans*-Expressionsstammes mit möglichst wenigen seiner eigenen membranständigen Dehydrogenasen, um keine Probleme wegen überlappender Substratspezifitäten zwischen heterolog exprimierten Dehydrogenasen und den regulären wirtseigenen Dehydrogenasen zu bekommen
2. Entwicklung eines einfachen Aktivitätstests für membranständige Dehydrogenasen zur Bestimmung der umgesetzten Substrate
3. Charakterisierung der Wachstumsphysiologie von *G. oxydans* und der Bedeutung der membranständigen Dehydrogenasen
4. Erstellung einer metagenomischen Klonbibliothek aus einer Essigmutter, in der möglichst viele verschiedene Mitglieder der Familie der *Acetobacteraceae* enthalten sind, um möglichst viele verschiedene membranständige Dehydrogenasen zu finden

5. Entwicklung einer geeigneten *in silico*-Analysemethode für das sequenzierte Metagenom, um dieses nach neuen membranständigen Dehydrogenasen durchsuchen zu können
6. Expression gefundener membranständiger Dehydrogenasen mit einem etablierten Expressionsvektor im Expressionsstamm *G. oxydans* und anschließender Charakterisierung des Substratspektrums

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Für molekularbiologische Arbeiten wurden zur Inaktivierung von Nukleasen alle hitzestabilen Lösungen und Geräte bei 121 °C für 20 min durch Autoklavieren sterilisiert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol behandelt. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.1.1. Chemikalien

Hefeextrakt und Peptone wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) gekauft. Mannitol, Fructose und Glucose als Hauptkohlenstoffquellen, sowie weitere verwendete Chemikalien, wurden, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in den Reinheitsgraden „pro analysis“ oder „reinst“ bezogen.

2.1.2. Isolation von DNA

Während der Arbeit wurde DNA aus den unterschiedlichsten Organismen auf verschiedenen Wegen isoliert.

2.1.2.1. Isolation von genomischer DNA aus *G. oxydans*

Genomischer DNA wurde aus *G. oxydans* unter Zuhilfenahme des ‚MasterPure™ DNA Purification Kit‘ von Epicentre (Madison, USA) isoliert. Dafür wurden 5 mL einer Übernackkultur von *G. oxydans* bei 12400 x g pelletiert und das Pellet in 150 µL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2) resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Verdau mit 0,6 mg Lysozym bei 37 °C für 30 min. 1 µL der im Kit enthaltenen Proteinase K Suspension wurden mit 180 µL der ebenfalls enthaltenen 2x T&C Lysis Solution gemischt, danach zum Ansatz gegeben und bei 65 °C für 15 min inkubiert. Die Probe wurde anschließend auf Eis abgekühlt und mit 1 µL RNase A des Kits nochmal für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine durch Zugabe von

210 μL des MPC Protein Precipitation Reagent und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 12400 x g und 4 °C. Der Überstand wurde mit 500 μL Isopropanol versetzt und durch Invertieren mit dem Überstand vermischt. Optional wurde bei schlechter Ausbeute in vorherigen Experimenten eine 5-30-minütige Inkubation bei -20 °C angeschlossen. Die Fällung der DNA aus dem Überstand erfolgte dann durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 12400 x g und 4 °C. Das Pellet wurde durch Waschen mit 70 % Ethanol von Isopropanolresten befreit und erst nach dem Verdampfen aller Ethanolreste in 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst.

2.1.2.2. Isolation von Plasmiden aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* DH5 α erfolgte mit Hilfe des ‚AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kits‘ von Axygen Biosciences (Union City, USA) ohne den Waschschrift W1 und den optionalen zweiten Waschschrift W2. Die Plasmid-DNA wurde im finalen Schritt des Protokolls mit 70 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.3. DNA-Analytik

Die gewonnene DNA wurde mit verschiedenen analytischen Methoden überprüft.

2.1.3.1. DNA-Konzentrationsbestimmung

Eine schnelle aber auch fehleranfällige Methode zur Konzentrationsbestimmung der DNA ist die Bestimmung anhand der Absorption von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Nanodrop ND-1000 von Peqlab (Erlangen, Deutschland). Der Nullabgleich wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ vorgenommen. Mit einem allgemein akzeptierten Extinktionskoeffizienten von 50 $\text{ng cm } \mu\text{L}^{-1}$ für doppelsträngige DNA bei 260 nm und dem Lambert-Beerschem Gesetz errechnet die Nanodrop-Software die DNA-Konzentration und gibt ein Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zur optischen Dichte bei 280 nm an. Verunreinigungen durch Proteine und Phenol

erhöhen die Absorption bei 280 nm. Ein Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ gleich 1,8 gilt als reine DNA (Sambrook *et al.* 1989).

2.1.3.2. Analytische Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wurde in hauseigen hergestellten horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Die Gele bestanden aus einer 0,8 %igen (w/v), aufgekochten Agaroselösung in 1x TAE-Puffer. Dieser Puffer wurde auch als Elektrophoresepuffer verwendet. Die DNA Proben wurden mit einem 6x Auftragspuffer von Fermentas (Waltham, USA) im Verhältnis 5:1 gemischt und in die Taschen gefüllt, die beim Gießen des Gels durch einen Kamm ausgespart wurden. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 7,2 V cm⁻¹ (100 V) für 35 min. Zur Färbung wurde das Agarosegel für 10-20 min in eine wässrige 1 mg L⁻¹ Ethidiumbromid-Lösung gelegt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Alphaimager Mini von Protein Simple (Santa Clara, USA) fotografiert. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurde bei jedem Gel mindestens eine Tasche mit einem Größenstandard ‚GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder‘ von Fermentas (Waltham, USA) beladen.

50 x TAE-Puffer

Tris	242 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,2 g
Eisessig	57,1 mL
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 mL
pH 8,5	

2.1.3.3. Präparative Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente verschiedener Längen zu trennen und um diese anschließend zu isolieren, wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde, wie unter 2.1.3.2 beschrieben, die DNA der Länge nach aufgetrennt und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die gewünschte Bande wurde nach dem Fotografieren unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des ‚Wizard® SV Gel and PCR Clean up

Systems' von Promega (Mannheim, Deutschland), wie in den Herstelleranweisungen beschrieben, aus dem Gel aufgereinigt, im finalen Schritt mit 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.1.3.4. DNA-DNA Hybridisierung mittels Southern Blot

Mittels Southern Blot nach Southern (1975) ist es möglich bestimmte DNA-Fragmente innerhalb einer größeren DNA-Menge (z.B. Chromosom) nachzuweisen. Der Blot wird in dieser Arbeit als zweite Verifizierungsmethode neben der DNA-Sequenzierung für Deletionsmutanten eingesetzt. Das Prinzip ist die Hybridisierung einer DNA-Sonde, einem DNA-Fragment das unter anderem aus speziell markierten Nukleinsäuren besteht, an die komplementäre Sequenz ihrer DNA-Sondensequenz in einer größeren DNA Menge über Watson-Crick-Basenpaarungen. Wird diese DNA-Menge durch Restriktionsenzyme aufgeteilt und anschließend der Länge nach aufgetrennt, kann unter Berücksichtigung der erwarteten Fragmentgrößen aus dem Restriktionsverdau auf die Position der gesuchtes Sequenz innerhalb der DNA-Menge geschlossen werden.

2.1.3.4.1. Vorbereitung und Blotten der Probe

Für den Southern Blot wurde genomische DNA aus *G. oxydans* isoliert (siehe 2.1.2.1) und 1-2 μg über Nacht mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert, das nicht innerhalb der Sonde, aber in oder in der Nähe des zu überprüfenden Gens schneidet. Dies gewährleistet, dass eine Veränderung in der Größe, z.B. durch Deletion einer Gensequenz, später auf dem Blot sichtbar ist. Diese hydrolysierte DNA wurde nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme mittels Agarosegelelektrophorese langsam bei $3,6\text{ V cm}^{-1}$ (80 V) für 2 h der Länge nach aufgetrennt, aber nicht im Ethidiumbromidbad gefärbt. Zur späteren Größenermittlung wurde ein Digoxigenin (DIG)-markierter Größenstandard in den äußeren Geltaschen mitaufgetrennt. Anschließend wurde die aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurde eine in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eingeweichte positive

Nylonmembran von Roche (Risch, Schweiz) auf einen Vakuumblotter von Bio-Rad (Hercules, USA) gelegt, die genauso groß ist, wie das Agarosegel. Auf die Membran wurde die Blotting Maske gelegt, die die Membran und das Gel mit einem ca. 1 cm langen Rand an jeder Seite überdeckte. Auf die Maske wurde das Gel mit der oberen Seite nach unten gelegt. Das Vakuum wurde angelegt und nacheinander folgende Puffer über das Gel gegossen. Zuerst erfolgte eine Depurinierung der Basen mit 250 mM HCl für 10min. Hierbei werden die DNA Stränge in kleine Stücke zerteilt um später leichter auf die Membran transferiert werden zu können. Es folgten zwei kurze Waschgänge mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$. Durch zwei Denaturierungsschritte mit Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) à 15 min wurden die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen, damit später die Sonde hybridisieren kann. Es folgten wieder zwei kurze Waschschrte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$. Anschließend erfolgte eine zweimalige Neutralisierung mit Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl pH 7,5) à 15 min und nochmals ein kurzer Waschschrte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$. Etwaige Restflüssigkeit wurde zwischen jedem Schritt wieder vom Gel abgenommen. Nun wurde die DNA durch den 20x SSC Transferpuffer (3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat) 45-60 min auf die Membran mit Hilfe des Vakuums übertragen. Die erfolgreiche Übertragung konnte durch die Übertragung der Auftragspufferfarbe vom Gel auf die Membran abgeschätzt werden. Anschließend wurde die DNA durch UV-Licht (254 nm) auf der Membran fixiert.

2.1.3.4.2. Erstellen der Sonde und Hybridisierung

Die Sonde wurde mit Hilfe des ‚Digoxigenin (DIG) DNA Labeling Mix‘ von Roche (Risch, Schweiz) erstellt. Dazu wurde eine PCR-Reaktion (2.1.5.1) mit 10 μL eines 5x DIG-dNTP-Mix (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,95 mM dTTP, 0,05 mM DIG-dUTP) durchgeführt. In einer anschließenden präparativen Agarosegelelektrophorese wurde die Sondenbande isoliert. Die Sonde musste vor Gebrauch bei 98 °C für 2-5 min denaturiert werden. Die Hybridisierung erfolgte dann bei 68 °C in einem Hybridisierungssofen Hybrid 2000 der Firma H. Sour (Reutlingen, Deutschland). Zunächst wurden 25 mL einer

Prähybridisierungslösung für 2 h in einem Hybridisierungsröhrchen vorgewärmt. Die Prähybridisierungslösung bestand aus 5x SSC, 1 % Blocking Stammlösung (10 % Blocking Reagent Roche (Risch, Schweiz) in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,175 M NaOH) gelöst), 10 % N-Laurylsarcosin und 10 % SDS. Die denaturierte Sonde wurde danach zugegeben und über Nacht mit der Membran hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgten zwei Waschschrte der Membran à 5 min bei Raumtemperatur mit Puffer 1 (2x SSC, 0,1 % SDS) und zwei Waschschrte à 15 min bei Ofentemperatur mit vorgewärmtem Puffer 2 (0,1x SSC, 0,1 % SDS).

2.1.3.4.3. Detektion der DIG markierten DNA mit Hilfe von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid / 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (NBT/BCIP)

Für die Detektion wurde die Membran zunächst für 30 min bei Raumtemperatur in ein Bad mit 50 mL Puffer 3 (1 % Blocking Stammlösung (siehe 2.1.3.4.2) in Maleinsäurepuffer (siehe 2.1.3.4.2)) gelegt. Anschließend wurden Anti-Digoxigene-AP-Fab-Fragmente von Roche (Risch, Schweiz) im Verhältnis 1:10000 in die Lösung gegeben und das Ganze wieder für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Antikörperfragmente binden spezifisch an die DIG-markierte DNA und katalysieren mit Hilfe einer fusionierten alkalischen Phosphatase die spätere Farbreaktion von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zu Indigo und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu Diformazan. Es folgten zwei Waschschrte mit 50 mL Waschpuffer (0,25 % Tween 20 in Maleinsäurepuffer (siehe oben)) à 15 min bei Raumtemperatur, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte nach einer Equilibrierung mit 50 mL Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) in 5 mL Detektionslösung (2 % NBT/BCIP Stock Solution von Roche (Risch, Schweiz) in Detektionspuffer (siehe oben)) in einer zugeschweißten Plastikfolie bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde mit Wasser abgestoppt, als alle Banden auf der Membran sichtbar waren. Anschließend wurde der Blot digitalisiert und vor Licht geschützt gelagert.

2.1.3.5. DNA – Sequenzierung

Sofern nicht anders erwähnt, wurden kleine DNA-Fragmente und Plasmidsequenzen bis ca. 1000 bp bei Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Der DNA-Probe von mindestens 100 ng DNA für PCR-Produkte und 1 µg für Plasmide wurden 15 pmol eines Sequenzierprimers hinzugefügt, der den Startpunkt und die Richtung der gewünschten Sequenzierung markierte. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Vector NTI 11 von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland).

2.1.4. Enzymatische Modifikationen von DNA

Um DNA in den Vektor pAJ63a zu klonieren, wurden verschiedene Modifikationen an ihr vorgenommen.

2.1.4.1. Restriktionsverdau

Typ II Restriktionsendonukleasen können DNA Doppelstränge an spezifischen Stellen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen trennen. Die dabei entstehenden Schnittstellen sind Palindrome. Die Enzyme erzeugen meist überhängende Einzelstrangenden, die sich ideal zur Fusionierung (Ligation) eignen. Alle Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (Waltham, USA) bezogen. pAJ63a-Plasmide und die DNA von Fusionskonstrukten wurden entweder mit dem Restriktionsenzym *XbaI* einfach oder mit *XbaI* und *EcoRI* bzw. *PstI* und *Sall* doppelt hydrolysiert. Alle Ansätze wurden nach den Herstelleranweisungen durchgeführt. Zur einfachen Hydrolyse wurden 20 Units *XbaI* pro 1 µg DNA in 1X Tango-Puffer und zur gleichzeitigen, doppelten Hydrolyse 40 Units *XbaI* sowie 20 Units *EcoRI* pro 1 µg DNA in 1X Tango-Puffer eingesetzt. Zur doppelten Hydrolyse mit *PstI* und *Sall* wurden auch 40 Units *PstI* bzw. 20 Units *Sall* eingesetzt. Die Reaktion fand allerdings im mitgelieferten Puffer O statt. 1 µg lineare DNA wurden in einem 20 µL Ansatz für 3 h bei 37 °C und 5 µg Plasmid-DNA in einem 100 µL Ansatz für 16 h bei 37 °C hydrolysiert. Plasmide wurden vor der Aufreinigung dephosphoryliert (2.1.4.2). Die Aufreinigung der DNA erfolgte am Ende mit

Hilfe des ‚Wizard® SV Gel and PCR Clean up System‘ von Promega (Mannheim, Deutschland). Hier wurde die DNA im finalen Schritt mit 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.1.4.2. Alkalischer Phosphatase Verdau

Um zu verhindern, dass ein mit einem Restriktionsenzym verdauter Vektor bei einer Ligation mit sich selber religiert, wurde die Vektor-DNA vorher mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Ein Abspalten der 5'-Phosphatgruppen lässt nur noch eine Ligation mit einem nicht dephosphorylierten DNA-Ende zu und begünstigt dadurch die Ligation des Vektors mit der zu integrierenden DNA. Die alkalische Phosphatasereaktion wurde mit 5 Units der ‚FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase‘ von Fermentas (Waltham, USA) gemäß den Herstellerempfehlungen direkt im Ansatz des Restriktionsverdaus ohne zwischenzeitliche Aufreinigung bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der linearisierten, dephosphorylierten Plasmide mit Hilfe des ‚Wizard® SV Gel and PCR Clean up System‘ von Promega (Mannheim, Deutschland). Hier wurde die DNA im finalen Schritt mit 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.1.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Um die Fusionskonstrukt-DNA-Fragmente in pAJ63a zu integrieren, wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet, die unter ATP Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxyl-Ende der DNA katalysiert. Die Ligation erfolgte gemäß den Herstelleranweisungen mit 1 Unit T4-DNA-Ligase von Fermentas (Waltham, USA) im mitgelieferten Ligationspuffer in einem 20 μL Ansatz bei $16\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht. Es wurden 50 ng Vektor-DNA und 250 ng Fusionskonstrukt-DNA eingesetzt.

2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion nach Mullis und Faloona (1987) ist eine Standardmethode in der Molekularbiologie, um kleine DNA-Mengen oder bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Alle in dieser Arbeit dafür verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 13 - Tabelle 16 aufgeführt.

2.1.5.1. Konstruierende PCR

Sollen die PCR-Produkte später zur Konstruktion von Deletions- oder Expressionsvektoren verwendet werden, ist es sehr wichtig, dass die Amplifikate keine Fehler enthalten.

<u>Phusion-PCR-Ansatz</u>	20 μ L
Phusion-PCR-Puffer	4 μ L
dNTPs (je 25 mM)	0,4 μ L
Primer forward (5 pM)	1 μ L
Primer reverse (5 pM)	1 μ L
DNA-Vorlage	0,5 μ L
Phusion-Polymerase	0,2 μ L
H ₂ O _{dest.}	12,9 μ L

Phusion-PCR-Programm

Denaturierung	98 °C 30 s		
Denaturierung	98 °C 10 s	} 35 Zyklen	
Hybridisierung	65 °C 10 s		
Elongation	72 °C 30 s		
Elongation	72 °C 10 min		
Abkühlen	16 °C		

Da die normale Fehlerquote einer DNA-Polymerase dafür nicht ausreicht, gibt es DNA-Polymerasen mit einer sogenannten *proof reading*-Funktion, die eine Amplifikation von fehlerhaften DNA-Sequenzen vermeidet. Für diese Arbeit wurde die ‚Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase‘ von Finnzyme (Vantaa, Finnland) verwendet. Die Reaktion wurde gemäß den Herstelleranweisungen für die oben dargestellte 20 µL Reaktion angesetzt und mit dem oben abgebildeten 3-Stufenprotokoll als Zyklusprogramm in einem Thermocycler FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt. Um Restriktionsschnittstellen oder Hybridisierungsstellen einzubauen, können die 5′-Enden der Primer auf die bis zu doppelte Länge mit zusätzlichen, nicht PCR-relevanten Nukleotiden verlängert werden

2.1.5.2. **Kolonie-PCR**

Zur Überprüfung von *G. oxydans*-Deletionsmutanten oder zur Überprüfung von *E. coli*-Transformanten ist eine PCR-Reaktion mit ganzen Zellen wesentlich schneller als eine PCR-Reaktion mit zuvor isolierter DNA. Diese PCR-Reaktion wird wie eine normale PCR-Reaktion angesetzt, nur dass anstelle der DNA-Probe ein wenig Bakterienzellen mit Hilfe eines Zahnstochers in das Reaktionsgefäß gegeben werden. Durch einen verlängerten initialen Denaturierungsschritt werden die Zellen denaturiert und die intrazelluläre DNA kann in das Reaktionsgefäß entweichen, um mit den Primern zu hybridisieren. Für die Kolonie-PCR ist keine Polymerase mit *proof reading*-Funktion nötig, da nur die Länge der Amplifikate per Agarosegelelektrophorese (2.1.3.2) analysiert wird. Deswegen wurde die unempfindlichere ‚Phire® Hot Start DNA Polymerase‘ von Finnzyme (Vantaa, Finnland) verwendet. Die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben für die unten dargestellte 20 µL Reaktion angesetzt, nur dass anstelle von Template-DNA eine Zahnstocherspitze mit Zellen hinzugegeben wurde.

<u>Kolonie-PCR-Ansatz</u>	20 μL
Phire-PCR-Puffer	4 μL
dNTPs (25 mM)	0,4 μL
Primer forward (5 pM)	1 μL
Primer reverse (5 pM)	1 μL
Phire-Polymerase	0,2 μL
H ₂ O _{dest.}	13,4 μL

Das 3-Stufenprogramm lautete wie folgt:

Kolonie-PCR-Programm

Denaturierung	98 °C	8 min	
Denaturierung	98 °C	30 s	} 30 Zyklen
Hybridisierung	62 - 68 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlen	16 °C		

2.1.5.3. Long Flanking Homology (LFH)-PCR

Die LFH-PCR nach Wach (1996) wurde eingesetzt, um flankierende Sequenzbereiche *upstream* und *downstream* eines Gens miteinander zu fusionieren. Dazu wurden zunächst 1 kbp der jeweiligen Flanken mit je zwei Primern unter Vorlage genomischer DNA von *G. oxydans* in einer konstruierenden PCR (Ansatz und Bedingungen siehe 2.1.5.1) amplifiziert. Beim *upstream*-Fragment (Up-Fragment) wurde die Oligonukleotidsequenz des *Reverse*-Primers um die reverskomplementäre Startsequenz (ca. 20 bp) des *downstream*-Fragments (Down-Fragment) erweitert, beim Down-Fragment die Oligonukleotidsequenz des *Forward*-Primers um die Endsequenz des Up-Fragments (ca. 20 bp). Über den *Forward*-Primer beim Up-Fragment und den *Reverse*-Primer beim Down-Fragment lassen sich

zusätzlich noch Restriktionsschnittstellen an die Fragmente anfügen. Anschließend wurden die Fragmente mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (2.1.3.3) aufgereinigt. Eine zweite PCR-Reaktion mit den gleichen Bedingungen wie die erste, dem *Forward*-Primer des Up-Fragments und dem *Reverse*-Primer des Down-Fragments unter der Vorlage von je ca. 50 ng beider Fragmente fusionierte die Fragmente auf Grund ihrer homologen Enden, die ebenfalls hybridisieren können.

2.2. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.1. Organismen und Plasmide

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit für Klonierungs- und Konjugationszwecke verwendeten *E. coli*-Stämme aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli*-Stämme zu Klonierung- und Konjugationszwecken

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>E. coli</i> DH5a	[F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk-), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (Nal ^r), <i>relA1</i> , D(<i>lacZYAargF</i>), U169, F80/ <i>lacZDM15</i>]	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> HB101	F-, <i>hsdS20</i> (r-B, m-B), <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK-2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA13</i> , <i>KanR</i> , <i>oriColE1</i> , <i>RK2-Mob+</i> , <i>RK2-Tra+</i> , <i>mH-1</i> with plasmid pRK2013	Boyer und Roulland-Dussoix (1969) sowie Figurski und Helinski (1979)
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZΔM15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> λ-	Invitrogen (Carlsbad, USA)

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit konstruierten Deletionsplasmide auf Basis des Ausgangsplasmids pAJ63a aufgelistet.

Tabelle 2: In dieser Arbeit konstruierte Deletionsplasmide und Ausgangsplasmid pAJ63a

Plasmid	Beschreibung
pAJ63a	pAJ63a-Leerplasmid Quelle: Peters <i>et al.</i> (2013a) bzw. Junker (2012)
pAJ63a:FusionGOX0265	Deletionsvektor für die membranständige Glucose-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX0413	Deletionsvektor für die Acetyl-CoA-Synthetase
pAJ63a:FusionGOX0516	Deletionsvektor für die PQQ abhängige Dehydrogenase 4
pAJ63a:FusionGOX0585-7	Deletionsvektor für die membranständige Aldehyd-Dehydrogenase

Plasmid	Beschreibung
pAJ63a:FusionGOX0854-5	Deletionsvektor für die Polyol-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX01068-7	Deletionsvektor für die membranständige Alkohol-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX1081	Deletionsvektor für die Pyruvat-Decarboxylase
pAJ63a:FusionGOX1122	Deletionsvektor für die Aldehyd-Dehydrogenase GOX1122
pAJ63a:FusionGOX1168-70	Deletionsvektor für das putative Operon aus putativer Oxidoreductase, hypothetischem Protein und putativer L-Lactat-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX1170	Deletionsvektor für die putative L-Lactat-Dehydrogenase GOX1170
pAJ63a:FusionGOX1230-2	Deletionsvektor für die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX1253	Deletionsvektor für die membranständige D-Lactat-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX1441	Deletionsvektor für die PQQ abhängige Dehydrogenase 3
pAJ63a:FusionGOX1857	Deletionsvektor für die membranständige Inositol-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionGOX1969	Deletionsvektor für die putative PQQ abhängige Dehydrogenase 2
pAJ63a:FusionGOX1969.II	Deletionsvektor II für die putative PQQ abhängige Dehydrogenase 2
pAJ63a:FusionGOX2018	Deletionsvektor für die putative Aldehyd-Dehydrogenase GOX2018
pAJ63a:FusionGOX2071	Deletionsvektor für die putative Lactat-Dehydrogenase GOX2071
pAJ63a:FusionGOX2094-7	Deletionsvektor für die membranständige Sorbitol-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionΔmadh::sldAB	Integrationsvektor für die Polyol-Dehydrogenase in den Locus der Alkohol-Dehydrogenase
pAJ63a:FusionADH2.6	Integrationsvektor für die membranständige Alkohol-Dehydrogenase

Auf Grund der Vielzahl der Deletionsmutanten sind in Tabelle 3 nur die Mutanten aufgeführt, die zu weiteren Untersuchungen herangezogen wurden. Alle weiteren erstellten Deletionsmutanten sind im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 3: Alle wichtigen Deletionsmutanten dieser Arbeit und ihre Ausgangsstämme

Abk.:	Genotyp	Eigenschaften
wt	<i>G. oxydans</i> 621H Δ upp	upp-Deletionstamm, Cef ^R , FU ^R , Quelle: Peters <i>et al.</i> (2013a) bzw. Junker (2012)
BP.1	<i>G. oxydans</i> wt Δ GOX1067 Δ GOX1068	Deletion der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (Cytochrom c Untereinheit und große Untereinheit)
BP.2	<i>G. oxydans</i> BP.1 Δ GOX1857	Deletion der membranständigen Inositol-Dehydrogenase (PQQ-abhängige Dehydrogenase 1)
BP.3	<i>G. oxydans</i> BP.2 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587	Deletion der membranständigen Aldehyd-Dehydrogenase (Cytochrom c Untereinheit, kleine Untereinheit und große Untereinheit)
BP.4	<i>G. oxydans</i> BP.3 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097	Deletion der membranständigen Sorbitol-Dehydrogenase (Cytochrom c Untereinheit, 2x große Untereinheit und kleine Untereinheit)
BP.5	<i>G. oxydans</i> BP.4 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232	Deletion der membranständigen Gluconat-2-Dehydrogenase (Cytochrom c Untereinheit, α -Kette und γ -Kette)
BP.6	<i>G. oxydans</i> BP.5 Δ GOX0265	Deletion der membranständigen PQQ-abhängige Glucose-Dehydrogenase

Abk.:	Genotyp	Eigenschaften
BP.7	<i>G. oxydans</i> BP.6 ΔGOX1441	Deletion der PQQ-abhängige Dehydrogenase 3
BP.7.1	<i>G. oxydans</i> BP.6 ΔGOX0854 ΔGOX0855	Deletion der Polyol-Dehydrogenase (Untereinheit <i>sldA</i> und <i>sldB</i>) (alternative Deletionsreihe)
BP.8	<i>G. oxydans</i> BP.7 ΔGOX0516	Deletion der PQQ-abhängige Dehydrogenase 4
BP.8.1	<i>G. oxydans</i> BP.7.1 Δ GOX1441	Deletion der PQQ-abhängige Dehydrogenase 3 (alternative Deletionsreihe)
BP.9	<i>G. oxydans</i> BP.8 ΔGOX0854 ΔGOX0855	Deletion der Polyol-Dehydrogenase (Untereinheit <i>sldA</i> und <i>sldB</i>)
BP.10	<i>G. oxydans</i> BP.9 ΔGOX1253	Deletion der membranständigen D-Lactat-Dehydrogenase
d2071	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX2071	Deletion der putativen L-Lactat-Dehydrogenase
d1170	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX1170	Deletion der putativen L-Lactat-Dehydrogenase
d1170/ 2071	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX1170 ΔGOX2071	Deletion beider putativen L-Lactat-Dehydrogenasen
d1170/ 2071/ 1253	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX1170 ΔGOX2071 ΔGOX1253	Deletion aller annotierten Lactat-Dehydrogenasen
d1168/ 1169/ 1170	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX1168 ΔGOX1169 ΔGOX1170	Deletion der putativen L-Lactat-Dehydrogenase mit der benachbarten putativen Oxidoreductase und hypothetischen Protein
	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX1081	Deletion der Pyruvat-Decarboxylase
	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX1122	Deletion der Acetaldehyd-Dehydrogenase
	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX2018	Deletion der Acetaldehyd-Dehydrogenase
	<i>G. oxydans</i> 621H Δ <i>upp</i> ΔGOX0413	Deletion der Acetyl-CoA-Synthetase

In Tabelle 4 sind alle Integrationsmutanten aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden.

Tabelle 4: Alle Integrationsmutanten dieser Arbeit

Genotyp	Eigenschaften
<i>G. oxydans</i> BP.8.1 Δ<i>madh</i>::<i>sldAB</i>	Integrationsmutante BP.8.1 mit <i>sldA</i> und <i>sldB</i> im ehemaligen Locus der Alkohol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> BP.9 Δ<i>madh</i>::<i>sldAB</i>	Integrationsmutante BP.9 mit <i>sldA</i> und <i>sldB</i> im ehemaligen Locus der Alkohol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> BP.9: Δ<i>madh</i>::<i>madh</i> (Abk.: <i>G. oxydans</i> BP.9:ADH)	Integrationsmutante BP.9 mit reintegrierter Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 GOX1068)

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit untersuchten Expressionsstämme metagenomischer Dehydrogenasen aufgelistet.

Tabelle 5: Expressionsstämme metagenomischer Dehydrogenasen mit Abkürzungen für die wichtigsten

Abk.:	Genotyp	Beschreibung
	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF01979c +01982c	BP.9 mit metagenomischem ORF ORF01979c + ORF01982c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
mmGDH	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORFB04323c	BP.9 mit metagenomischem ORF ORFB04323c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORFB08389c +08393c	BP.9 mit metagenomischem ORF ORFB08389c + ORF08393c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
mPQQ4	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF08606c	BP.9 mit metagenomischem ORF ORF08606c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
msldAB	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORFB09566c +09576c	BP.9 mit metagenomischen ORF ORFB09566c + ORF09576c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF11493	BP.9 mit metagenomischem ORF ORF11493 unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORFB12596 +12603+12605	BP.9 mit metagenomischem ORF ORFB12596 + ORF12603 + ORF12605 unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
mmDLDH	<i>G. oxydans</i> BP.10:pADH_ORF18630c	BP.10 mit metagenomischem ORF ORF18630c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
mmADH	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF23512c +23506c	BP.9 mit metagenomischem ORF ORF23512c + ORF23506c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
mmAcDH	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF023808c +023814c+023816c	BP.9 mit metagenomischem ORF ORF023808c + ORF023814c + ORF023816c unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF25760	BP.9 mit metagenomischem ORF ORF25760 unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2
	<i>G. oxydans</i> BP.9:pADH_ORF25756+25760	BP.9 mit metagenomischen ORF ORF25756 + ORF25760 unter Kontrolle des ADH-Promoters in Plasmid pMM2

2.2.2. Nährmedien

2.2.2.1. Nährmedium für *G. oxydans*

G. oxydans wurde in einem Vollmedium nach Buchert und Viikari (1988) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen angezogen. Jedes Vollmedium enthielt: 5,0 g L⁻¹ Hefeextrakt, 3,0 g L⁻¹ Trypton, 10 µM Thymidin und 50 mM einer Kohlenstoffquelle. Der pH wurde mit 6 M HCl auf 6,0 eingestellt. Für Festmedien wurden 15 g L⁻¹ Agar dem Medium hinzugefügt. Die Standardkohlenstoffquellen waren Mannitol, Glucose oder Fructose. Mannitol wurde mit dem Medium autoklaviert. Fructose, Glucose und alle anderen Kohlenstoffquellen sowie weitere Zusätze wie Antibiotika oder Thymidin wurden nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte 10x bzw. 1000x Lösung hinzugegeben.

2.2.2.2. Luria-Bertani Medium für *E. coli*

E. coli Kulturen wurden in LB-Medium wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, angezogen. Dieses enthielt 10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt und 10 g L⁻¹ NaCl. Für Festmedien wurde dem Medium 15 g L⁻¹ Agar hinzugefügt. Weitere Zusätze wurden nach dem Autoklavieren in sterilfiltrierten 1000x Lösungen dem Medium hinzugefügt.

2.2.2.3. Medienzusätze

Tabelle 6: In der Arbeit verwendete Medienzusätze mit Angabe der Endkonzentration und Verwendungszweck.

Medienzusatz	Endkonzentration	Verwendungszweck
Kanamycin	50 µg mL ⁻¹	zur Selektion von pAJ63a und pCR4
Cefoxitin	60 µg mL ⁻¹	zur Selektion von <i>G. oxydans</i>
5-Fluorouracil	60 µg mL ⁻¹	zur Selektion von <i>G. oxydans</i> Δ ^{upp}
Thymidin	10 µM	zur Komplementierung von Δ ^{upp}
Chloramphenicol	12,5 µg mL ⁻¹	zur Selektion von pCC1FOS™ (gelöst in 70 % Ethanol)

In Tabelle 6 sind die in der Arbeit verwendeten Medienzusätze aufgelistet.

2.2.3. Zellanzucht

2.2.3.1. Zellanzucht von *G. oxydans*

Vorkulturen von *G. oxydans* wurden vom Glycerinstock aerob in Schrägagarröhrchen mit 5 mL flüssigem Fructose-Vollmedium über Nacht bis maximal 48 h auf einem Schüttelinkubator der Firma Infors HT (Bottmingen, Schweiz) mit 2 cm Auslenkung in 45° Schräglage bei 30 °C und 180 min⁻¹ angezogen. Diese Vorkultur wurde als Inokulum für die Hauptkulturen von Wachstumsversuchen etc. verwendet, die, wenn nicht anders erwähnt, in 250 mL Kulturkolben mit Schikanen mit max. 10 % Füllvolumen ebenfalls bei 30 °C und 180 min⁻¹ auf einem Schüttelinkubator der Firma Infors HT (Bottmingen, Schweiz) mit 5 cm Auslenkung angezogen wurden. Die Zellanzucht auf festen Agarnährböden erfolgte bei 30 °C so lange, bis die Kolonien gut sichtbar waren (über Nacht bis 5 Tage).

2.2.3.2. Zellanzucht von *E. coli*

Die Zellanzucht von *E. coli* erfolgte aerob in Schrägagarröhrchen mit flüssigem LB-Medium über Nacht auf einem Schüttelinkubator der Firma Infors HT (Bottmingen, Schweiz) mit 2 cm Auslenkung in 45° Schräglage bei 37 °C und 180 min⁻¹. Die Kultivierung auf festen Nährböden erfolgte ebenfalls über Nacht bei 37 °C.

2.2.4. Stammhaltung und Reinheitskontrollen

G. oxydans-Zellen wurden zur Konservierung in 5 mL Fructose-Vollmedium für 48 h gemäß 2.2.3.1 angezogen. Nach der Inkubation wurden 1,6 mL autoklaviertes Glycerin dem Medium steril hinzugegeben und der Ansatz vermischt. In 1 mL Portionen konnten die Zellen dann bei -80 °C gelagert werden. Bei *E. coli* wurde ähnlich verfahren, nur dass die Zellen bereits nach einer Inkubation über Nacht eingefroren werden konnten. Die Reinheit der Glycerinstocks wurde durch Vereinzelung, mikroskopische Untersuchungen mittels Phasenkontrastmikroskop der Firma Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland) und PCR überprüft.

2.2.5. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde zur Zellkonzentrationsbestimmung in Flüssigkultur mit einem UV/Vis Spektrometer Ultrospec 2100 pro der Firma GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) gemessen. Als Nullwert diente unbeimpftes Medium. Um die Linearität zwischen Zellkonzentration und optischer Dichte zu gewährleisten, wurden Proben mit einer höheren optischen Dichte als 0,5 mit unbeimpftem Medium um den Faktor 10 verdünnt.

2.2.6. Transformation von Plasmiden in *E. coli*

2.2.6.1. Vorbereitung von *E. coli* Zellen für das Hitzeschockverfahren

Um Plasmide in *E. coli* wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben zu transformieren, wurde in dieser Arbeit mit dem Hitzeschockverfahren gearbeitet. *E. coli*-Zellen einer Übernachtvorkultur wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 angezogen. Zunächst wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 x g und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde durch eine 30-minütige Inkubation mit 50 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ vorsichtig gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 mL kaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und mit 2 mL 80 % Glycerin gemischt. In 200 µL Portionen aufgeteilt, wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2. Transformation mittels Hitzeschock

200 µL der für das Hitzeschockverfahren vorbereiteten Zellen wurden schonend auf Eis für 5 min aufgetaut und anschließend mit dem Ligationsansatz oder mit 150 ng des zu transformierenden Plasmides vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 90 s bei 42 °C unterzogen und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µL LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C 1 h geschüttelt revitalisiert. Nachdem durch diesen Schritt die Antibiotikaresistenz des Plasmids ausgebildet

werden konnte, wurden die Zellen über Nacht auf LB-Platten mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin ausplattiert. So wurden Zellen mit den Plasmiden pAJ63a bzw. pCR4 auf Grund der darin enthaltenen Antibiotikaresistenzen selektiert.

2.2.7. Konjugation

Die Konjugation von pAJ63a in *G. oxydans* erfolgte mittels modifiziertem „triparentalem mating“ nach Goldberg und Ohman (1984) und Hölscher und Görisch (2006). Plasmide, auf denen sich eine *mob*-Region befindet, können durch Konjugation in *G. oxydans* übertragen werden. Voraussetzung dafür ist ein Helferstamm, der ein Plasmid besitzt, welches die Bildung des RP4 Apparats ermöglicht. *E. coli* HB101 besitzt dieses Plasmid pRK2013. pRK2013 wird vom Helferstamm auf den Donorstamm übertragen. Dieser kann anschließend das Plasmid mit der *mob*-Region mit Hilfe des RP4 Apparats auf den Akzeptor *G. oxydans* übertragen. Um die Konjugation durchzuführen, wurden *G. oxydans*, *E. coli* HB101 und der *E. coli* DH5 α Stamm, der das zu übertragende Plasmid enthält, über Nacht angezogen (2.2.3.1 bzw. 2.2.3.2). Die beiden *E. coli*-Stämme mussten zur Plasmiderhaltung auf LB-Medium mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin angezogen werden. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur in 250 mL Schikanekolben mit 20 mL *G. oxydans*-Medium auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,9 für Zellen auf Mannitol und 0,6 für Zellen auf Fructose angezogen. Die *E. coli*-Zellen wurden ein bzw. zwei Stunden nach der Inokulation von *G. oxydans* auf OD_{600} 0,1 in einer 5 mL Kultur angeimpft. War die OD_{600} für *G. oxydans* erreicht, wurden auch die optischen Dichten der *E. coli* Stämme bestimmt. Anschließend wurden Donor- und Helferstamm zusammengemischt und die Volumen der Zellsuspensionen so gewählt, dass die Zellmengen einer OD_{600} von 0,76 für den Donorstamm und einer OD_{600} von 0,8 für den Helferstamm auf 1 mL entsprechen. Die vermischten Zellen wurden bei 10°C und $1800 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Die Zellsuspension wurde in LB ohne Antibiotika gewaschen und danach mit der Zellmenge an Akzeptorstamm gemischt, die einer OD_{600} von 3,7 bei 1 mL entspricht. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die Zellsuspension in

800 μL *G. oxydans* Vollmedium resuspendiert und tröpfchenweise auf eine Vollmediumplatte ohne Antibiotika gegeben. Nach dem die Zellsuspension getrocknet war, wurde die Platte für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschwemmt und auf einer Vollmediumplatte mit 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin und 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Cefoxitin bei 30 °C für bis zu 5 Tage auf *G. oxydans*-Zellen mit konjugiertem Plasmid selektiert. Eine Vereinzelung der Klone mit einem Zahnstocher auf Vollmediumplatten mit Kanamycin verringerte die Kontamination mit spontan cefoxitinresistenten *E. coli*-Helferstammklonen.

2.2.8. Deletion von Genen in *G. oxydans* mittels homologer Rekombination

Zur Deletion von Genen in *G. oxydans* wurde ein markerloses *in frame*-Deletionssystem benutzt, in dem 5-Fluorouracil zusammen mit einer plasmidkodierten Uracilphosphoribosyltransferase (*upp*) als Gegenselektionsmethode dient (Junker 2012; Peters *et al.* 2013a). Zur Deletion wurden zwei 1 kbp große Flanken des zu deletierenden Gens mit einer LFH-PCR amplifiziert und fusioniert (2.1.5.3). Mit den äußeren Primern wurden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen eingeführt, die in den Flanken nicht schneiden und zur in Abbildung 2 dargestellten *multiple cloning site* (MCS) von pAJ63a passen.

```

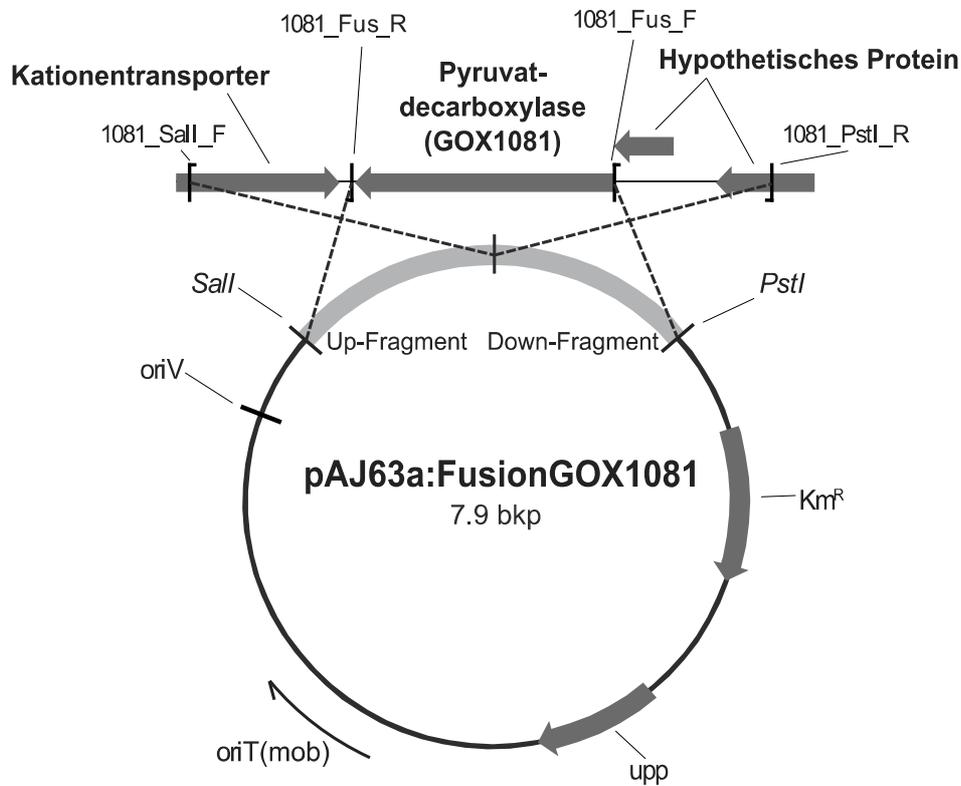
5601  EcoRI  SmaI  XbaI  SalI  PstI  HindIII
      ATTACGAATT CGAGCTCGGT ACCCGGGGAT CCTCTAGAGT CGACCTGCAG GCATGCAAGC TTGGCACTG
      TAATGCTTAA GCTCGAGCCA TGGGCCCTA GGAGATCTCA GCTGGACGTC CGTACGTTTC AACCGTGAC
  
```

Abbildung 2: Die *multiple cloning site* (MCS) von pAJ63a mit allen einmal vorkommenden Restriktionsschnittstellen

Das Fusionskonstrukt wurde mit den zu den Stellen passenden Restriktionsenzymen hydrolysiert (2.1.4.1) und anschließend in einen ebenfalls verdauten, dephosphorylierten (2.1.4.2) pAJ63a Vektor ligiert (2.1.4.3). Anschließend erfolgte eine Transformation in *E. coli* DH5 α (2.2.6). Wurde die Transformation durch eine Kolonie-PCR (2.1.5.2) mit den äußeren Primern der LFH-PCR und durch eine Sequenzierung des isolierten Plasmids (2.1.2.2) bestätigt, erfolgte die Konjugation (2.2.7) in *G. oxydans* 621H Δupp (wt) oder eine

seiner Mutanten. Durch die homologen Flanken der integrierten DNA im Vektor konnte pAJ63a in das Genom von *G. oxydans* integrieren.

a



b

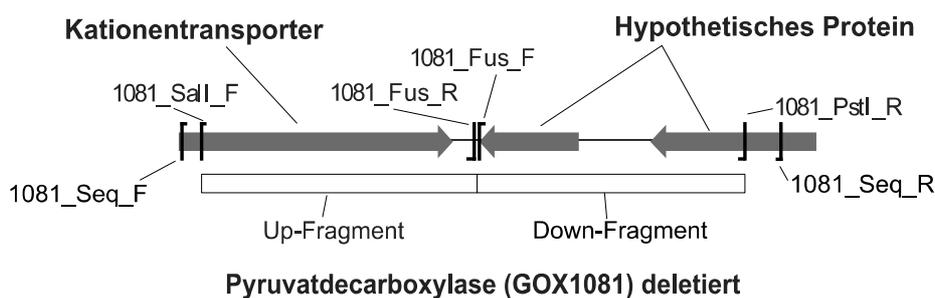


Abbildung 3: Beispieldeletionschema siehe auch Peters *et al.* (2013a) für die Deletion der Pyruvat-Decarboxylase (GOX1081). Das Up-Fragment (1079 bp) wurde mit den Primern 1081_SalI_F und 1081_Fus_R, das Down-Fragment (1051 bp) mit den Primern 1081_Fus_F und 1081_PstI_R amplifiziert. Durch den Primer 1081_SalI_F wurde eine Schnittstelle für *SalI* durch 1081_PstI_R eine Schnittstelle für *PstI* eingeführt. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit 1081_SalI_F und 1081_PstI_R wurde das Fusionskonstrukt (2130 bp) erstellt. Dieses wurde anschließend in die MCS von pAJ63a ligiert und ergab pAJ63a:FusionGOX1081 (a). Durch homologe Rekombination (gestrichelte Linie) integrierte das Plasmid in das Chromosom. Durch die zweite homologe Rekombination wurde das Gen deletiert. Die Deletion (b) wurde mit den Primern 1081_Seq_F und 1081_Seq_R nachgewiesen.

In Abbildung 3a ist ein Fusionsvektor am Beispiel von pAJ63a:FusionGOX1081 gezeigt und über welche homologen Bereiche eine Integration in das Genom möglich ist. Nachdem die Konjugation und Integration des Plasmids durch zwei Kolonie-PCRs mit chromosomalen Deletionsüberprüfungsprimern und den jeweiligen äußeren Primern für die LFH-PCR verifiziert worden war, wurden die Integranten auf Vollmediumplatten mit $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ 5-Fluorouracil ausgestrichen. Nach 2-5 Tagen wurden die gewachsenen Klone wieder mittels Kolonie-PCR und den Deletionsüberprüfungsprimern für das jeweilige Gen überprüft und die Deletionsmutanten (Abbildung 3b) von den Wildtypen (Revertanten) isoliert.

2.2.9. Integration von Genen mittels homologer Rekombination

Die markerlose Integration eines Genes kann mit dem Deletionsystem auf demselben Weg erfolgen wie eine Deletion. Soll ein Gen an die gleiche Stelle gesetzt werden, von der es in einem früheren Stamm deletiert wurde, wird nur der Schritt der LFH-PCR durch eine normale PCR-Reaktion ersetzt, die die zwei 1 kbp Flanken und das dazwischen liegende Gen amplifiziert. Soll ein Gen an eine andere Stelle im Genom gesetzt werden, werden die Flanken der Zielstelle, ähnlich einer LFH-PCR, amplifiziert. Die Fusionsprimer entsprechen nun allerdings nicht den Flankenenden, sondern den Enden des zu integrierenden Gens, wie in Abbildung 4 anhand der Integration der Polyol-Dehydrogenase in den Locus der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase gezeigt (Primer *fusup2sldAB_rev* und *fusdo2sldAB_fwd*). Das zu integrierende Gen wurde wiederum mit Primern amplifiziert, die homologe Enden zu den Enden der Flanken haben (*fusup2sldAB_fwd* und *fusdo2sldAB_rev*). Es hat sich gezeigt, dass sich in einer einzigen Fusions-PCR mit den beiden äußersten Primern der Flanken (*up_GOX1068-7_fwd* und *do_GOX1068-7_rev*) alle drei Fragmente verbinden lassen und so ein lückenloses Fusionskonstrukt von zwei Genflanken mit einem völlig anderen Gen dazwischen entsteht. Wurde nun dieses oder das vorher genannte Konstrukt in pAJ63a ligiert, konnte eine Integration von Genen in *G. oxydans* auf demselben

Weg erfolgen, wie eine Deletion. Die Integration wurde mit chromsomalen Überprüfungsprimern (IC_GOX1068-7_f2 und IC_GOX1068-7_r4) überprüft.

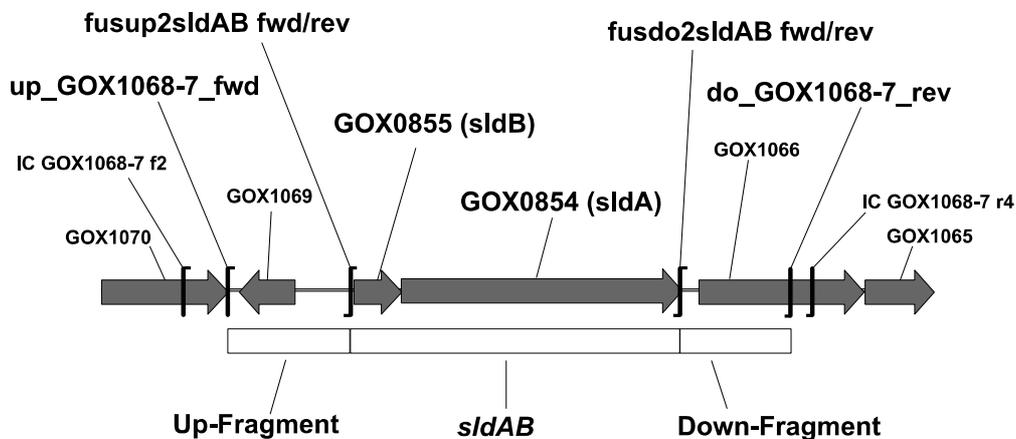


Abbildung 4: Polyol-Dehydrogenase (GOX0854 GOX0855) integriert in den Locus der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 GOX1068). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX1068-7_fwd und fusup2sldAB_rev, das sldAB-Fragment (2612 bp) mit fusup2sldAB_fwd und fusdo2sldAB_rev und das Down-Fragment (490 bp) mit fusdo2sldAB_fwd und do_GOX1068-7_rev amplifiziert. Die Fusion (4102 bp) erfolgte mit allen drei Fragmenten gleichzeitig durch Amplifikation mit den Primern up_GOX1068-7_fwd und do_GOX1068-7_rev. Mit up_GOX1068-7_fwd wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit do_GOX1068-7_rev eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt.

2.2.10. Wachstumsexperimente

2.2.10.1. Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Um zu bestimmen, welche Kohlenstoffquellen von *G. oxydans* und den aus ihm abgeleiteten Mutanten zum Wachsen verwendet werden können, wurde das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen in Schrägagarröhrchen mit 5 mL Inhalt, 45° Neigung, 180 min⁻¹ und Vollmedium (2.2.2.1) mit 50 mM Kohlenstoffquelle untersucht. Dazu wurde eine Hauptkultur mit *G. oxydans* in 50 mM Fructose über Nacht angezogen (2.2.3.1) und anschließend bei 1800 x g und 10 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Vollmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend in so viel Vollmedium ohne Kohlenstoffquelle resuspendiert, dass die OD₆₀₀ bei 0,1 lag und das Volumen ausreichte, um alle Schrägagarröhrchen mit 4,5 mL zu füllen. Anschließend wurde die Suspension in die Röhrchen verteilt und 0,5 mL der Kohlenstoffquellen in sterilfiltrierten 10x Lösungen zugegeben. Die OD₆₀₀ wurde nach 48 h bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Kohlenstoffquelle.

2.2.10.2. Wachstumskurven

Das Wachstumsverhalten von *G. oxydans* und den daraus abgeleiteten Mutanten wurde in Wachstumsexperimenten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Dazu wurden Hauptkulturen von *G. oxydans* mit Mannitol, Glucose oder Fructose als Kohlenstoffquelle gemäß 2.2.3.1 angezogen. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (2.2.5) wurde bei der Inokulation der Hauptkultur und nach 3 h in Intervallen von 1,5 h bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase gemessen. Anschließend wurde die OD₆₀₀ nur noch nach 12 h, 24 h, 28 h, 32 h und 48 h bestimmt. Nach 48 h wurde der Versuch beendet und eine Probe zur Bestimmung der Metabolitkonzentrationen genommen.

2.3. Analytik

2.3.1. Enzymatische Metabolitkonzentrationsbestimmung

Die Acetat- und Pyruvatkonzentrationen, die während der Wachstumsexperimente zur Untersuchung des Acetatstoffwechsels entstanden, wurden mit Hilfe des ‚pyruvic acid assay kits‘ bzw. des ‚acetic acid acetyl-CoA-synthetase (ACS) kits‘ von Megazyme (Wicklow, Irland) bestimmt. Dafür wurden die als Probe genommenen Zellsuspensionen 10 min bei 17400 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung gemäß den Herstellerangaben verdünnt.

2.3.2. HPLC-Analytik

Die Acetat-, Gluconat- und 2-Ketogluconatkonzentrationen, die während der Wachstumsexperimente zur Untersuchung der Multideletionsmutanten entstanden sind, wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Hierfür wurde ein ICS-3000 HPLC-System von Dionex (Sunnyvale, USA) mit einer IonPac AS-11 HC Säule zur Trennung von Anion verwendet. Die Detektion erfolgte durch die Messung der Leitfähigkeit. Eluiert wurde mit Hilfe eines NaOH-Gradienten bei einem Fluss von 0,38 mL min⁻¹ (siehe Tabelle 7). Mit diesem Gradienten konnten bei einer Retentionszeit von

3,6 min Acetat und Gluconat und bei 4,6 min 2-Ketogluconat detektiert und jeweils mit einer Kalibriergeraden die Konzentration bestimmt werden. Da Acetat und Gluconat bei diesem System zur gleichen Zeit eluieren, wurden nach Wachstumsexperimenten mit Glucose, bei denen beide Metabolite erwartet werden, die Acetatkonzentrationen mittels Enzymkit bestimmt (2.3.1). Anschließend wurde die ermittelte Acetatkonzentration in die resultierende *Peak*-Fläche umgerechnet und diese Fläche von der Gesamtfläche des Acetat/Gluconat-*Peaks* abgezogen. Die übrige Fläche wurde mit Hilfe einer Gluconatkalibriergeraden in eine Gluconatkonzentration umgerechnet.

Tabelle 7: HPLC Gradientenprogramm zur Auftrennung von Anionen

Zeitspanne [min]	NaOH-Konzentration [mM]	
0-8	1	Konstant
8-18	1-15	Linearer Gradient
18-28	15-30	Linearer Gradient
28-38	30-60	Linearer Gradient
38-40	60	Konstant
40-40,1	60-1	Linearer Gradient
40,1-53,5	1	Konstant

2.3.3. Enzymtest zur Messung der Aktivität membranständiger Dehydrogenasen mittels Aufreinigung der Membranfraktion

Zur Messung der Aktivität membranständiger Dehydrogenasen ist es möglich, die Elektronen, die bei der Oxidation von Substraten generiert werden, mit Hilfe des Elektronenüberträgers Phenazinmethosulfat (PMS) auf einen künstlichen Elektronenakzeptor Dichlorphenolindophenol (DCPIP) zu übertragen. Die Reduktion von DCPIP kann bei einer Wellenlänge von 578 nm oder 530 nm durch Abnahme der Absorption verfolgt werden.

2.3.3.1. Präparation der Membranfraktion von *G. oxydans*

Da sich die membranständigen Dehydrogenasen in der cytoplasmatischen Membran oder im Periplasma der Zelle befinden, muss diese Fraktion für eine Aktivitätsbestimmung zunächst aus der Zelle isoliert werden. Dafür wurde eine 300 mL Kultur mit Fructose-Vollmedium in einem 3 L-Kolben mit Schikanen mit den Zellen einer kompletten Übernacht-Hauptkultur

angeimpft und über Nacht auf eine OD_{600} von 0,5 - 0,6 angezogen. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation bei $10800 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min. Die Zellen wurden zweimal mit 10 mM Tris-HCl pH 7,2 gewaschen und in 10 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Zellaufschluss durch zwei *French Pressure Cell*-Passagen mit 1100 psig in einem Gerät von American Instruments Company (Silver Spring, USA). Danach wurden die Zelltrümmer durch eine 20-minütige Zentrifugation bei $15000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgetrennt. Die Membranfraktion wurde mittels 2-stündiger Ultrazentrifugation bei $100000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ von der cytoplasmatischen Fraktion getrennt. Das Membranpellet wurde vorsichtig in 10 mL Tris-HCl pH 7,2 resuspendiert und erneut bei $100000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 650 μL Tris-HCl gelöst und auf Eis bis zur sofortigen Aktivitätsbestimmung gekühlt.

2.3.3.2. **Aktivitätsmessung von Membranfraktionen mittels DCPIP-PMS-Reduktionsverfolgung**

Für die Aktivitätsmessung von Membranfraktionen wurden ein *Mastermix* mit 195 μM DCPIP und 130 μM PMS in MacIlvaine Puffer pH 5,0 (103 mM Na_2PO_4 , 48,5 mM Citrat) angesetzt. Die zu testenden Substrate wurden in 250 mM Lösungen hergestellt. Die Messung erfolgte bei 530 nm in einem FL600 Mikrotiterplattenphotometer der Firma BioTek (Winooski, USA) in 96-Well-Mikrotiterplatten. Pro Well wurden 179 μL DCPIP-PMS-*Mastermix* und 1 μL Membranfraktion vorgelegt. Die Reaktion wurde mit 20 μL Substrat gestartet und 2 h bei 30°C durch eine automatische Absorptionsmessung alle 2 min verfolgt. Vor jeder Messung wurde die Platte automatisch auf höchster Stufe geschüttelt.

2.3.4. **Test zur Messung der Aktivität membranständiger Dehydrogenasen in ganzen Zellen**

Die Aktivitätsmessungen mittels PMS und DCPIP ist auch mit ganzen Zellen möglich, wenn die Reaktionsbedingungen dahin optimiert werden.

2.3.4.1. Vorbereitung der Zellen

Für den DCPIP-Assay mit ganzen Zellen wurden *G. oxydans* Zellen in Schrägagarröhrchen wie eine Vorkultur mit 5 mL Fructose-Medium bis zur späten stationären Phase 48 h lang angezogen. Die Zellen wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 10 °C geerntet. Das Volumen wurde dabei so gewählt, dass die optische Dichte bei Resuspendierung der Zellen in 1 mL einer OD₆₀₀ von 4 entsprechen würde. Anschließend wurden die Zellen in Phosphatpuffer pH 5,0 (66,1 mM KH₂PO₄ und 0,8 mM Na₂HPO₄) gewaschen und in 1 mL dieses Puffers resuspendiert. Die Zellen wurden im Kühlschrank für maximal 12 h gelagert.

2.3.4.2. Messung der DCPIP-PMS Reduktion an ganzen Zellen

Für die Aktivitätsmessung in ganzen Zellen wurde ein *Mastermix* mit 195 µM DCPIP und 130 µM PMS in Phosphatpuffer pH 5,0 (66,1 mM KH₂PO₄ und 0,8 mM Na₂HPO₄) angesetzt. Die zu testenden Substrate wurden in 250 mM Lösungen hergestellt. Die Messung erfolgte bei 530 nm in einem FL600 Mikrotiterplattenphotometer der Firma BioTek (Winooski, USA) in 96-Well-Mikrotiterplatten. Pro *Well* wurden 170 µL DCPIP-PMS-*Mastermix* und 10 µL Zellen vorgelegt. Die Reaktion wurde mit 20 µL Substrat gestartet und 2 h bei 30 °C durch eine automatische Absorptionsmessung alle 2 min verfolgt. Vor jeder Messung wurde die Platte automatisch auf höchster Stufe geschüttelt.

2.4. Arbeitsmethoden zur Metagenombankerstellung

2.4.1. Kultivierung einer Essigmutter

War keine Isolation von DNA aus einer Essigmutter möglich, wurde versucht, die Isolation der DNA durch eine Kultivierung, die den Biofilm lockern oder störende Inhaltsstoffe verdünnen könnte, zu ermöglichen. Dazu wurde ein kleines Stück der Ausgangsessigmutter in einen 2 L Fernbachkolben mit 500 mL rotem oder weißen Wein, Wein / sterilem Leitungswasser 1:1 gemischt, Traubensaft, Traubensaft / sterilem Leitungswasser 1:1 gemischt oder „Neuem Wein“ (Federweißer rot oder weiß) bzw. „Neuem Wein“ / sterilem

Leitungswasser 1:1 gemischt gegeben. Der ganze Ansatz wurde mit einem Haushaltstuch und Klebestreifen für einen guten Luftaustausch verschlossen und für 1 - 4 Monate bei 30 °C an einem geschützten Ort unbewegt inkubiert.

2.4.2. Isolation von DNA aus einer Essigmutter

Die Isolation der metagenomischen DNA aus einer Essigmutter erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Mamlouk *et al.* (2011). In diesem Protokoll werden Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) benutzt, um störende Exopolysaccharide und Polyphenole von der DNA zu trennen. Zur Isolation wurde 1 g einer Essigmutterprobe mit Hilfe von flüssigem Stickstoff mit einem Mörser gemahlen und mit einer 2 %igen PVP Lösung gewaschen. PVP wurde durch das Waschen mit H₂O_{dest.} wieder entfernt und die gemahlene Essigmutter in 1 mL saliner EDTA (0,15 M NaCl + 0,1 M EDTA pH 8,0) gelöst. Die Zellen wurden mit 0,8 mg Lysozym und 0,8 mg RNase A bei 37 °C für 30 min verdaut. Anschließend wurden 0,2 mg Proteinase K hinzugeben und der ganze Ansatz nochmals bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 50 µL einer 20 %igen Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Lösung und anschließender Inkubation bei 65 °C für 10 min wurden Zellreste und Proteine mit 180 µL einer 5 M Natriumacetatlösung und mit 50 µL einer 2 %igen CTAB-Lösung präzipitiert. Der Überstand mit der enthaltenen DNA wurde anschließend durch Zugabe einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) gewaschen und die DNA durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol gefällt. Isopropanolreste wurden durch Waschen des DNA-Pellets mit 70 % Ethanol entfernt und das Pellet nach Trocknung an der Luft in 80 µL H₂O_{dest.} gelöst.

2.4.3. Bestimmung der Diversität

Zur Bestimmung der Diversität wurden die 16S rDNA-Bereiche der Spezies in der Essigmutter amplifiziert. Dazu wurden universelle 16S rDNA Primer 616Valt und 100K nach Ludwig *et al.* (2011) in einer konstruierenden PCR mit der aus der Essigmutter isolierten

DNA als PCR-Vorlage verwendet. Anschließend wurde das Amplifikat gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des ‚TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing‘ von Invitrogen (Carlsbad, USA) in den Vektor pCR4 kloniert, die Klone vereinzelt und 96 verschiedene Klone zur beidseitigen Sequenzierung der enthaltenen Amplicons an GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) geschickt. Die beiden dabei identifizierten Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärts-Leserichtungen wurden mit dem Programm ‚merger‘ des EMBOSS Software-Pakets (Rice *et al.* 2000) verbunden und anschließend mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Zuerst wurden alle Sequenzen mit dem Programm BLAST mit Sequenzen der nt-Datenbank von NCBI verglichen (siehe 2.5.1). Das Ergebnis wurde mit MEGAN4 (Huson *et al.* 2011), einem Programm, das die Ergebnisdatei des BLAST-Laufes analysiert und die besten Treffer in einem Kladogramm darstellt, visualisiert. Eine weitaus genauere, aber auch langsamere Methode war die Erstellung eines phylogenetischen Baumes mit dem Programm ARB (Ludwig *et al.* 2004). Dieses Programm erstellt ein multiples *Alignment* aller 16S rRNA Sequenzen auf Basis von bekannten Sequenzen und errechnet anschließend, mit Hilfe der *Maximum-likelihood*-Methode, aus diesen und vielen weiteren rRNA-Sequenzen des SILVA rRNA Datenbankprojekts (Pruesse *et al.* 2007) einen phylogenetischen Baum, aus dem abzulesen ist, in welchen phylogenetischen Ast sich die unbekannt Sequenzen und dadurch auch die Mitglieder der Essigmutter einordnen lassen.

2.4.4. Erstellung und Sequenzierung der Metagenombank

Die Metagenombank wurde mit Hilfe des ‚CopyControl™ Fosmid Library Production Kits with pCC1FOS™ Vector‘ von Epicentre (Madison, USA) erstellt. In diesem Kit werden gescherte ca. 40 kbp große Fragmente zunächst repariert, dann mit dem Fosmidrückgrat des pCC1FOS™ Vector ligiert und anschließend in nicht vermehrungsfähige Lambda-Phagen verpackt, die wiederum *E. coli* Zellen infizieren, wodurch die *E. coli* Zellen nur ein Fosmid pro Zelle aufnehmen. Das Fosmid wird auf Grund der Selektion auf seine Antibiotikaresistenz weitervererbt. Ein Klon repräsentiert somit einen bestimmten Sequenzbereich. Die Erstellung

wurde gemäß den Herstelleranweisungen ohne eine Scherung der DNA durchgeführt. Für die Essigmutter EI wurden 2016 *Escherichia coli* EPI300-T1^R Klone, die ein pCC1FOSTM-Fosmid mit ca. 40 kbp großen Fragmenten an metagenomischer DNA trugen, in 96-well-Mikrotiterplatten in LB-Medium mit Chloramphenicol 12,5 µg mL⁻¹ über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden anschließend in 10 % DMSO bei -80 °C konserviert. Aus 570 Fosmiden wurde in zwei Sequenzierschritten mit je ca. 280-290 Klonen die Sequenz der 40 kbp Fragmente bestimmt und zu längeren Sequenzabschnitten (*contigs*) assembliert. Die Sequenzierung und die Assemblierung wurden vom Göttingen Genomics Laboratory (G2L) des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen (Göttingen, Deutschland) mittels 454 Sequenzierung durchgeführt.

2.4.5. Expression von membranständigen Dehydrogenasen

Zur Expression von metagenomischen membranständigen Dehydrogenasen wurde ein plasmidgestütztes Expressionssystem für *G. oxydans* 621H verwendet (Mientus *et al.* 2013). Dieses Expressionssystem verwendet ein Vektor (pADH), in dem die native Promotorregion der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067; GOX1068) enthalten ist. Eingebachte Gene für membranständige Dehydrogenasen werden dann unter Kontrolle dieses konstitutiven Promotors exprimiert. Die Gene metagenomischer Dehydrogenasen wurden unter Vorlage der aus der Essigmutter isolierten DNA mittels einer konstruierenden PCR (2.1.5.1) amplifiziert. Für die Ligation wurde eine Methode nach Tillett und Neilan (1999) verwendet, die enzymfreies Klonieren genannt wird. In dieser Methode wurde zunächst der Vektor von der Stelle, in die das Fragment kloniert werden soll, in zwei PCR Reaktionen amplifiziert und somit linearisiert. Die Primer wurden so gewählt, dass das Vektoramplifikat einer PCR-Reaktion dabei *upstream* von der Klonierungsstelle 20 bp und *downstream* 16 bp kürzer (Produkt 2) ist als das der anderen PCR-Reaktion (Produkt 1). Das Klonierungsfragment wurde ebenfalls in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert, wobei hier eine PCR-Reaktion durch Anhängen der komplementären Sequenzen der *up-* und *downstream-*

Bereiche des Vektors an die PCR-Primer um 20 bp bzw. 16 bp verlängert wurde (Produkt 1 verlängert gegenüber Produkt 2). Anschließend wurden Vektoramplifikat und Klonierungsfragment in einem equimolaren Verhältnis zusammen mit einem Hybridisierungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) auf ein Volumen von 20 μ L aufgefüllt und in einer Hybridisierungsreaktion zusammengefügt. Diese Hybridisierungsreaktion wurde mit dem unten aufgeführten Hybridisierungs-Programm in einem Thermocycler FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt. Danach wurde 1 μ L des Ansatzes in für das Hitzeschockverfahren kompetente *E. coli* TOP10 –Zellen transformiert. Positive *E. coli*-Klone wurden durch Selektion auf 50 μ g mL⁻¹ Kanamycin durch Kolonie-PCR mit vektorspezifischen Primern und durch Verifikation der Sequenz mittels Sequenzierung ermittelt. Anschließend wurden die Vektoren mittels Konjugation in *G. oxydans* BP.9 oder BP.10 gebracht. Zur Plasmiderhaltung mussten die daraus resultierenden Expressionsstämme anschließend immer auf Fructose-Vollmedium mit 50 μ g mL⁻¹ Kanamycin kultiviert werden.

Hybridisierungs-Programm

Denaturierung	95 °C 3 min	
Hybridisierung I	65 °C 2 min	← 4 Zyklen
Hybridisierung II	55 °C 15 min	

2.5. *in silico*-Techniken

Für alle hier beschriebenen grundlegenden *in silico*-Techniken wurde ein Intel-PC mit OpenSUSE 11.3 64-Bit verwendet. Für einen Überblick über die Domänen und anderen strukturellen Elemente von *in silico*-untersuchten Proteinen wurde ein Internetangebot von InterProScan verwendet (Zdobnov und Apweiler 2001).

2.5.1. BLAST

Für alle bioinformatischen Aufgaben wurde ein lokales BLAST System der Version blast 2.2.26+ 64 Bit zusammen mit einer GenBank EMBL, DDBJ und PDB Sequenzdatenbank „nucleotide collection“ (nt) von NCBI vom 19.07.2012 für BLASTn-Alignments verwendet (Altschul *et al.* 1990). Für BLASTp-Alignments wurde die translatierte Datenbank „nr“ gleichen Datums verwendet.

2.5.2. Pfam-Scan

Für das Identifizieren von Pfam-Familien in membranständigen Dehydrogenasen wurde das lokale Programm „pfam_scan.pl“ verwendet, welches mit Hilfe von Hidden Markov Modellen Proteinsequenzen mit der Pfam A Datenbank für hoch qualitative und manuell kuratierte Sequenzen vom 07.07.2011 vergleicht, um Domänen der Proteine in die jeweiligen Pfam-Familien einzugliedern (Finn *et al.* 2010).

2.5.3. PSORTb

Um die Position einer membranständigen Dehydrogenase oder eines unbekanntes metagenomischen *open reading frames* (ORF) innerhalb der Zelle vorherzusagen, wurde eine lokale Version des Programms PSORTb verwendet (Yu *et al.* 2010). PSORTb sagt die Position eines Proteins innerhalb eines Gram-negativen Bakteriums voraus, indem es eine Vielfalt an Analysenmodellen, wie z.B. auf dem *Hidden Markov Model* basierende Methoden verwendet, die z.B. Transmembranhelices oder Signalpeptide identifizieren.

3. Ergebnisse

Da die heterologe Expression von membranständigen Dehydrogenasen oft problematisch ist, wird vermutet, dass spezielle Komponenten wie Kofaktoren oder Chaperone notwendig sind um diese Enzyme korrekt zu Assemblieren und in die Membran einzubauen. Aus diesem Grund wurde *G. oxydans* 621H als Expressionsstamm gewählt. Da dieser Stamm bereits eigene membranständige Dehydrogenasen besitzt, mussten diese für eine erfolgreiche Expression von metagenomischen Dehydrogenasen zunächst nach Möglichkeit deletiert werden, um eventuelle Störaktivität zu vermeiden.

3.1. Deletion aller membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H

Im Folgenden ist die Erstellung aller Mutanten aufgeführt. Mutanten, die für weitere Untersuchungen nicht verwendet wurden, sind nicht aufgezeigt, sondern werden nur im Anhang Tabelle 12 erwähnt. Alle analysierten Mutanten sind in Tabelle 3 (Material und Methoden 2.2.1) aufgelistet. Die Deletion der Gene der membranständigen Dehydrogenasen erfolgte mit dem upp-Deletionssystem (Material und Methoden 2.2.8) basierend auf dem Stamm *G. oxydans* 621H Δupp .

3.1.1. Deletion der Alkohol-Dehydrogenase

Als erste Dehydrogenase wurde die membranständige Alkohol-Dehydrogenase mit der großen PQQ abhängigen Untereinheit GOX1068 und der Cytochrom *c* Untereinheit GOX1067 entfernt. Da das Gen für das kleine 15kDa Protein AdhS (GOX0756) über 340 kbp *upstream* von den anderen Untereinheiten entfernt ist und somit eine separate Deletion erfordert hätte, wurde es im Genom belassen. Seine nicht eindeutig ausgeschlossene Funktion bei anderen Dehydrogenasen war ein weiterer Grund *adhS* nicht zu deletieren. In Abbildung 5 sind alle Primer zur Deletion der Alkohol-Dehydrogenase abgebildet. Der Bereich zwischen dem Up-Fragment und dem Down-Fragment wurde lückenlos vom Startcodon von GOX1068

bis zum Stopcodon von GOX1067 deletiert. Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern `up_GOX1068-7_fwd` und `up_GOX1068-7_rev`, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern `do_GOX1068-7_fwd` und `do_GOX1068-7_rev` amplifiziert. Die Fusion der Fragmente (2000 bp) erfolgte mit `up_GOX1068-7_fwd` und `do_GOX1068-7_rev`. Da sich im Amplicon des Down-Fragments eine zusätzliche *EcoRI* Restriktionsschnittstelle befand, verkürzte sich das Down-Fragment beim anschließenden Restriktionsverdau mit *XbaI* und *EcoRI* für die Ligation in *pAJ63a* auf 490 bp, was aber keinen Einfluss auf die Deletionseffizienz hatte. Die Integration des Plasmids in das Chromosom wurde mit den Primern `IC_GOX1068-7_f2` und `do_GOX1068-7_rev` bzw. `up_GOX1068_fwd` und `IC_GOX1068_r4` überprüft, die Deletion mit den Primern `IC_GOX1068-7_f2` und `IC_GOX1068-7_r4`. Da im deletierten Bereich keine Promotorregionen für angrenzende Gene erwartet wurden, konnten GOX1068 und GOX1067 komplett deletiert werden. Die Deletion wurde mittels Sequenzierung des Bereichs und einem Southern Blot verifiziert.

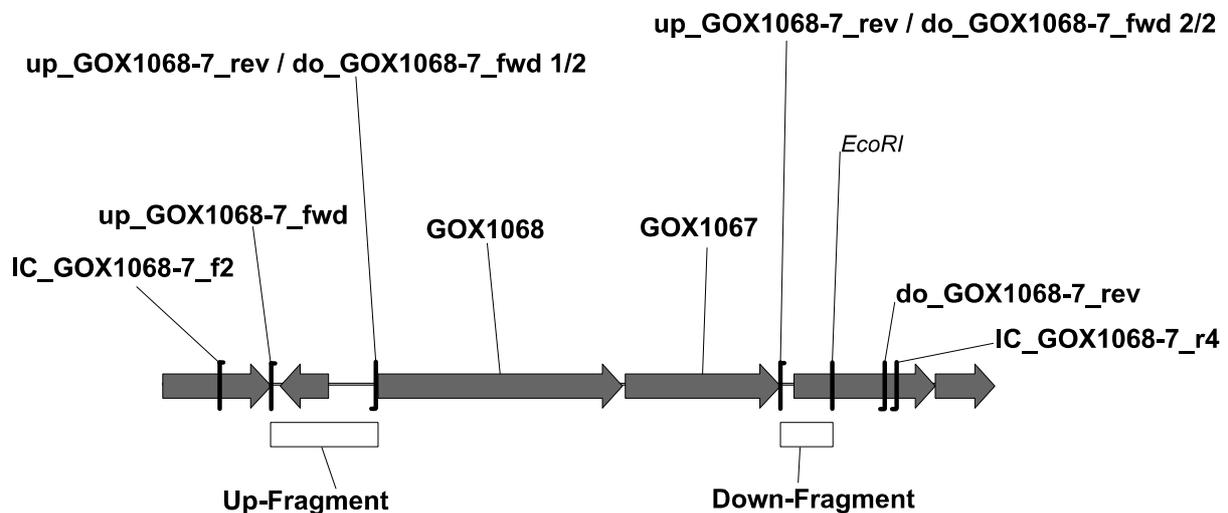


Abbildung 5: Strategie zur Deletion der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 und GOX1068). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern `up_GOX1068-7_fwd` und `up_GOX1068-7_rev`, das Down-Fragment (1000 bp später 490 bp) mit den Primern `do_GOX1068-7_fwd` und `do_GOX1068-7_rev` amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit `up_GOX1068-7_fwd` und `do_GOX1068-7_rev` wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp später 1490 bp) erstellt. Mit `up_GOX1068-7_fwd` wurde eine *XbaI*-Schnittstelle zur Ligation in *pAJ63a* eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde *pAJ63a:FusionGOX1068-7* genannt. Die Integration nach der Konjugation in *G. oxydans Δupp* wurde mit den Primern `IC_GOX1068-7_f2` und `do_GOX1068-7_rev`, sowie `up_GOX1068-7_fwd` und `IC_GOX1068-7_r4` überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern `IC_GOX1068-7_f2` und `IC_GOX1068-7_r4`.

Die daraus resultierende Mutante *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1067 Δ GOX1068 wurde *G. oxydans* BP.1 genannt.

3.1.2. Deletion der Inositol-Dehydrogenase

Als nächstes wurde die Inositol-Dehydrogenase, früher auch PQQ abhängige Dehydrogenase 1 genannt, deletiert. Die Deletion erfolgte analog zur ersten Deletion. Allerdings war diese Deletion die erste, die nicht nur im wildtypartigen *G. oxydans* Δ_{upp} , sondern auch in der Deletionsmutante *G. oxydans* BP.1 durchgeführt wurde, um hintereinander alle membranständigen Dehydrogenasen zu deletieren. In Abbildung 6 ist aufgezeigt, wie diese Deletion in beiden Ausgangsstämmen vorgenommen wurde. Auch hier musste auf Grund einer ausreichend langen intergenischen Region keine Rücksicht auf die umliegenden Gene genommen werden und die Dehydrogenase konnte komplett vom Start- bis zum Stopcodon deletiert werden. Daraus resultierten die Deletionsmutanten *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1857 und *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857, wobei letztere auch als *G. oxydans* BP.2 bezeichnet wurde.

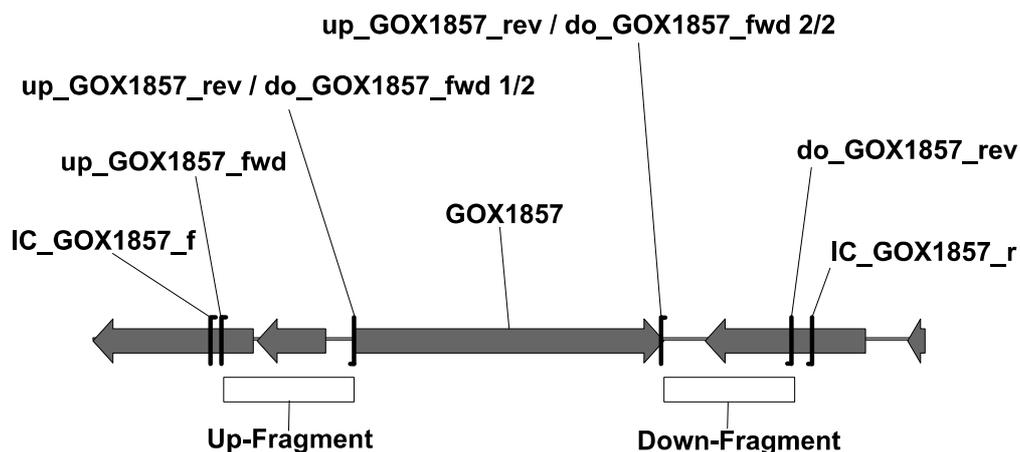


Abbildung 6: Strategie zur Deletion der membranständigen Inositol-Dehydrogenase (GOX1857). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX1857_fwd und up_GOX1857_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX1857_fwd und do_GOX1857_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX1857_fwd und do_GOX1857_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX1857_fwd wurde eine *Xba*I-Schnittstelle, mit do_GOX1857_rev eine *Eco*RI-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX1857 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX1857_f und do_GOX1857_rev, sowie up_GOX1857_fwd und IC_GOX1857_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX1857_f und IC_GOX1857_r.

Δ GOX2096 Δ GOX2097 genannt, als auch in BP.3, anschließend *G. oxydans* Δ upp Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 (BP.4) genannt, durchgeführt. Wie in Abbildung 8 zu sehen, liegen die benachbarten Gene vor der Dehydrogenase in gleicher, nach ihr in entgegengesetzter Richtung, so dass keine Rücksicht auf eventuelle Promotorregionen genommen werden musste und die Dehydrogenase komplett vom Startcodon von GOX2097 bis zum Stopcodon von GOX2094 deletiert werden konnte.

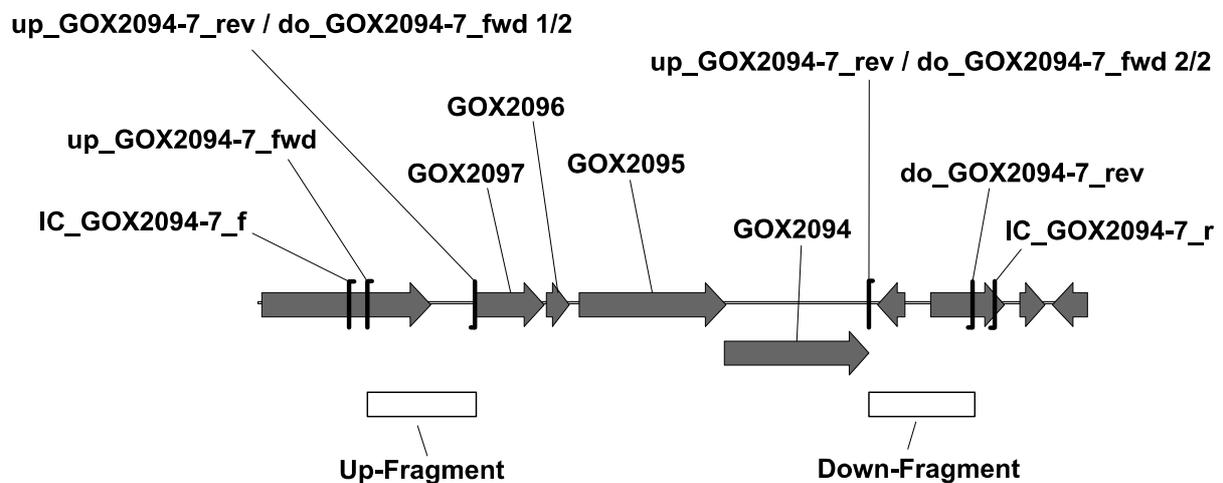


Abbildung 8: Strategie zur Deletion der membranständigen Sorbitol-Dehydrogenase (GOX2094, GOX2095, GOX2096 und GOX2097). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX2094-7_fwd und up_GOX2094-7_rev, das Down-Fragment (969 bp) mit den Primern do_GOX2094-7_fwd und do_GOX2094-7_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX2094-7_fwd und do_GOX2094-7_rev wurde das Fusionskonstrukt (1969 bp) erstellt. Mit up_GOX2094-7_fwd wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit do_GOX2094-7_rev eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX2094-7 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX2094-7_f und do_GOX2094-7_rev, sowie up_GOX2094-7_fwd und IC_GOX2094-7_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX2094-7_f und IC_GOX2094-7_r.

3.1.5. Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase

Die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase mit ihren drei Untereinheiten GOX1230, GOX1231 und GOX1232 wurde als nächstes deletiert.

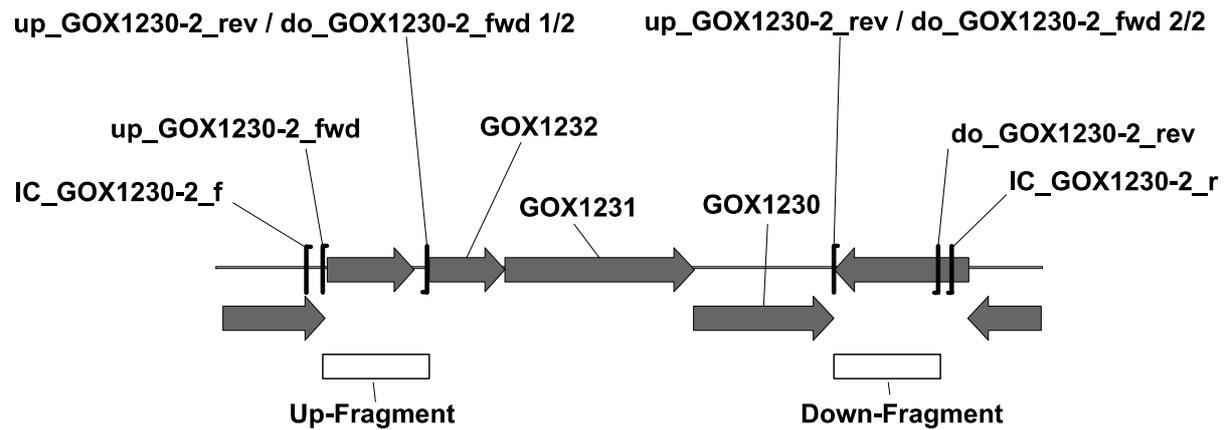


Abbildung 9: Strategie zur Deletion der membranständigen Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX1230, GOX1231 und GOX1232). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern `up_GOX1230-2_fwd` und `up_GOX1230-2_rev`, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern `do_GOX1230-2_fwd` und `do_GOX1230-2_rev` amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit `up_GOX1230-2_fwd` und `do_GOX1230-2_rev` wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit `up_GOX1230-2_fwd` und `do_GOX1230-2_rev` wurden zwei *Xba*I-Schnittstellen zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX1230-2 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern `IC_GOX1230-2_f` und `do_GOX1230-2_rev`, sowie `up_GOX1230-2_fwd` und `IC_GOX1230-2_r` überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern `IC_GOX1230-2_f` und `IC_GOX1230-2_r`.

Wie in Abbildung 9 ersichtlich, mussten auch dieses Mal nicht darauf geachtet werden, dass eventuelle Promotorregionen der umliegenden Gene durch eine komplette Deletion vom Startcodon von GOX1232 bis zum Stopcodon von GOX1230 beschädigt werden. Durch die Deletion in *G. oxydans* Δ_{upp} wurde dieser zu *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 und durch die Deletion in BP.4 dieser zu BP.5 (*G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232).

3.1.6. Deletion der Glucose-Dehydrogenase

Im sechsten Deletionsschritt wurde die membranständige, PQQ abhängige Glucose-Dehydrogenase ausgeschaltet, die nur eine Untereinheit (GOX0265) besitzt. Wie in Abbildung 10 ersichtlich, folgt hinter der Glucose-Dehydrogenase noch ein Gen für ein hypothetisches Protein.

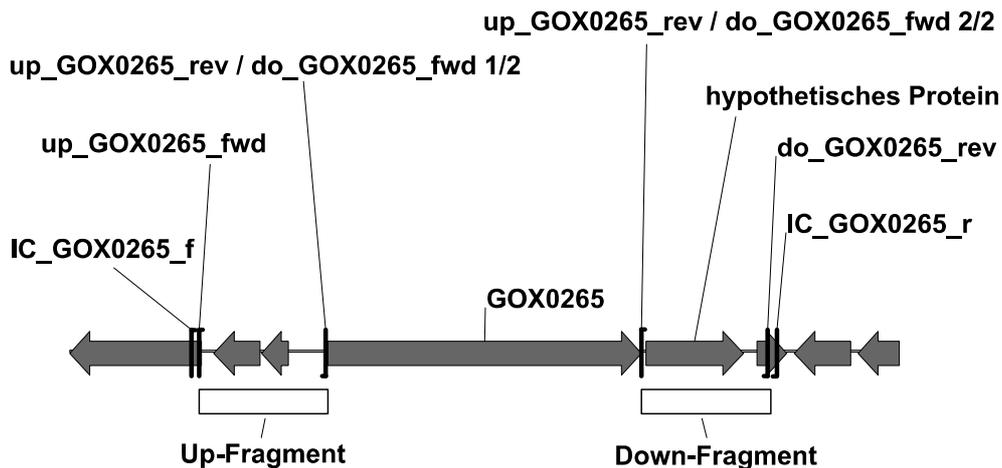


Abbildung 10: Strategie zur Deletion der membranständigen Glucose-Dehydrogenase (GOX0265). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX0265_fwd und up_GOX0265_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX0265_fwd und do_GOX0265_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente (2000 bp) mit up_GOX0265_fwd und do_GOX0265_rev wurde das Fusionskonstrukt erstellt. Mit up_GOX0265_fwd wurde eine *Xba*I-Schnittstelle, mit do_GOX0265_rev eine *Eco*RI-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX0265 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX0265_f und do_GOX0265_rev, sowie up_GOX0265_fwd und IC_GOX0265_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX0265_f und IC_GOX0265_r.

Obwohl die intergenische Region zwischen GOX0265 und dem Protein mit ungeklärter Funktion nur 35 bp lang ist, wurde die Glucose-Dehydrogenase komplett vom Start- bis zum Stopcodon deletiert. Die Deletion erschien wichtiger, als die Aufrechterhaltung einer putativen Promotorregion des hypothetischen Proteins. Da die Deletion in *G. oxydans* Δ upp Δ GOX0265 nicht letal war und nur der erwartete Phänotyp beobachtet wurde, wurde die Vorgehensweise für die Konstruktion der Mehrfachdeletionsmutante BP.6 (*G. oxydans* Δ upp Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 Δ GOX0265) aus BP.5 beibehalten.

3.1.7. Deletion der Polyol-Dehydrogenase

Als nächstes wurde der Deletionsvektor zur Deletion der membranständigen Polyol-Dehydrogenase, bestehend aus den Untereinheiten GOX0854 (*sldA*) und GOX0855 (*sldB*), konstruiert. Wie in Abbildung 11 zu sehen, wurden auch hier beide Gene komplett inklusive 19 bp vor dem Startcodon von GOX0855 bis zum Stopcodon von GOX0854 deletiert.



Abbildung 11: Strategie zur Deletion der membranständigen Polyol-Dehydrogenase (GOX0854 GOX0855). Das Up-Fragment (919 bp) wurde mit den Primern *up_sldAB_fwd* und *up_sldAB_rev*, das Down-Fragment (989 bp) mit den Primern *do_sldAB_fwd* und *do_sldAB_rev* amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit *up_sldAB_fwd* und *do_sldAB_rev* wurde das Fusionskonstrukt (1908 bp) erstellt. Mit *up_sldAB_fwd* wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit *do_sldAB_rev* eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionsldAB genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern *IC_sldAB_f* und *do_sldAB_rev*, sowie *up_sldAB_fwd* und *IC_sldAB_r* überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern *IC_sldAB_f* und *IC_sldAB_r*.

Mit dem Deletionsvektor wurde zunächst aus dem wildtypartigen *G. oxydans* Δ_{upp} die Mutante *G. oxydans* Δ_{upp} $\Delta_{GOX0854}$ $\Delta_{GOX0855}$ erzeugt. Nach Überprüfung des Phänotyps wurde eine erste Deletionsreihe durch Deletion der Polyol-Dehydrogenase in BP.6 erstellt, die Mutante BP.7.1 (*G. oxydans* Δ_{upp} $\Delta_{GOX1067}$ $\Delta_{GOX1068}$ $\Delta_{GOX1857}$ $\Delta_{GOX0585}$ $\Delta_{GOX0586}$ $\Delta_{GOX0587}$ $\Delta_{GOX2094}$ $\Delta_{GOX2095}$ $\Delta_{GOX2096}$ $\Delta_{GOX2097}$ $\Delta_{GOX1230}$ $\Delta_{GOX1231}$ $\Delta_{GOX1232}$ $\Delta_{GOX0265}$ $\Delta_{GOX0854}$ $\Delta_{GOX0855}$). In dieser Deletionsmutante sind nun alle bekannten Dehydrogenasen in *G. oxydans* deletiert. Da aber die Konjugations- und Wachstumseffizienz sehr unter der Deletion der Polyol-Dehydrogenase litt, wurde die Polyol-Dehydrogenase noch einmal später in einer zweiten Deletionsreihe in BP.8 deletiert, wodurch BP.9 (*G. oxydans* Δ_{upp} $\Delta_{GOX1067}$ $\Delta_{GOX1068}$ $\Delta_{GOX1857}$ $\Delta_{GOX0585}$ $\Delta_{GOX0586}$ $\Delta_{GOX0587}$ $\Delta_{GOX2094}$ $\Delta_{GOX2095}$ $\Delta_{GOX2096}$ $\Delta_{GOX2097}$ $\Delta_{GOX1230}$ $\Delta_{GOX1231}$ $\Delta_{GOX1232}$ $\Delta_{GOX0265}$ $\Delta_{GOX1441}$ $\Delta_{GOX0516}$ $\Delta_{GOX0854}$ $\Delta_{GOX0855}$) entstand.

3.1.8. Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 2

Als erste unbekannte Dehydrogenase sollte das als membranständige, PQQ-abhängige Dehydrogenase 2 annotierte Gen GOX1969 komplett vom Start- bis zum Stopcodon deletiert werden. Dazu sollten die in Abbildung 12 gezeigten Flanken amplifiziert werden, um das Gen schließlich zu deletieren. Zunächst wurde wieder eine Deletion im wildtypartigen *G. oxydans* Δ upp versucht. Während die Integration des Deletionsvektors noch problemlos verlief, wurden nach der Selektion nur Revertanten, also Klone, die den Deletionsvektor ohne eine Deletion des Gens GOX1969 durch die gleiche homologe Rekombination wie die Integration wieder verloren hatten, gefunden. Nachdem 144 Klone überprüft worden waren, wurde die gleiche Deletion mit längeren Flanken versucht. Die Primer up2_GOX1969_fwd und do2_GOX1969_rev wurden weiter außen gewählt, so dass die Flanken nun 1,5 kbp lang waren.

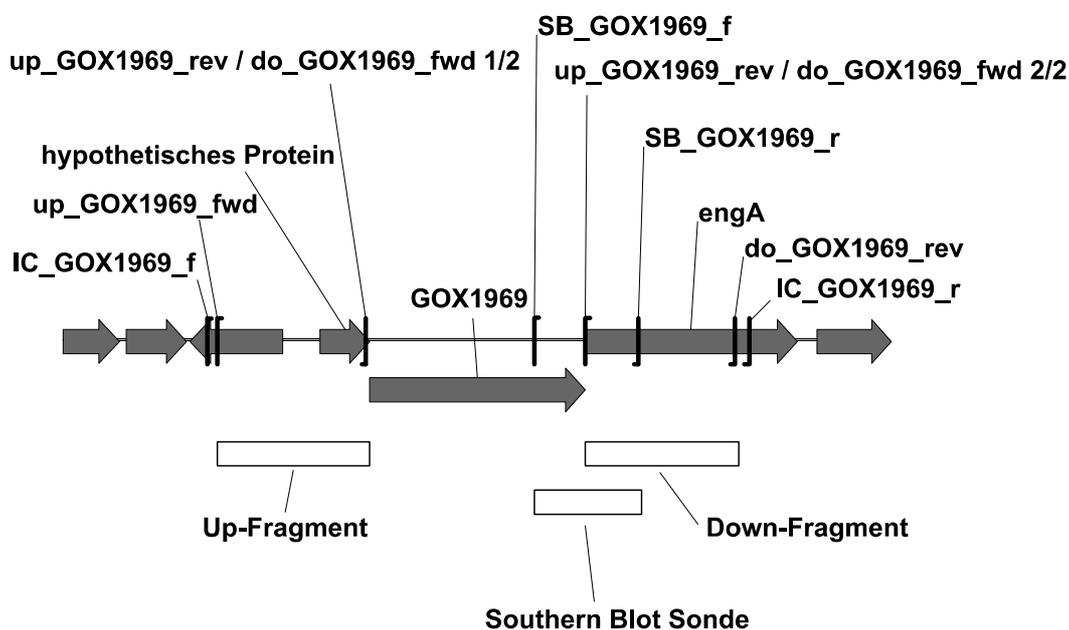


Abbildung 12: Strategie zur Deletion des für eine membranständige, PQQ-abhängige Dehydrogenase 2 annotierten Gens GOX1969. Das Up-Fragment (990 bp) wurde mit den Primern up_GOX1969_fwd und up_GOX1969_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX1969_fwd und do_GOX1969_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX1969_fwd und do_GOX1969_rev wurde das Fusionskonstrukt (1990 bp) erstellt. Mit up_GOX1969_fwd wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit do_GOX1969_rev eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX1969 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX1969_f und do_GOX1969_rev, sowie up_GOX1969_fwd und IC_GOX1969_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX1969_f und IC_GOX1969_r. Die Southern Blot Sonde (700 bp) wurde mit den Primern SB_GOX1969_f und SB_GOX1969_r amplifiziert.

Mit neuen Überprüfungsprimern (IC3_GOX1969_f und IC3_GOX1969_r) wurden die Klone nach einer reibungslosen Integration wieder auf GOX1969-Deletionsmutanten überprüft. Nach der Überprüfung von 96 Klonen fand sich eine Mutante, die wie in Abbildung 13A gezeigt, eine Doppelbande aufwies. Durch Vereinzlungsausstriehe wurde sichergestellt, dass es sich hierbei nur um einen einzigen Klon handelte. Die Länge des einen Amplicons war etwas kleiner als die des Wildtyps. Das zweite Amplicon entsprach den erwarteten 3000 bp für eine Deletionsmutante. Eine getrennte Sequenzierung ergab für das längere Amplicon die Wildtypsequenz, für das kürzere die Sequenz des Fusionskonstrukts. Da die Amplifikation mit chromosomalen Primern durchgeführt wurde, deren Sequenzen sich nicht im Deletionsvektor befanden, mussten beide Bereiche im Chromosom liegen.

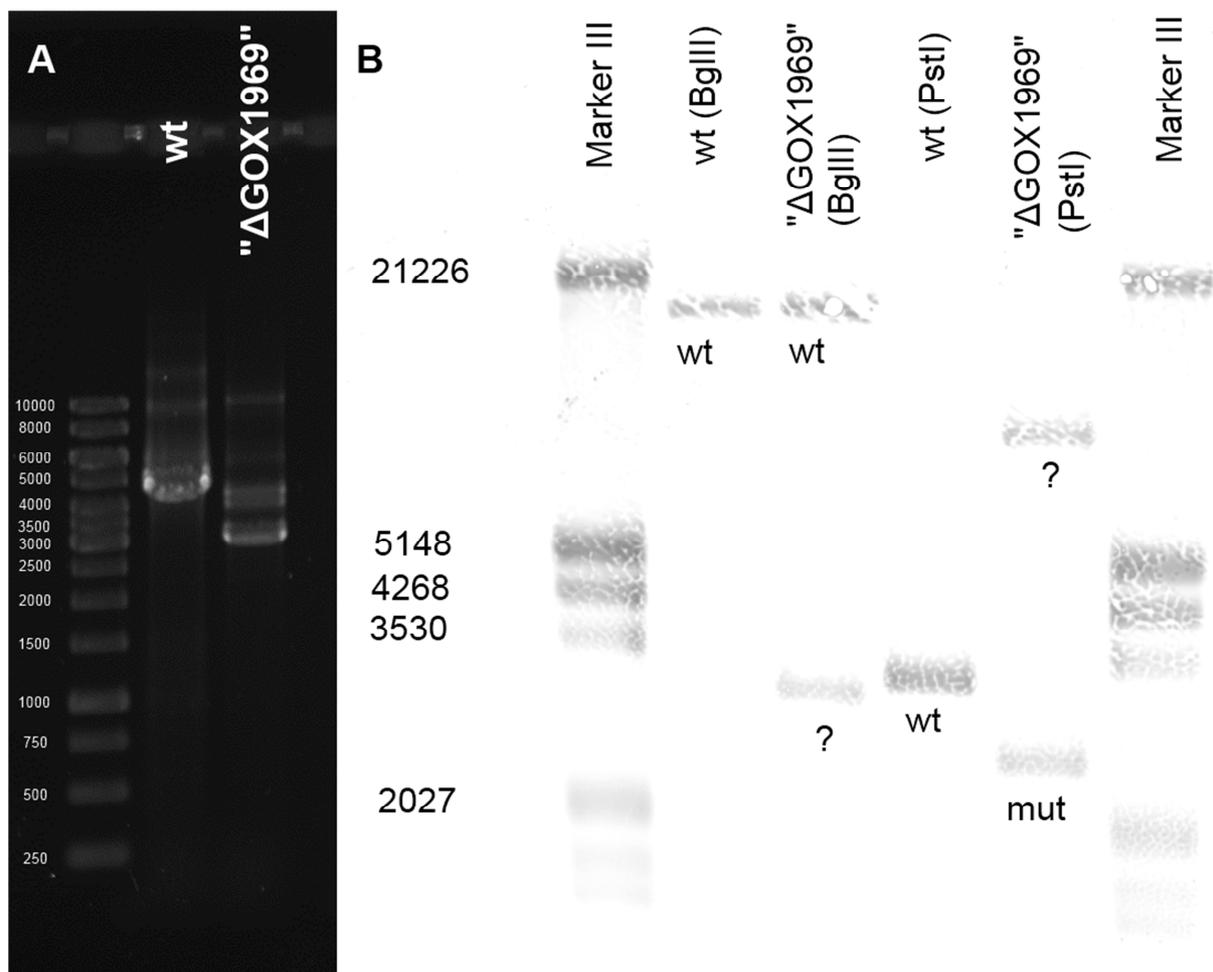


Abbildung 13: A: Agarosegelelektrophorese der mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer IC3_GOX1969_f und IC3_GOX1969_r amplifizierten DNA-Fragmente von *G. oxydans* Δ_{upp} und der Mutante „ $\Delta_{GOX1969}$ “. B: Southern Blot von *G. oxydans* Δ_{upp} - und Mutanten-DNA hydrolysiert mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*PstI* & *BglII*) und unter Verwendung des in Abbildung 12 gezeigten Abschnitts als Sonde (wt = Wildtypbanden, mut = Mutantenbanden).

Nähere Untersuchungen dieser Mutante mit einem Southern Blot (Abbildung 13B) ergaben, dass sich das Gen noch in der Zelle befand, die Sonde anscheinend aber gleichzeitig an einer anderen Position im Chromosom der Mutante binden konnte. Das Gen konnte nicht deletiert werden.

3.1.9. Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 3

Als erste unbekannte PQQ-abhängige Dehydrogenase konnte die PQQ-abhängige Dehydrogenase 3 (GOX1441) erfolgreich deletiert werden. Obwohl das Gen, wie in Abbildung 14 ersichtlich, nur 59 bp vor dem wichtigen Gen *queA*, das für eine S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase-isomerase codiert, liegt, wurde zunächst eine komplette Deletion vom Start- bis zum Stopcodon von GOX1441 versucht. Die Generierung von *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1441 war erfolgreich und da kein Wachstumsphänotyp beobachtet wurde, wurde die Deletionsstrategie für den Mehrfachdeletionsstamm beibehalten.

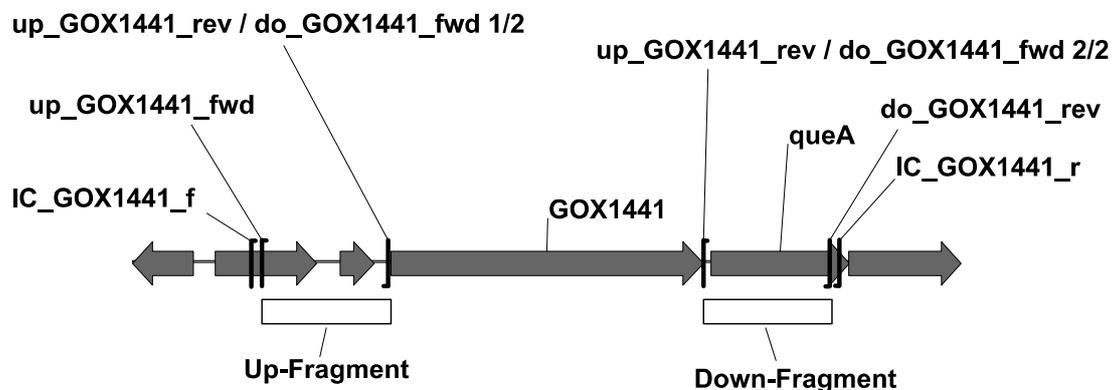


Abbildung 14: Strategie zur Deletion der unbekanntes membranständigen PQQ abhängigen Dehydrogenase 3 (GOX1441). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX1441_fwd und up_GOX1441_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX1441_fwd und do_GOX1441_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX1441_fwd und do_GOX1441_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX1441_fwd wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit do_GOX1441_rev eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX1441 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX1441_f und do_GOX1441_rev, sowie up_GOX1441_fwd und IC_GOX1441_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX1441_f und IC_GOX1441_r.

Die Deletion wurde in BP.7.1, wodurch BP.8.1 (*G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 Δ GOX0265 Δ GOX0854 Δ GOX0855 Δ GOX1441) entstand, durchgeführt. Für die zweite Deletionsreihe wurde die Deletion in

BP.6 durchgeführt, wodurch BP.7 (*G. oxydans* Δ upp Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 Δ GOX0265 Δ GOX1441) entstand.

3.1.10. Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 4

Als letztes von Prust *et al.* (2005) als PQQ-abhängige, membranständige Dehydrogenase annotiertes Gen wurde die PQQ-abhängige Dehydrogenase 4 (GOX0516) deletiert. Auch hier gibt es, wie in Abbildung 15 dargestellt, ein hypothetisches Protein nur 56 bp vom zu deletierenden Gen entfernt. Deswegen wurde zunächst wieder unter Vorbehalt eine Deletion vom Start- bis zum Stopcodon im wildtypartigen Stamm *G. oxydans* Δ upp, woraus die Mutante *G. oxydans* Δ upp Δ GOX0516 resultierte, durchgeführt. Nachdem die vollständige Deletion im wildtypartigen Stamm keine Änderung zeigte, wurde GOX0516 auch in BP.7 komplett deletiert woraus BP.8 (*G. oxydans* Δ upp Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 Δ GOX0265 Δ GOX1441 Δ GOX0516) entstand.

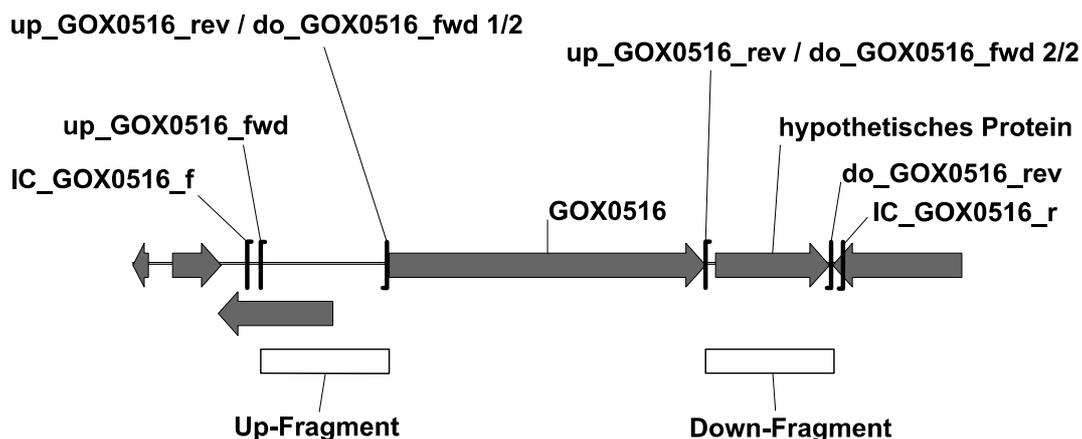


Abbildung 15: Strategie zur Deletion der unbekanntes membranständigen PQQ abhängigen Dehydrogenase 4 (GOX0516). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX0516_fwd und up_GOX0516_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX0516_fwd und do_GOX0516_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX0516_fwd und do_GOX0516_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX0516_fwd wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit do_GOX0516_rev eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX0516 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX0516_f und do_GOX0516_rev, sowie up_GOX0516_fwd und IC_GOX0516_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX0516_f und IC_GOX0516_r.

Die anschließende Deletion der Polyol-Dehydrogenase in BP.8, wodurch BP.9 entstand, wurde schon in Punkt 3.1.7 beschrieben. Da mit BP.9 schon eine Mutante bestand, in der alle 9 Dehydrogenasen ausgeschaltet worden waren, wurde GOX0516 nicht in der alternativen Deletionsreihe BP.8.1 deletiert.

3.1.11. Deletion der membranständigen D-Lactat-Dehydrogenase

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass es eine D-Lactat-Dehydrogenase in der Membranfraktion von *G. oxydans* geben muss, wurde die membranständige D-Lactat-Dehydrogenase GOX1253 deletiert. Da die Leserichtung der benachbarten Gene zum Zielgen ist (Abbildung 16), konnte das Gen wieder komplett vom Start- bis zum Stopcodon deletiert werden. Die Deletion wurde zunächst im wildtypartigen *G. oxydans* Δ upp durchgeführt, was zur Mutante *G. oxydans* Δ upp Δ GOX1253 führte. Anschließend wurde die Deletion auch in BP.9 durchgeführt, wodurch BP.10 (*G. oxydans* Δ upp Δ GOX1067 Δ GOX1068 Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 Δ GOX0265 Δ GOX1441 Δ GOX0516 Δ GOX0854 Δ GOX0855 Δ GOX1253) entstand. In dieser Deletionsmutante sind alle deletierbaren membranständigen Dehydrogenasen ausgeschaltet.

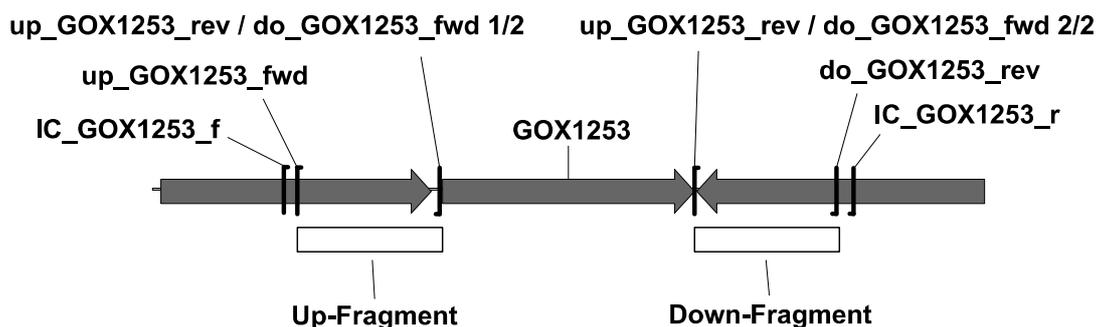


Abbildung 16: Strategie zur Deletion der unbekanntes membranständigen D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253). Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX1253_fwd und up_GOX1253_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX1253_fwd und do_GOX1253_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX1253_fwd und do_GOX1253_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX1253_fwd wurde eine *Xba*I-Schnittstelle, mit do_GOX1253_rev eine *Eco*RI-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX1253 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX1253_f und do_GOX1253_rev, sowie up_GOX1253_fwd und IC_GOX1253_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX1253_f und IC_GOX1253_r.

3.1.12. Deletionen putativer membranständiger L-Lactat-Dehydrogenase

In BP.10 konnte nach wie vor eine L-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität festgestellt werden. Durch Prust *et al.* (2005) wurden zwei Gene als Gene für putative Lactat-Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H annotiert (GOX1170 und GOX2071). Außerdem zeigte GOX1168 in einem Blast-Alignment aller *G. oxydans* 621H-Gene gegen alle Lactat-Dehydrogenasen der NCBI Datenbank „nt“ eine große Ähnlichkeit mit Lactat-Dehydrogenasen mehrerer Spezies. Wie in Abbildung 17 dargestellt, wurde zunächst GOX2071 in *G. oxydans* Δ_{upp} komplett vom Start- bis zum Stopcodon deletiert. Dies ergab die Mutante *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX2071. Eine Deletion von GOX1170 vom Start- bis zum Stopcodon (Abbildung 18) ergab die Mutante *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1170. Dem schloss sich eine Deletion zu einer des Lactat-Dehydrogenase verwandten Gens GOX1168 zusammen mit GOX1170 (und dem hypothetischen Protein GOX1169 dazwischen; Startcodon GOX1168 bis Stopcodon GOX1170) mit Hilfe eines neuen Fusionskonstrukts an, welches nun die Mutante *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1168 Δ GOX1169 Δ GOX1170 ergab.

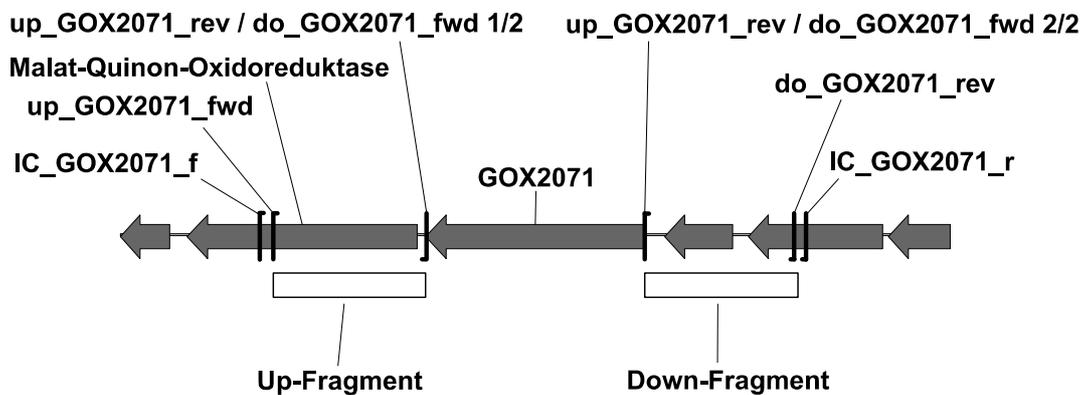


Abbildung 17: Strategie zur Deletion der annotierten Lactat-Dehydrogenase GOX2071. Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX2071_fwd und up_GOX2071_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX2071_fwd und do_GOX2071_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX2071_fwd und do_GOX2071_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX2071_fwd und do_GOX2071_rev wurden zwei *Xba*I-Schnittstellen zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX2071 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX2071_f und do_GOX2071_rev, sowie up_GOX2071_fwd und IC_GOX2071_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX2071_f und IC_GOX2071_r.

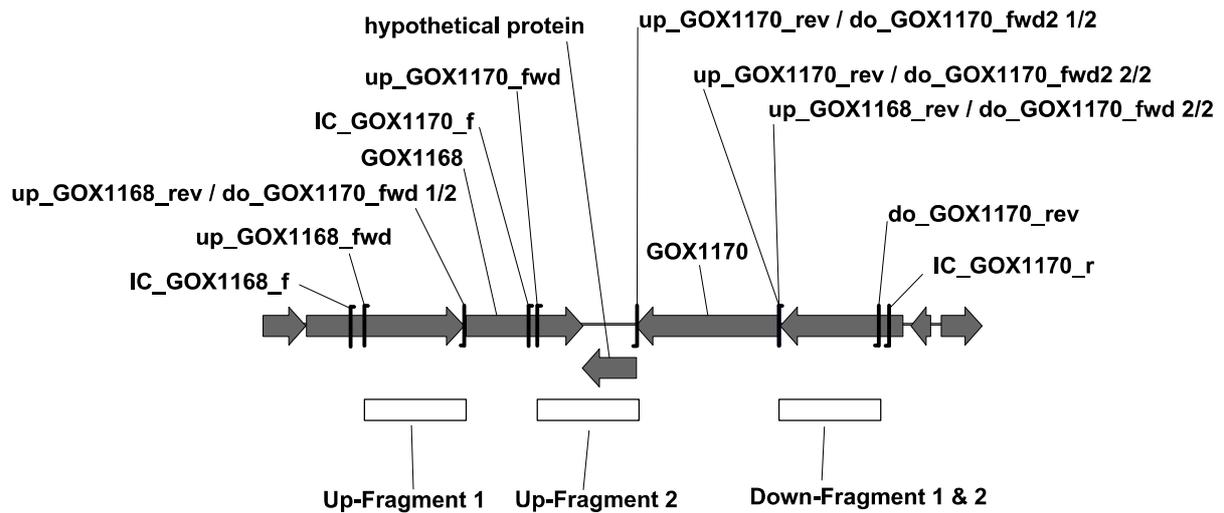


Abbildung 18: Strategie zur Deletion der annotierten Lactat-Dehydrogenase GOX1170 und zur Deletion von GOX1168, GOX1169 und GOX1170. Das Up-Fragment 1 (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX1168_fwd und up_GOX1168_rev, das Up-Fragment 2 (1000 bp) mit den Primern up_GOX1170_fwd und up_GOX1170_rev, das Down-Fragment 1 (1000 bp) mit den Primern do_GOX1170_fwd und do_GOX1170_rev, sowie das Down-Fragment 2 (1000 bp) mit den Primern do_GOX1170_fwd2 und do_GOX1170_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage von Up-Fragment 1 und Down-Fragment 1 mit up_GOX1168_fwd und do_GOX1170_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) zur Deletion der Gene GOX1168, GOX1169 und GOX1170 erstellt, durch eine Amplifikation unter Vorlage von Up-Fragment 2 und Down-Fragment 2 mit up_GOX1170_fwd und do_GOX1170_rev das zur Deletion von GOX1170 (2000 bp). Mit up_GOX1168_fwd, up_GOX1170_fwd und do_GOX1170_rev wurden *Xba*I-Schnittstellen zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Die konstruierten Deletionsvektoren hießen pAJ63a:FusionGOX1168-70 bzw. pAJ63a:FusionGOX1170. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX1168_f bzw. IC_GOX1170_f und do_GOX1170_rev, sowie up_GOX1168_fwd bzw. up_GOX1170_fwd und IC_GOX1170_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX1168_f bzw. IC_GOX1170_f und IC_GOX1170_r.

Es wurde außerdem eine Mutante mit der Deletion von GOX1170 und GOX2071, *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1170 Δ GOX2071, und eine mit der Deletion aller annotierten Lactat-Dehydrogenasen GOX1170, GOX2071 und GOX1253, *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1170 Δ GOX2071 Δ GOX1253, im wildtypartigen Ausgangsstamm *G. oxydans* Δ_{upp} erstellt. Eine Mutante mit der Deletion von GOX1168 GOX1169 GOX1170 und GOX2071 gelang sowohl auf Basis von *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX2071 als auch auf Basis von *G. oxydans* Δ_{upp} Δ GOX1168 Δ GOX1169 Δ GOX1170 nicht. Aus diesem Grund konnte die L-Lactat-Dehydrogenaseaktivität aus dem Multideletionsstamm nicht entfernt werden. Alle Mehrfachdeletionsmutanten wurden mit den gleichen Deletionskonstrukten der Einfachdeletionsmutanten erstellt.

3.1.13. Suche nach weiteren membranständigen Dehydrogenasen

In Prust *et al.* (2005) werden 23 weitere Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen als potenzielle membranständige Dehydrogenasen auf Grund gefundener Signalpeptide oder Transmembranhelices genannt. Da die Lokalisationsvorhersageprogramme sich seitdem allerdings weiterentwickelt haben, wurde nochmal für alle annotierten Dehydrogenasen / Oxidoreduktasen von *G. oxydans* 621H eine Lokalisationsvorhersage mit PSORTb 3.0 (Yu *et al.* 2010) durchgeführt. Es wurden auch zunächst die in Prust *et al.* (2005) genannten Programme TMHMM (Krogh *et al.* 2001) und SignalP (Petersen *et al.* 2011) für eine Transmembranhelices- bzw. Signalpeptide-Vorhersage hinzugezogen. Weil sich die Ergebnisse aber nicht von den PSORTb Ergebnissen unterschieden, da PSORTb 3.0 bereits beide Methoden in sich vereint (Yu *et al.* 2010), wurden später nur noch die Ergebnisse von PSORTb berücksichtigt. Neben den bekannten membranständigen Dehydrogenasen, wurde für die unbekannt membranständigen Dehydrogenasen 3 und 4 vorhergesagt, dass diese sich in der cytoplasmatischen Membran befinden. Die unbekannte membranständige Dehydrogenase 2 sollte sich in der Außenmembran befinden. Ansonsten konnten die in der Supplementary Table 3 von Prust *et al.* (2005) aufgeführten Vorhersagen nicht bestätigt werden. Es wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Gene gefunden, bei denen es sich eventuell um membranständige Dehydrogenasen handeln könnte.

Tabelle 8: Putative membranständige Dehydrogenasen mit der Annotation nach Prust *et al.* (2005) und der PSORTb-Vorhersage

	Annotation	PSORTb-Vorhersage
GOX0288	hypothetical protein GOX0288	cytoplasmatische Membran
GOX0289	hypothetical protein GOX0289	cytoplasmatische Membran
GOX0290	putative oxidoreductase	Cytoplasma
GOX0291	putative ferredoxin subunit of ring-hydroxylation	Cytoplasma
GOX0453	hypothetical protein GOX0453	Extrazellulär
GOX0454	putative transmembrane oxidoreductase	Unbekannt
GOX0571	hypothetical protein GOX0571	cytoplasmatische Membran
GOX0572	putative oxidoreductase	Unbekannt
GOX0632	D-amino acid dehydrogenase small subunit	cytoplasmatische Membran

	Annotation	PSORTb-Vorhersage
GOX0642	putative oxidoreductase	Unbekannt
GOX0643	hypothetical protein GOX0643	Unbekannt
GOX0946	putative oxidoreductase	Periplasma
GOX1033	hypothetical protein GOX1033	cytoplasmatische Membran
GOX1034	putative oxidoreductase	Unbekannt
GOX1615	A Chain A, Structure Of The Glycerol Dehydrogenase Akr1	Cytoplasma
GOX1616	hypothetical protein GOX1616	cytoplasmatische Membran
GOX2251	putative arogenate dehydrogenase prephenate dehydrogenase	Cytoplasma
GOX2252	hypothetical protein GOX2252	cytoplasmatische Membran

GOX0288-GOX0291 bilden ein Operon und die beiden hypothetischen Proteine könnten zwei Transmembranhelicesanker bilden. Das gleiche gilt für GOX0453 und GOX0454, sowie für GOX0571 und GOX0572, allerdings jeweils nur mit einem Anker. GOX0632 ist als D-Aminosäure-Dehydrogenase annotiert, die vom Programm in der cytoplasmatischen Membran angesiedelt wurde. GOX0642 und GOX0643 sind ein Operon, deren Proteine keinem Zellkompartiment zugeteilt werden konnten. Die putative Oxidoreduktase GOX0946 liegt laut PSORTb im Periplasma. GOX1033 und GOX1034, GOX1615 und GOX1616, sowie GOX2251 und GOX2252 bildeten wieder Oxidoreduktase-Anker-Paare. Nachdem allerdings, wie später gezeigt, außer der L-Lactat-Dehydrogenaseaktivität keine weiteren Aktivitäten für die Membranfraktion von *G. oxydans* gefunden wurde, wurde das Vorhaben, weitere potenzielle membranständige Dehydrogenasen zu deletieren, verworfen.

3.2. Physiologische Untersuchungen der Deletionsmutanten

Nachdem alle Deletionsmutanten für alle membranständigen Dehydrogenasen außer den putativen L-Lactatdehydrogenasen erstellt waren, wurden die Multideletionsstämme in vergleichenden Wachstumsexperimenten und Ganzzell-DCPIP-Assays untersucht, um die Auswirkungen der Deletionen festzustellen.

3.2.1. Wachstumsexperimente auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Um zu bestimmen welche Wachstumsbedingungen sich am besten zur Kultivierung aller Deletionsstämme eignen, wurde zunächst untersucht auf welchen Kohlenstoffquellen *G. oxydans* *Δupp*, der im Folgenden als Wildtyp (wt) bezeichnet wird und der Deletionsstamm BP.9 wachsen bzw. noch wachsen können. Dazu wurde der Versuch gemäß Punkt 2.2.10.1 angesetzt und die optische Dichte bei 600 nm nach 48 h gemessen.

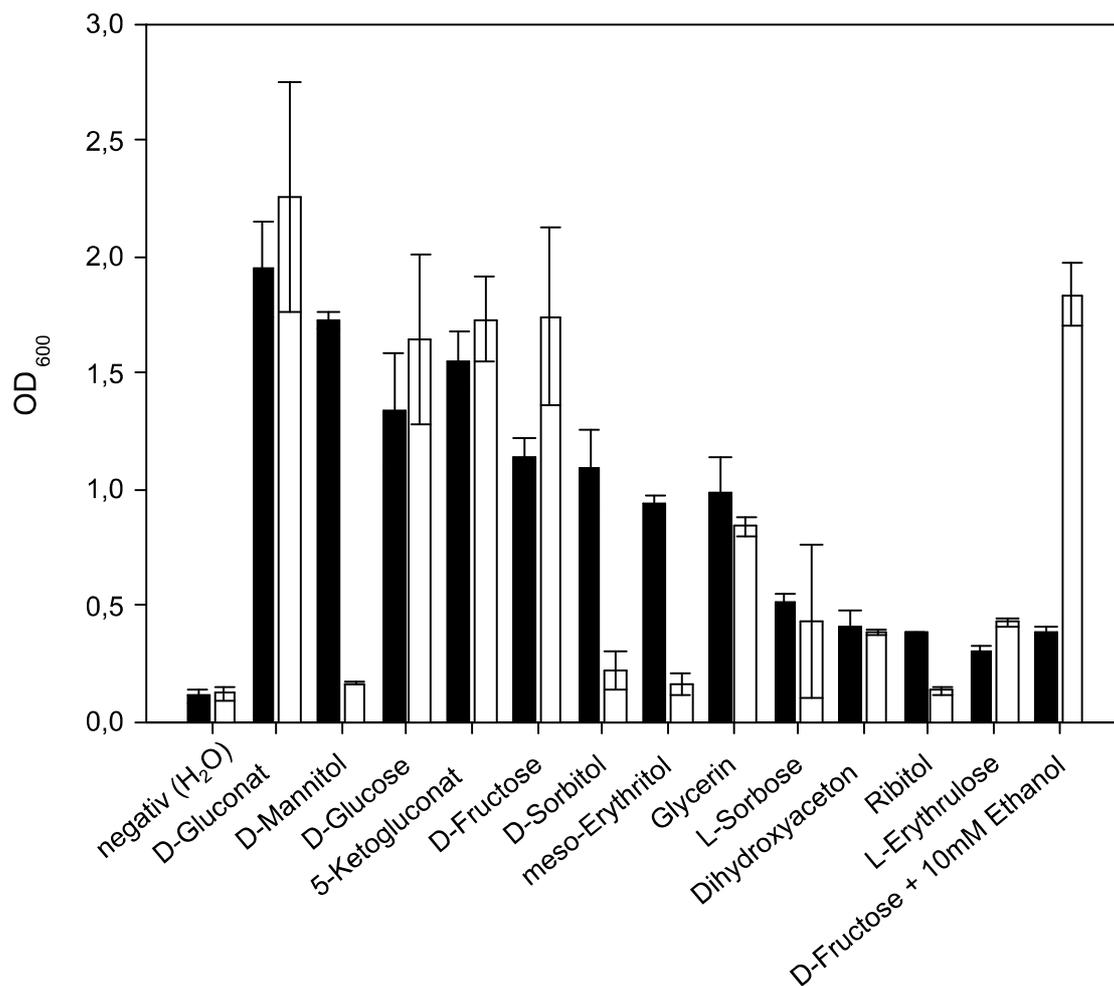


Abbildung 19: Kohlenstoffquellenverwendung von *G. oxydans* wt und Multideletionsstamm BP.9 (siehe auch Peters *et al.* (2013b)). Die Balken geben die OD₆₀₀ am Ende des Experiments nach 48 h Wachstum im Komplexmedium mit 50 mM Kohlenstoffquelle an. Schwarze Balken wt, weiße Balken BP.9.

Wie der Abbildung 19 entnommen werden kann, wuchs der Wildtyp auf D-Gluconat, D-Mannitol, D-Glucose, 5-Ketogluconat, D-Fructose, D-Sorbitol, *meso*-Erythritol und Glycerin. Schwaches Wachstum wurde auf L-Sorbose, Dihydroxyaceton, Ribitol und L-Erythulose beobachtet. Kein Wachstum konnte auf D-Galactose, D-Mannose, L-Fucose, D-Lyxose, D-

Ribose, D-Xylose, Maltose, Saccharose, Lactose, Dulcitol, D-Arabitol, L-Arabitol, D-Xylitol, *myo*-Inositol, 2-Ketogluconat, Ethanol und Acetat beobachtet werden (nicht gezeigt). Der Multideletionsstamm BP.9 wuchs nur auf D-Gluconat, D-Glucose, 5-Ketogluconat, Glycerin und D-Fructose. Ein schwaches Wachstum konnte auf L-Sorbose, Dihydroxyaceton und L-Erythrose beobachtet werden. Immer wenn sowohl der Wildtyp als auch der Stamm BP.9 auf einer Kohlenstoffquelle wachsen konnten, war nach 48 h die OD₆₀₀ der Mutante höher als die des Wildtyps. Das auffälligste Beispiel dafür ist das Wachstum auf Fructose + 10 mM Ethanol. Hier konnte der Wildtyp kaum wachsen während der Multideletionsstamm BP.9 die gleiche OD₆₀₀ erreichte wie auf Fructose ohne Ethanol-Zusatz. Basierend auf diesen Ergebnissen, aus Kostengründen und auf Grund der pH-Stabilität, die das Wachstum auf Fructose mangels Gluconat-Bildung im Gegensatz zu dem auf Glucose zeigte, wurde Fructose als Standardkohlenstoffquelle für alle weiteren Experimente verwendet, falls dies nicht explizit anders angegeben ist. Anschließend wurde das Wachstum aller Mehrfachdeletionsmutanten auf den wichtigsten Kohlenstoffquellen, Fructose, Mannitol und Glucose, im Vergleich zum Wildtyp in Wachstumsexperimenten genauer untersucht. Dazu wurden Wachstumsexperimente gemäß Material und Methoden Punkt 2.2.10.2 durchgeführt.

3.2.1.1. **Wachstumsverhalten auf Fructose**

Für die Darstellung des Wachstumsverhaltens auf Fructose wurden die Multideletionsstämme in drei Gruppen unterteilt (Abbildung 20). Zum einen wurden die Stämme BP.1-BP.8 zusammengefasst, zum anderen die Stämme BP.9-BP.10, da sie jeweils ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten. Diese beiden Gruppen wurden mit dem Wildtyp als weitere Gruppe verglichen.

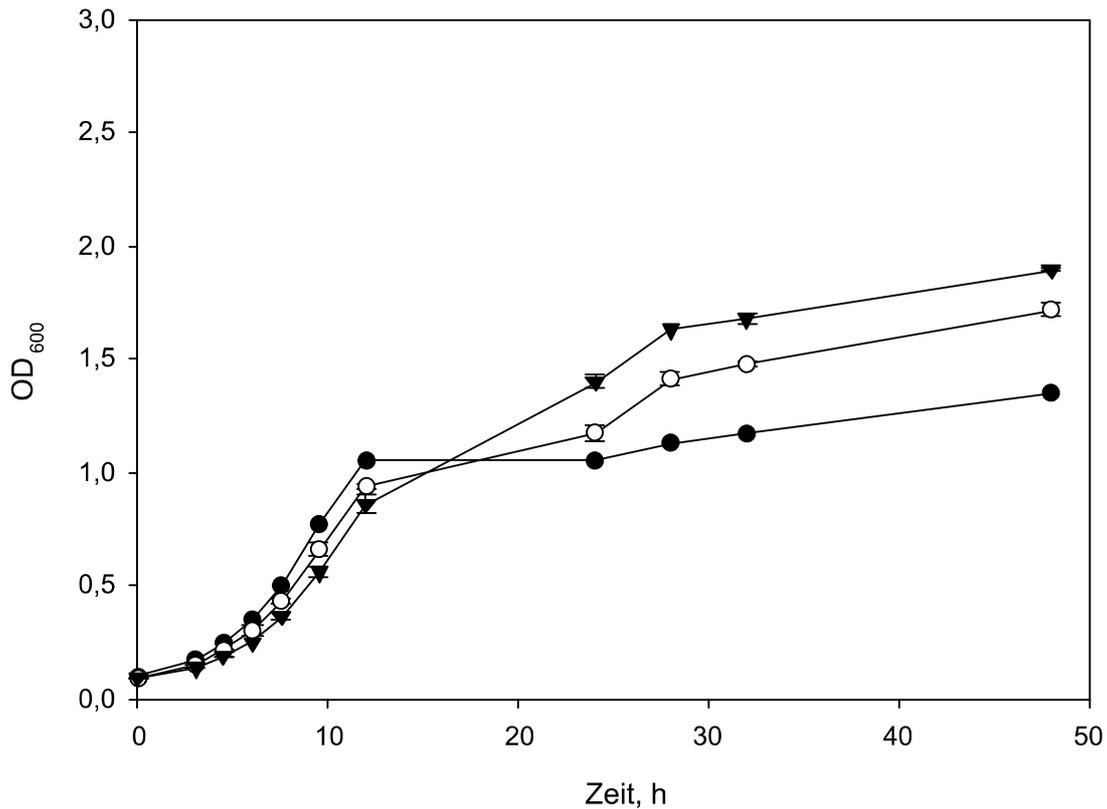


Abbildung 20: Wachstum des Wildtyps und aller Mutanten mit konsekutiv deletierten membranständigen Dehydrogenasen in Vollmedium mit 50 mM Fructose über 48 h (siehe auch Peters *et al.* (2013b)). Die Stämme sind, wie im Text erwähnt, gruppiert in wt (schwarze Kreise), BP.1-BP.8 (weiße Kreise) und BP.9-BP.10 (schwarze Dreiecke). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen an.

Alle Gruppen hatten eine anfängliche lag-Phase von ca. 3 h, eine gemeinsame exponentielle Wachstumsphase mit einer Wachstumsrate von $0,228 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$, die nach 12 h mit einer OD_{600} von $0,93 \pm 0,05$ beendet wurde. Anschließend veränderte sich die optische Dichte der ersten Gruppe, die nur aus dem Wildtyp besteht, kaum (OD_{600} nach 48 h 1,35) während die zweite und dritte Gruppe, die zusammen alle Mutanten enthalten, denen die membranständige Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 GOX1068) fehlt (BP.1-BP.10), eine zweite schwächere Wachstumsphase hatten. Die zweite Gruppe (BP.1-BP.8) erreichte eine OD_{600} von $1,71 \pm 0,03$ nach 48 h. Die dritte Gruppe, die alle Stämme enthält, denen zusätzlich die membranständige Polyol-Dehydrogenase (GOX0854 GOX0855) (BP.9 und BP.10) fehlt, erreichte eine noch höhere OD_{600} von $1,895 \pm 0,007$ nach 48 h.

3.2.1.2. Wachstumsverhalten auf Mannitol

Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente auf Mannitol sind denen auf Fructose mit einer wichtigen Ausnahme sehr ähnlich.

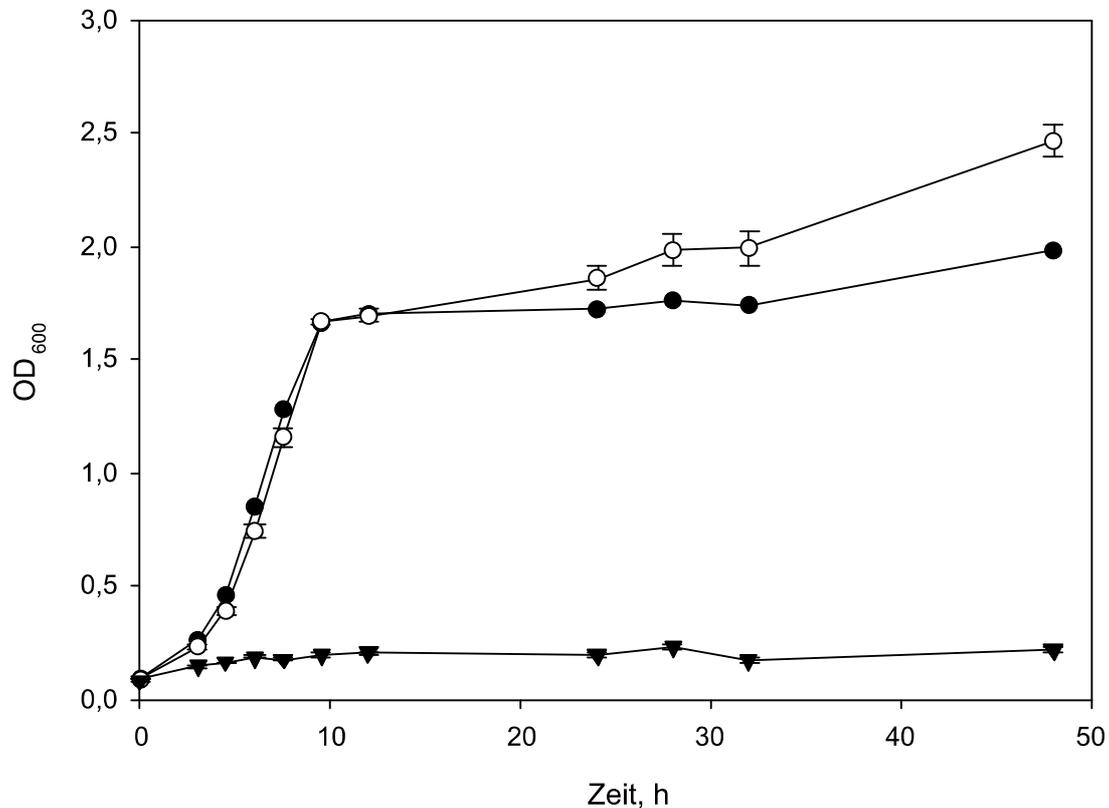


Abbildung 21: Wachstum des Wildtyps und aller Mutanten mit konsekutiv deletierten membranständigen Dehydrogenasen in Vollmedium mit 50 mM Mannitol über 48 h (siehe auch Peters *et al.* (2013b)). Die Stämme sind, wie im Text, erwähnt gruppiert in wt (schwarze Kreise), BP.1-BP.8 (weiße Kreise) und BP.9-BP.10 (schwarze Dreiecke). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen an.

Die Stämme konnten hierzu wieder in die gleichen drei Gruppen wie in Punkt 3.2.1.1 eingeteilt werden. Wie in Abbildung 21 gezeigt, wuchsen die erste Gruppe, der Wildtyp und die zweite Gruppe, welche BP.1-BP.8 umfasst, mit einer höheren Wachstumsrate von $0,387 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ als beim Wachstum auf Fructose innerhalb von 9,5 h zunächst auf eine OD_{600} von $1,67 \pm 0,01$. Während der Wildtyp anschließend nur wenig Wachstum zeigte und eine OD_{600} von $1,94$ nach 48 h erreichte, wuchs die zweite Gruppe auf eine fast 20 % höhere OD_{600} von $2,46 \pm 0,07$ nach 48 h. Die dritte Gruppe, die wieder die Mutanten enthält, denen zusätzlich die Polyol-Dehydrogenase fehlt (BP.9 und BP.10), konnte auf Mannitol im Gegensatz zu Fructose nicht wachsen.

3.2.1.3. Wachstumsverhalten auf Glucose

Wie in Abbildung 22 gezeigt, können die Stämme bei einem Wachstum auf Glucose in vier Gruppen eingeteilt werden.

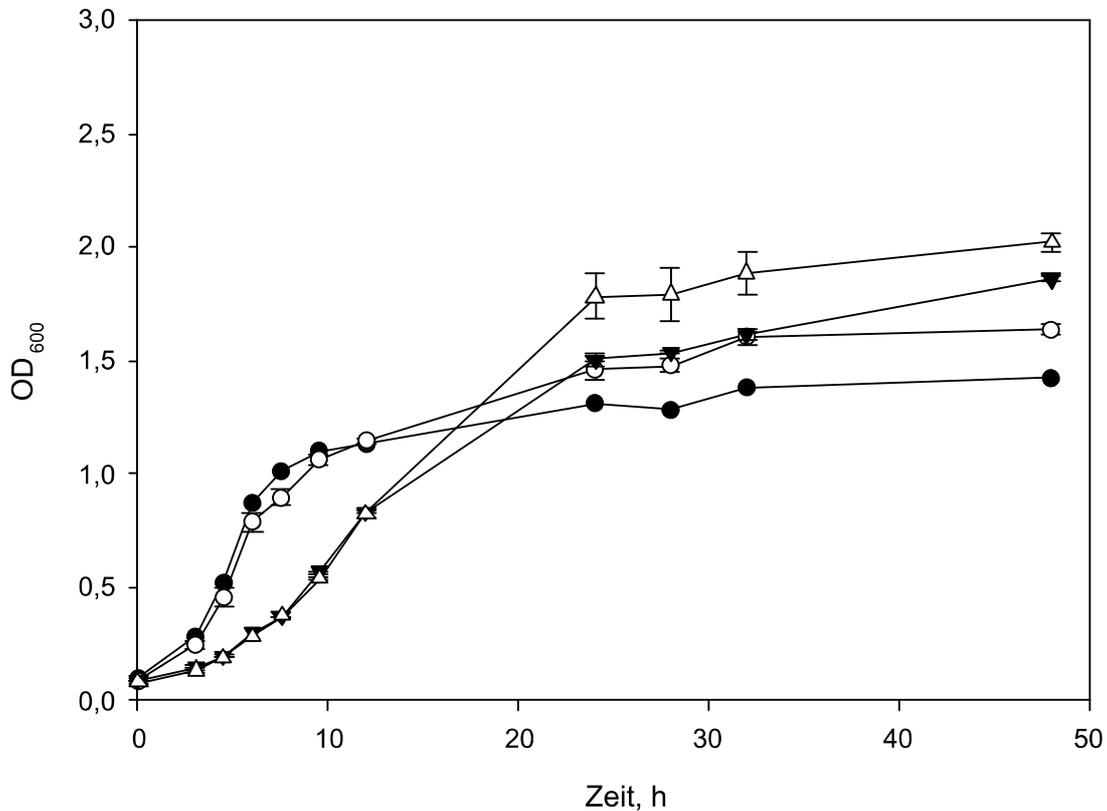


Abbildung 22: Wachstum des Wildtyps und aller Mutanten mit konsekutiv deletierten membranständigen Dehydrogenasen in Vollmedium mit 50 mM Glucose über 48 h (siehe auch Peters *et al.* (2013b)). Die Stämme sind, wie im Text, erwähnt gruppiert in wt (schwarze Kreise), BP.1-BP.5 (weiße Kreise), BP.6-BP.8 (schwarze Dreiecke) und BP.9-BP.10 (weiße Dreiecke). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen an.

Die erste Gruppe enthält wieder nur den Wildtyp. Die zweite Gruppe besteht in diesem Fall allerdings nur aus allen Stämmen, die keine Alkohol-Dehydrogenase aber die membranständige Glucose-Dehydrogenase (GOX0265) besitzen (BP.1-BP.5). Diese beiden Gruppen hatten eine gemeinsame exponentielle Wachstumsphase mit einer Wachstumsrate von $0,38 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und erreichten eine OD_{600} von $1,14 \pm 0,01$ am Anfang der stationären Phase nach 12 h. Der Wildtyp erreichte anschließend nur noch eine OD_{600} von 1,42 nach 48 h, wohingegen die Stämme der zweiten Gruppe eine höhere OD_{600} von $1,63 \pm 0,02$ nach 48 h auf Grund eines langsamen Wachstums während der stationären Phase erreichten. Die dritte

Gruppe, die Stämme, denen zusätzlich noch die Glucose-Dehydrogenase fehlt (BP.6-BP.10), hatte eine nur halb so hohe logarithmische Wachstumsrate von $0,183 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$. Deswegen erreichte sie auch nur eine OD_{600} von $0,826 \pm 0,009$ nach 12 h. Nach 24 h hatte sie allerdings die gleiche OD_{600} wie die Stämme der zweiten Gruppe und nach 48 h war die OD_{600} mit $1,86 \pm 0,02$ sogar höher. Die vierte Gruppe, die Stämme, denen zusätzlich noch die Polyol-Dehydrogenase fehlt (BP.9 und BP.10), erreichte nach 24 h die höchste OD_{600} und hatte mit einer OD_{600} von $2,02 \pm 0,04$ nach 48 h die höchste OD_{600} der Glucose Wachstumsexperimente.

3.2.1.4. Vergleich der erzeugten Metabolite

Um zu untersuchen, ob die Deletionen der membranständigen Dehydrogenasen Auswirkungen auf eventuell akkumulierte Metabolite von *G. oxydans* haben, wurde nach jedem Versuch die Acetat-, Gluconat- und 2-Ketogluconat-Konzentrationen im Medium mittels HPLC oder HPLC und Enzymkit gemessen (Material und Methoden 2.3.2). Wie in Abbildung 23 gezeigt, wurde nach allen Wachstumsexperimenten die Konzentration an Acetat gemessen. Die Akkumulation von Gluconat und 2-Ketogluconat wurden nur nach einem Wachstum auf Glucose beobachtet. Während des Wachstums auf Fructose akkumulierte der Wildtyp 10,0 mM Acetat und alle Mutanten $15,0 \pm 0,5 \text{ mM}$ Acetat. Während des Wachstums auf Mannitol ergaben sich 8,0 mM Acetat für den Wildtyp und $15,4 \pm 0,4 \text{ mM}$ Acetat für alle Mutanten, die auf Mannitol wachsen konnten (BP.1-BP.8). Für die Mutanten ohne die Polyol-Dehydrogenase wurde nur eine geringe Acetatkonzentration von $1,8 \pm 0,3 \text{ mM}$ auf Grund des fehlenden Wachstums gemessen. Während des Wachstums auf Glucose akkumulierte der Wildtyp alle drei Metabolite Acetat, Gluconat und 2-Ketogluconat. Konzentrationen von 6,9 mM Acetat und 18,1 mM 2-Ketogluconat wurden für den Wildtyp bestimmt. Eine Gluconatkonzentration von $1,8 \pm 0,2 \text{ mM}$ wurde sowohl für den Wildtyp als auch für alle Mutanten ermittelt, die die Glucose-Dehydrogenase noch besitzen (BP.1-BP.5). Bezüglich Acetat und 2-Ketogluconat spaltet sich die Gruppe mit BP.1-BP.5 in

zwei Untergruppen auf. Solange die Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX1230, GOX1231, GOX1232) noch präsent war (BP.1-BP.4), akkumulierte $34,6 \pm 1,9$ mM 2-Ketogluconat und $8,4 \pm 0,6$ mM Acetat. Für BP.5 wurde hingegen $10,5$ mM Acetat und kein 2-Ketogluconat gemessen. Für alle Stämme, bei denen die Glucose-Dehydrogenase deletiert ist, konnte eine gemeinsame Acetatkonzentration von $14,8 \pm 0,4$ mM, eine verschwindend geringe Gluconatkonzentration von $0,2 \pm 0,1$ mM und kein 2-Ketogluconat gemessen werden.

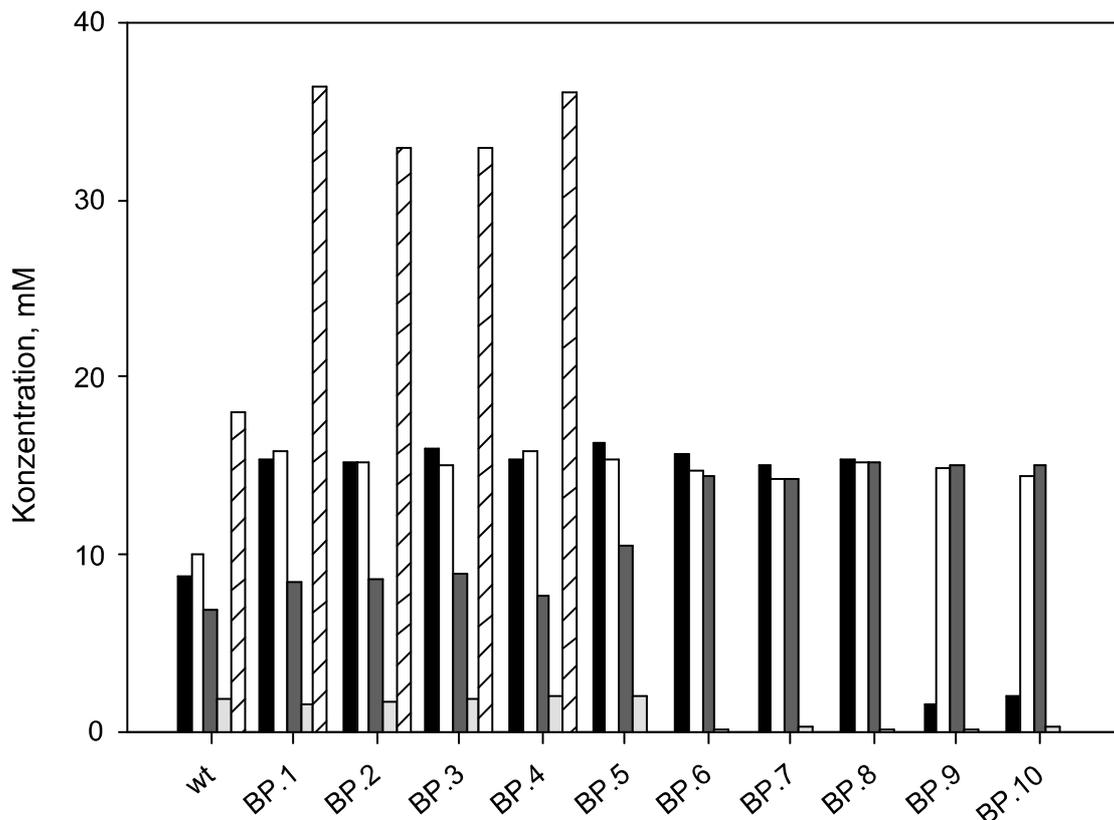


Abbildung 23: Metabolitkonzentrationen in den Mediumüberständen der einzelnen Wachstumsexperimente nach 48 h (siehe auch Peters *et al.* (2013b)). Acetatkonzentrationen auf Mannitol (schwarz), Fructose (weiß) und Glucose (dunkelgrau). Gluconatkonzentrationen auf Glucose (hellgrau) und 2-Ketogluconatkonzentration auf Glucose (schraffiert).

3.2.2. Oxidationsvermögen der einzelnen Deletionsmutanten

Um das beobachtete Wachstumsverhalten und die Metabolitakkumulationen der einzelnen Deletionsstämme mit den tatsächlichen Enzymaktivitäten der membranständigen Dehydrogenasen zu vergleichen, wurde das Substratoxidationsvermögen der einzelnen Deletionsmutanten bestimmt. Dazu wurden klassische und Ganzzell-DCPIP-Assays durchgeführt. Da die Dehydrogenasen konsekutiv deletiert wurden, kann so auf die

Substratspezifitäten der meisten Dehydrogenasen geschlossen werden. Wenn eine Mutante ein Substrat umsetzen kann, die darauf folgenden Mutanten allerdings nicht mehr, kann davon ausgegangen werden, dass die Dehydrogenase, die dazwischen deletiert wurde, verantwortlich für die Oxidation des untersuchten Substrates ist.

3.2.2.1. Etablierung eines Ganzzell-DCPIP-Assay

Wie in Material und Methoden 2.3.3.1 beschrieben, benötigt ein klassischer DCPIP-Assay zur Bestimmung des Substratoxidationsvermögens eine aufgereinigte Membranfraktion einer großen Menge an *G. oxydans* Zellen. Die Anzucht der benötigten Zellen dauert mit Anzucht der Vorkultur 2-3 Tage. Die Aufreinigung ist auch relativ zeitaufwendig, es dauert 6-8 h bis erste Ergebnisse von nur einem Stamm vorliegen. Zudem sind zwei besondere Gerätschaften, die *French Pressure Cell* und eine Ultrazentrifuge, dafür notwendig. Obwohl dieser Test sehr verlässliche und reproduzierbare Daten liefert, ist er doch für den gleichzeitigen Vergleich von mehreren Stämmen mit mehreren Substraten nur bedingt geeignet. Bei Vostiar *et al.* (2004) wurde beobachtet, dass Elektronen aus ganzen *G. oxydans*-Zellen, die bei der Oxidation von Glucose und anderen Substraten generiert werden, mit Hilfe eines Mediators abgegriffen und auf eine Anode übertragen werden können. Auf Grund dieser Beobachtungen konnte angenommen werden, dass PMS die Elektronen eventuell auch durch die äußere Membran transportieren oder DCPIP in das Periplasma diffundieren könnte und so die Nachweisreaktion für die Oxidationsreaktion auch mit ganzen Zellen möglich ist. Vorversuche mit ganzen Zellen und DCPIP-PMS-Lösungen zeigten schnell, dass dies auch in der Praxis durchführbar ist. Ein weiteres Ziel war es, die Reaktion auf einen Mikrotitermaßstab zu skalieren, um in einer Mikrotiterplatte 96 Reaktionen gleichzeitig automatisiert verfolgen zu können. Für den Ganzzell-Assay wurden optimale Konzentrationen von 166 μM DCPIP, 111 μM PMS, 25 mM Substrat und eine Zelldichte OD_{600} 0,2 in Optimierungsexperimenten ermittelt. Für die Substrate wurden Konzentrationen bis 100 mM erfolgreich getestet. Aus Kostengründen für einige teure Substrate wie z.B. Alloose, wurde die

Konzentration allerdings auf 25 mM standardisiert, da hier auch mit den meisten Substraten, die schwächere Oxidationsreaktionen auslösen, gute Ergebnisse erzielt wurden. Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer verwendet, da mit dem MacIlivaine-Puffer des klassischen Assays hier nicht so gleichmäßige Werte erzielt wurden wie mit dem neuen Puffer. Außerdem enthält der MacIlivaine-Puffer Citrat, das in höheren Konzentrationen DCPIP spontan reduziert. Die Reaktionszeit musste auf Grund der niedrigeren Enzymdichte auf 2 h verlängert werden. Die Ansätze wurden vor jedem Messdurchgang durch automatisches Schütteln für 2 sec homogenisiert. Da das benutzte Photometer über keinen Filter für die sonst übliche Wellenlänge von 578 nm verfügte, musste eine neue geeignete Wellenlänge gefunden werden. Hierfür wurde die Absorption von DCPIP im Vergleich zu reduziertem DCPIP in Abhängigkeit der Wellenlänge bei pH 5,0 gemessen und ein lokales Absorptionsmaximum bei 534 nm gefunden, das bei reduziertem DCPIP nicht zu finden ist. Da eine Absorptionsmessung bei 530 nm möglich war, wurde 530 nm als neue Standardwellenlänge für alle DCPIP-Assays gewählt. Anschließend wurde die Absorption von DCPIP in Abhängigkeit seiner Konzentration bei 530 nm und pH 5,0 gemessen und ein molarer Extinktionskoeffizient von $7200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt. Die Mikrotiterplatte wurde vor dem Messvorgang versiegelt, um den Austausch leichtflüchtiger Substrate (z.B. Ethanol oder Acetaldehyd) über die Gasphase in angrenzende Plattenvertiefungen zu verhindern.

3.2.2.2. **Substratscreening mit dem Ganzzell-DCPIP-Assay**

Um auf die Substratspezifitäten der einzelnen Dehydrogenasen schließen zu können, wurden die Mutanten BP1.-BP.9 und der Wildtyp in Ganzzell-DCPIP-Assays untersucht. Bei Substraten, die weiterhin von BP.9 oxidiert werden können (L-Lactat, D-Lactat und 2-Hydroxybuttersäure) wurde der Test auch mit BP.10, bei dem zusätzlich die D-Lactat-Dehydrogenase deletiert war, durchgeführt. Um die Aktivität quantitativ wiedergeben zu können, wurde die Oxidationsaktivität in Units umgerechnet. Es wurde angenommen, dass 1 μmol reduziertes DCPIP 1 μmol oxidiertem Substrat entsprach. 1 Unit entspricht dabei

1 μmol oxidiertem Substrat pro Minute. Bei Verwendung ganzer Zellen ist die Oxidationsaktivität sehr gering, da hierbei im Vergleich zu aufgereinigten Enzymen im klassischen Assay nur 1/60 an Zellvolumen eingesetzt wird. Deshalb wurden im Ganzzell-DCPIP-Assay alle Werte in μUnits angegeben. Im Folgenden werden die Oxidationsaktivitäten nach Substanzklassen getrennt gezeigt. Eine Übersicht über alle Aktivitäten befindet sich im Anhang in Tabelle 17.

3.2.2.2.1. Oxidationsaktivität in Anwesenheit einfacher primärer Alkohole

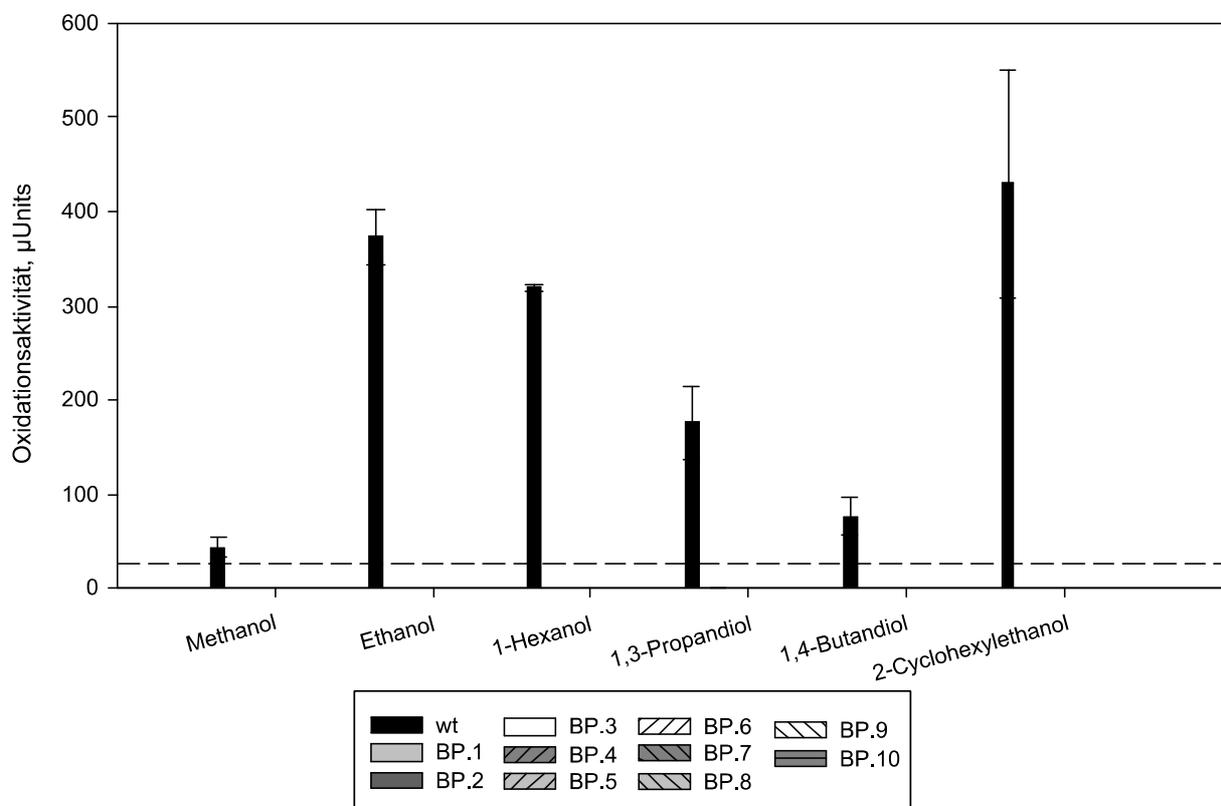


Abbildung 24: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit einfacher primärer Alkohole. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 μUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, wurden einfache primäre Alkohole wie Methanol, Ethanol, 1-Hexanol, 1,3-Propanediol, 1,4-Butandiol und 2-Cyclohexylethanol nur vom Wildtyp umgesetzt. Da in BP.1 nur die membranständige Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067, GOX1068) deletiert ist und hier die Aktivität bereits nicht mehr verzeichnet werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass nur die Alkohol-Dehydrogenase diese Substrate im

Periplasma umgesetzt. Ethanol und 2-Cyclohexylethanol wurden am besten oxidiert, wohingegen die Oxidation von Methanol und 1,4-Butanediol am langsamsten ablief.

3.2.2.2.2. Oxidationsaktivität in Anwesenheit einfacher sekundärer Alkohole

Wie in Abbildung 25 gezeigt, wurden die sekundären Alkohole Isopropanol, 2-Hexanol, 3-Hexanol, aber auch die rein sekundären Diole 2,3-Butandiol, 2,4-Pentandiol und 2,5-Hexandiol vom Wildtyp und allen Mutanten (BP.1-BP.8) umgesetzt, die noch eine Polyol-Dehydrogenase (GOX0854 GOX0855) besitzen.

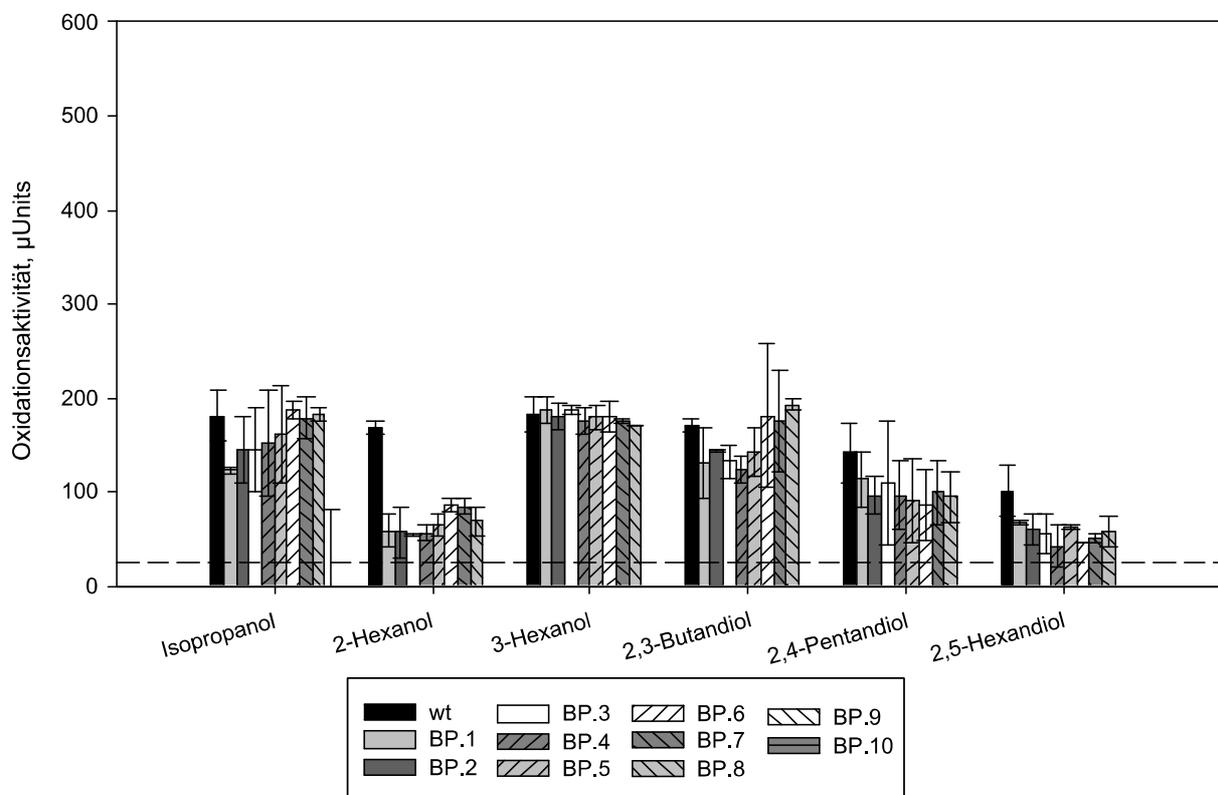


Abbildung 25: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit einfacher sekundärer Alkohole. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Damit ist bewiesen, dass mindestens die Polyol-Dehydrogenase diese Substrate im Periplasma oxidieren kann. Bei 2-Hexanol ist auffällig, dass die Oxidationsleistung des Wildtyps wesentlich höher war, als die aller Mutanten. Bei 2,4-Pentandiol und 2,5-Hexandiol ist dieser Effekt auch sichtbar, aber nicht so ausgeprägt.

1-Cyclohexylethanol, ein weiterer sekundärer Alkohol, wurde ohne Aktivität getestet (nicht gezeigt).

3.2.2.2.3. Oxidationsaktivität in Anwesenheit einfacher gemischter und cyclischer Alkohole

Für Alkohole mit sowohl primären als auch sekundären Alkoholgruppen konnte, wie in Abbildung 26 gezeigt, eine Oxidation bei den Vertretern 1,3-Butandiol, 1,2-Pentandiol und 1,2-Hexandiol mit allen Stämmen außer BP.9 und BP.10 festgestellt werden. Diese Alkohole werden folglich von der Polyol-Dehydrogenase umgesetzt.

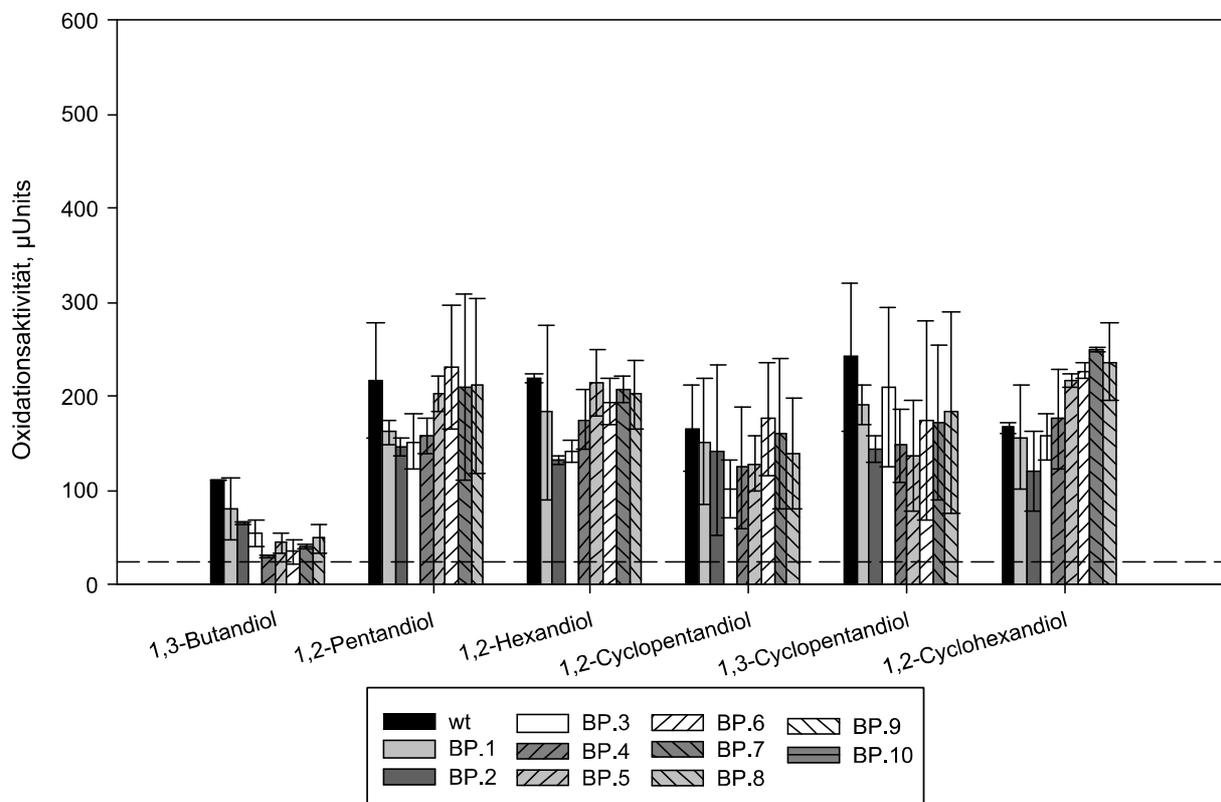


Abbildung 26: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit einfacher gemischter oder cyclischer Alkohole. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Die Oxidationsaktivität war bei 1,3-Butandiol wesentlich geringer als bei 1,2-Pentandiol oder 1,2-Hexandiol deren Aktivitäten im Rahmen der Messungenauigkeiten gleich waren. In Anwesenheit der cyclischen Alkohole 1,2-Cyclopentandiol und 1,3-Cyclopentandiol konnte eine ebenso hohe Aktivität bei den gleichen Stämmen festgestellt werden. Für 1,2-Cyclohexandiol wurden zunächst die *cis*- und *trans*-Isomere getrennt untersucht. Da sich die

Aktivitäten nicht voneinander unterschieden, ist hier nur die Aktivität des Racemats angegeben, welches ebenfalls von Stämmen mit Polyol-Dehydrogenase umgesetzt wird.

3.2.2.2.4. Oxidationsaktivität in Anwesenheit einfacher Aldehyde

Für die einfachen Aldehyde Formaldehyd, Acetaldehyd und Valeraldehyd konnte, wie in Abbildung 27 zu sehen, eine hohe Oxidationsaktivität im Wildtyp und eine geringere in den Mutanten BP.1 und BP.2 beobachtet werden. Bei Butyraldehyd waren die Aktivitäten bei allen Stämmen, die Aktivität zeigten (wt, BP.1, BP.2), gleich.

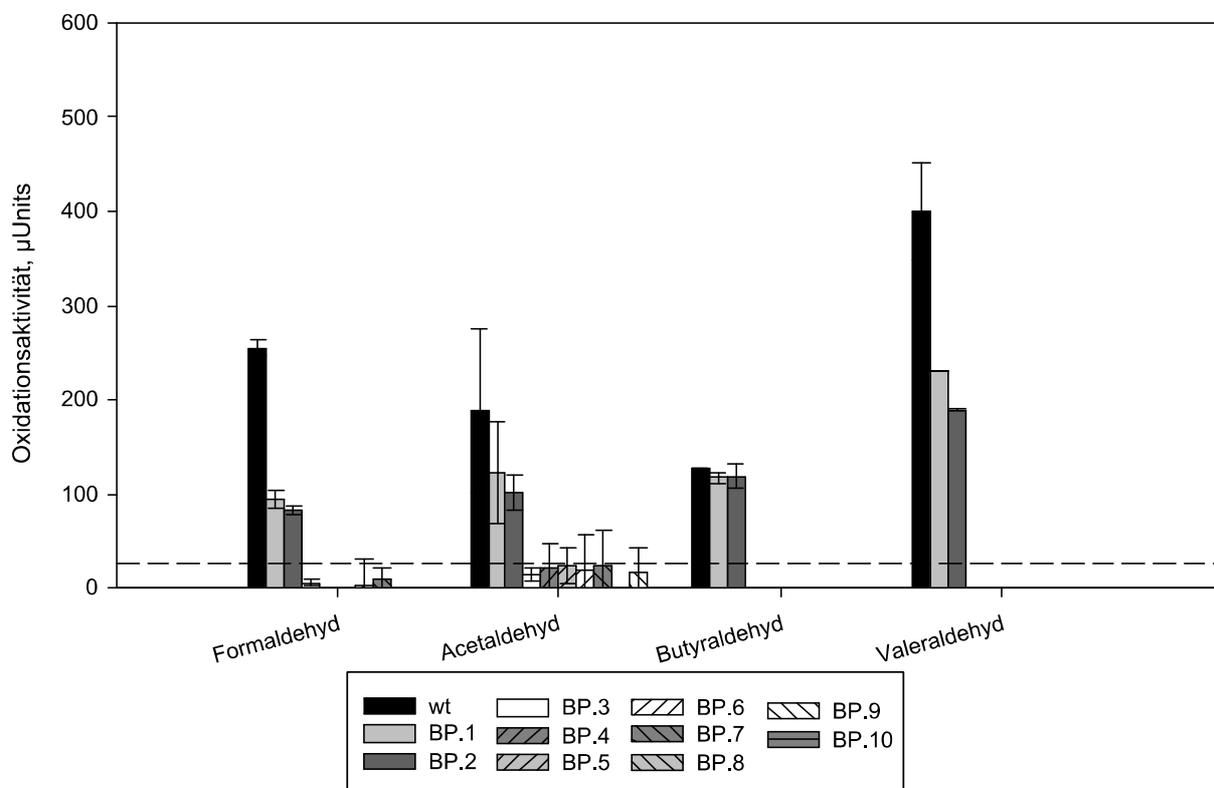


Abbildung 27: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit einfacher Aldehyde. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Eine Oxidationsaktivität konnte somit mindestens für die Acetaldehyd-Dehydrogenase nachgewiesen werden. Valeraldehyd wurde von dieser am besten, Formaldehyd am schlechtesten umgesetzt. Bei Acetaldehyd fällt eine mit großen Fehlern behaftete Aktivität für alle weiteren Stämme auf. Diese Aktivität konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, da sie in manchen Experimenten bis zum Stamm BP.10 bestand. Da diese Aktivität in einem klassischen Assay mit BP.10 nicht nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt), wurde der

Schwellenwert auf 25 μ Units festgesetzt, so dass diese Werte nicht mehr als positive Werte eingestuft wurden.

3.2.2.2.5. Oxidationsaktivität in Anwesenheit von Zuckeralkoholen (Polyole)

Wie in Abbildung 28 zu sehen, liefert die Gruppe der Zuckeralkohole im Gegensatz zu den bisher gezeigten Gruppen nicht das gleiche Bild für alle Substrate.

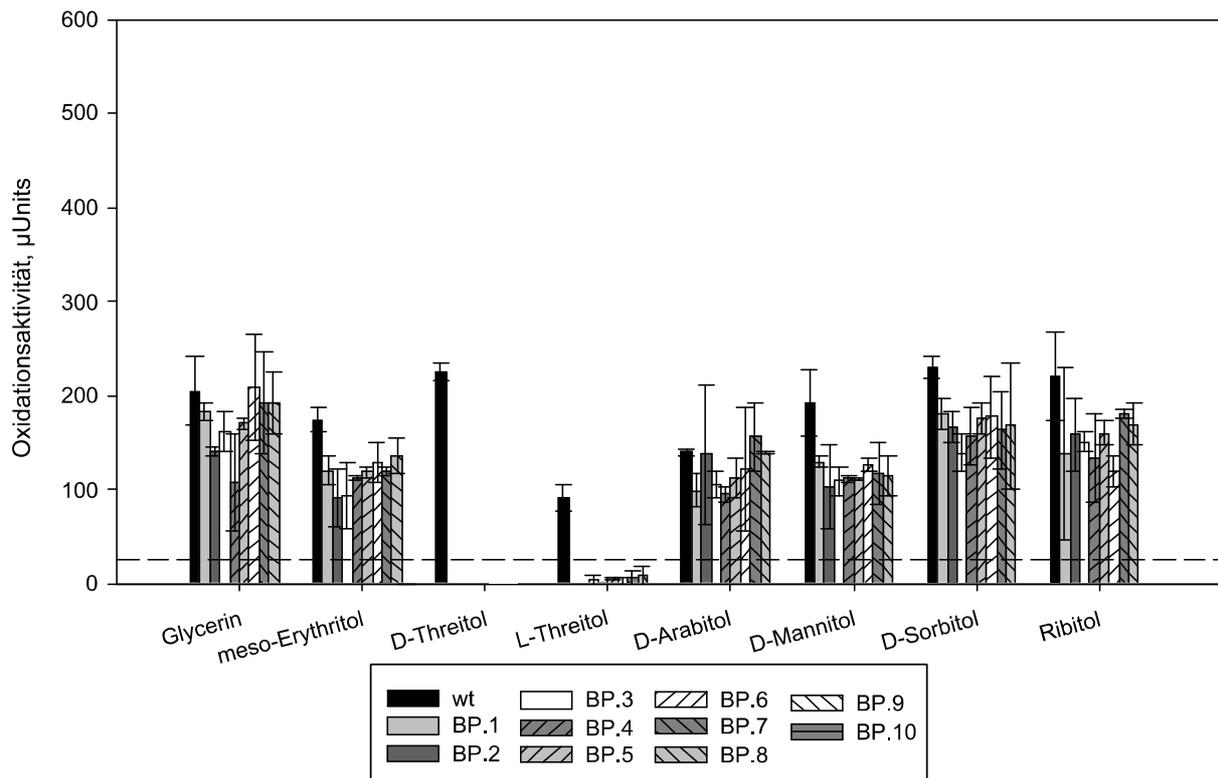


Abbildung 28: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit von Zuckeralkoholen (Polyole). Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 μ Units ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Während Glycerin, *meso*-Erythritol, D-Arabitol, D-Mannitol, D-Sorbitol und Ribitol von allen Stämmen, die eine Polyol-Dehydrogenase besitzen (wt, BP.1-BP.8) umgesetzt wurden, wurden D-Threitol und L-Threitol nur vom Wildtyp und deswegen folglich nur von der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase umgesetzt. Hier war die Oxidationsaktivität von L-Threitol niedriger als die des D-Enantiomers. In Anwesenheit von D-Arabitol, D-Mannitol und *meso*-Erythritol war die Aktivität im Allgemeinen etwas geringer als bei D-Sorbitol, Ribitol und Glycerin. Neben der Aktivität in Anwesenheit dieser Zuckeralkohole wurden auch

die Aktivitäten in Anwesenheit von L-Arabitol, D-Xylitol und Dulcitol bestimmt (nicht gezeigt). Hier zeigte sich allerdings bereits für den Wildtyp keine Aktivität, woraus geschlussfolgert werden kann, dass diese Substrate von keiner Dehydrogenase im Periplasma oxidiert werden konnten.

3.2.2.2.6. Oxidationsaktivität in Anwesenheit von Aldosen

Ein Vergleich der Aktivitäten in Anwesenheit der Aldotriose Glycerinaldehyd, der beiden Aldotetrosen D-Threose und D-Erythrose, sowie der Aldopentosen D-Xylose, D-Ribose, D-Arabinose, L-Arabinose und D-Lyxose in Abbildung 29, zeigt zunächst die hohe Aktivität in Anwesenheit von D-Erythrose auf, die doppelt so hoch war, wie die in Anwesenheit fast aller anderen Aldosen. Auch fällt auf, dass D-Arabinose nur vom Wildtyp umgesetzt wurde und folglich nur von der Alkohol-Dehydrogenase oxidiert wurde. Bei Glycerinaldehyd, D-Threose, D-Erythrose, D-Ribose und D-Lyxose wurde diese Aktivität wieder für alle Stämme mit einer Polyol-Dehydrogenase beobachtet (wt, BP.1-BP.8). In Anwesenheit von D-Xylose und L-Arabinose zeigte sich nur eine Aktivität, solange die Glucose-Dehydrogenase (GOX0265) vorhanden war (wt, BP.1-BP.5). Dies traf auch auf alle getesteten D-Aldohexosen zu, deren Aktivitäten in Abbildung 30 dargestellt sind. Hier zeigte sich, dass die Anwesenheit von D-Glucose und D-Allose hohe Aktivitäten und die von D-Galactose, D-Altrose und D-Mannose geringere Aktivitäten hervorriefen.

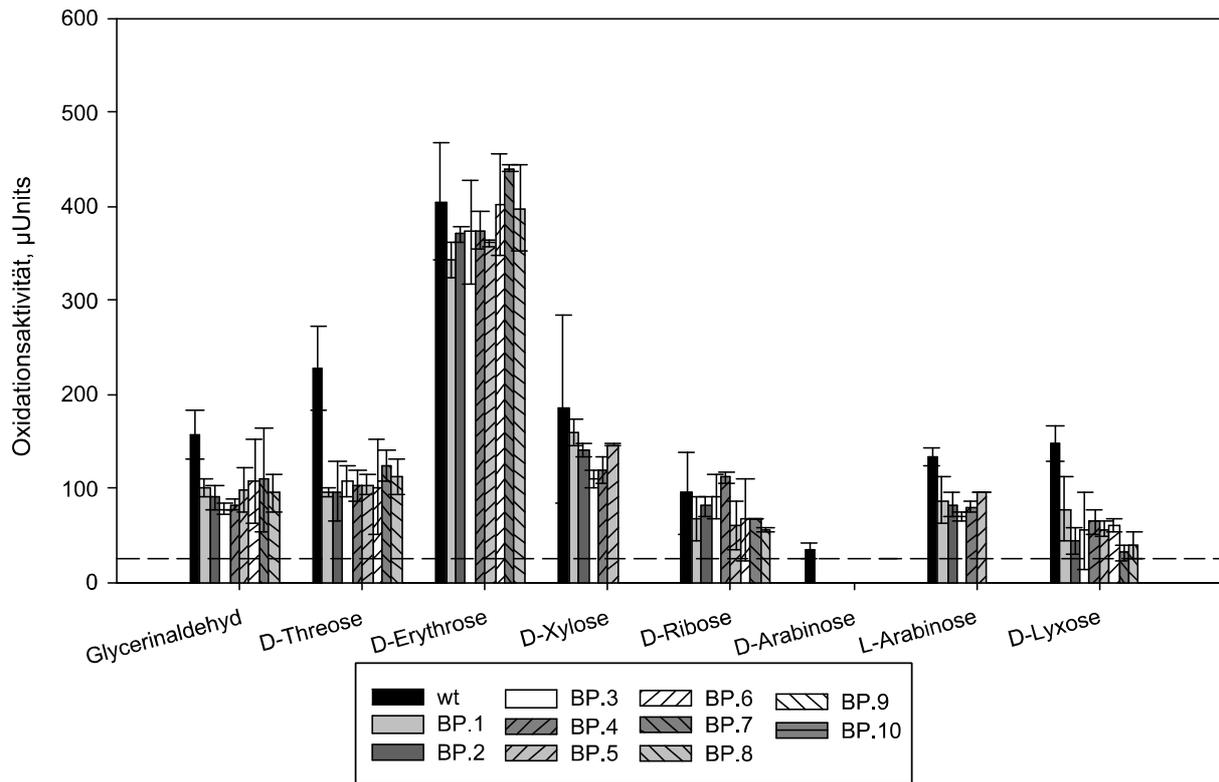


Abbildung 29: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit von Aldotriosen, -tetrosen und -pentosen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

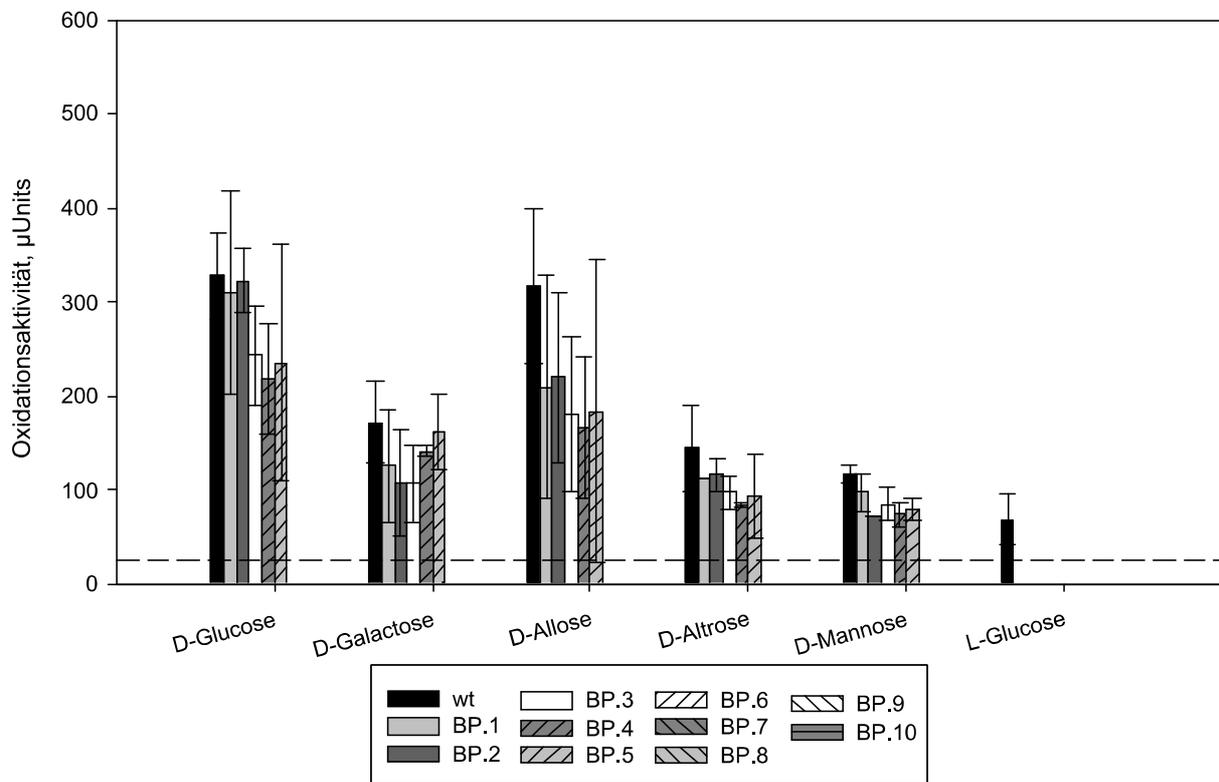


Abbildung 30: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit von Aldoheptosen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Für L-Glucose wurde nur eine Aktivität für den Wildtyp gemessen, was wiederum für eine Umsetzung durch die membranständige Alkohol-Dehydrogenase spricht. Neben diesen Aldosen wurden auch noch Experimente in Anwesenheit von D-Glucoheptose durchgeführt, die allerdings keine Aktivitäten zeigten.

3.2.2.2.7. Oxidationsaktivität in Anwesenheit von Ketosen oder Dissacchariden

Wie in Abbildung 31 gezeigt, konnten nur wenige Ketosen umgesetzt werden. Alleine L-Erythrulose zeigte eine Aktivität für alle Stämme, die noch eine Polyol-Dehydrogenase besaßen (wt, BP.1-BP.8). D-Sedoheptulose wurde nur vom Wildtyp und somit folglich nur von der Alkohol-Dehydrogenase umgesetzt. Weiterhin wurden noch Dihydroxyaceton, D-Fructose und L-Sorbose untersucht (nicht gezeigt), bei denen sich aber keine Oxidationsaktivitäten zeigten. Neben den Monosacchariden wurden auch Disaccharide untersucht.

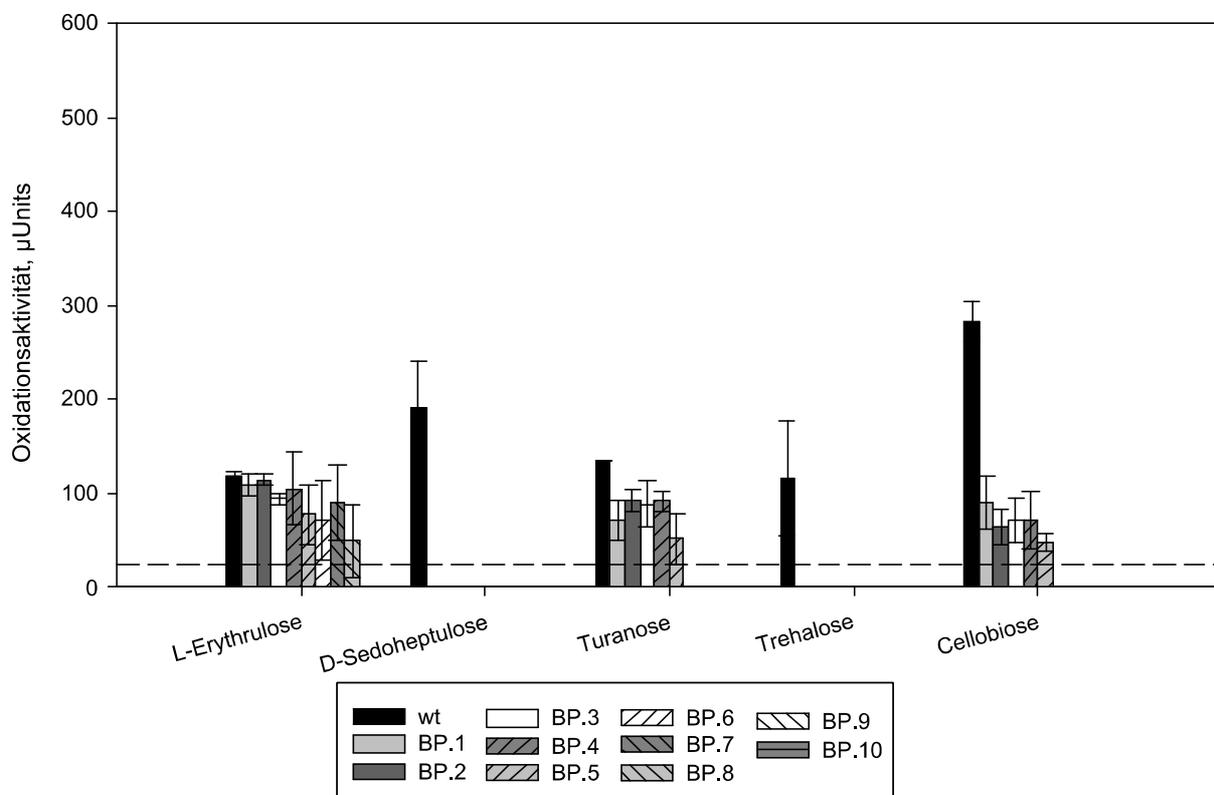


Abbildung 31: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit von Ketosen oder Dissacchariden. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 μ Units ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Hier zeigten sich lediglich in Anwesenheit von Turanose und Cellobiose Aktivitäten für alle Stämme mit Glucose-Dehydrogenase (wt, BP.1-BP.5). Die Cellobiose zeigte eine stark erhöhte Aktivität im Wildtyp. Trehalose wurde nur von diesem umgesetzt. Für die Dissachariden Lactose, Lactulose, Maltose, Maltulose und Saccharose wurde in keinem der Stämme eine Aktivität beobachtet (nicht gezeigt).

3.2.2.2.8. Oxidationsaktivität in Anwesenheit von Carbonsäuren und weiteren Substraten

In Abbildung 32 sind die Aktivitäten in Anwesenheit aller restlichen positiven Substrate dargestellt. Für Gluconat teilte sich die Aktivität in zwei Gruppen. Eine hohe Aktivität zeigte sich für alle Stämme, die noch die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX1230, GOX1231, GOX1232) besaßen (wt, BP.1-BP.4), eine niedrige für die, die noch die Polyol-Dehydrogenase besaßen (BP.5-BP.8).

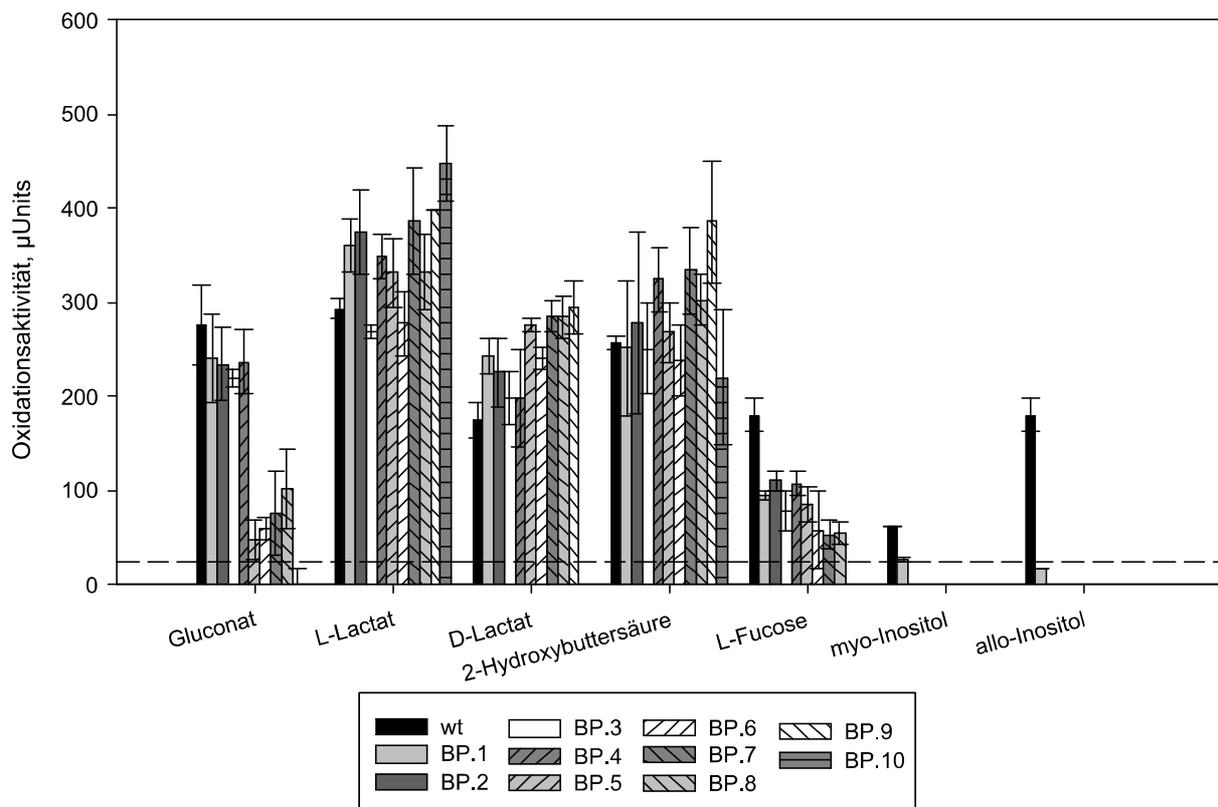


Abbildung 32: Oxidationsaktivität von wt und BP.1-BP.10 in Anwesenheit von Carbonsäuren oder weiteren Substraten. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Für L-Lactat wurde eine hohe Aktivität in allen Stämmen (wt, BP.1-BP.10) gemessen, für D-Lactat in allen Stämmen außer BP.10, da dieser keine membranständige D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253) mehr besitzt. Das Racemat aus 2-Hydroxybuttersäure zeigte wiederum eine Umsetzung bei allen Stämmen. L-Fucose wurde von allen Stämmen umgesetzt, die die Polyol-Dehydrogenase besaßen (wt, BP.1-BP.8). *Myo*- und *allo*-Inositol wurden nur vom Wildtyp und BP.1 umgesetzt, was mindestens auf eine Oxidation durch die Inositol-Dehydrogenase (GOX1857) schließen lässt. Die Oxidationsaktivität vom Wildtyp ist bei *allo*-Inositol höher als bei *myo*-Inositol. Allerdings liegt die Oxidationsaktivität von BP.1 bei *allo*-Inositol knapp unter dem Schwellenwert von 25 μ Units. Des Weiteren wurden Acetat, D-Glucuronsäure, 2-Ketogluconat, 5-Ketogluconat, 3-Hydroxybuttersäure, Weinsäure, L-Rhamnose und L-Serin als Substrate ohne Aktivität für alle Stämme getestet (nicht gezeigt). Einige Substrate sind auch in der Lage DCPIP ohne die Zellen als Katalysator zu reduzieren und eignen sich demzufolge nicht für diesen Assay. Neben der dafür bekannten Ascorbinsäure wurden auch Shikimisäure, Chinasäure, Citrat, Malat, Glycerinsäure, Mandelsäure, Pyrogallol, Phloroglucin, Ampicillin, Cefoxitin als spontane Reduzierer identifiziert (nicht gezeigt).

3.2.2.2.9. Oxidationsaktivität in Anwesenheit von L-Lactat bei verschiedenen putativen L-Lactat-Dehydrogenase-Deletionsmutanten

Wie schon bei der Konstruktion der Deletionsmutanten erwähnt (3.1.12) und wie in Punkt 3.2.2.2.8 durch die immer noch verbleibende Oxidationsaktivität in BP.10 gezeigt, wird eine unbekannte membranständige L-Lactat-Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H vermutet. Aus diesem Grund wurden mehrere putative L-Lactat Dehydrogenasen deletiert (3.1.12) und die daraus resultierenden Mutanten in Ganzzell-DCPIP-Assays untersucht. Wie in Abbildung 33 gezeigt, unterscheiden sich die Deletionsmutanten und der Wildtyp nicht wesentlich in der Oxidationsaktivität in Anwesenheit von L-Lactat. Die Aktivitäten der Mutante *G. oxydans* Δ upp Δ GOX1170, *G. oxydans* Δ upp Δ GOX1168 Δ GOX1169 Δ GOX1170 und *G. oxydans*

Δupp $\Delta GOX2071$ $\Delta GOX1170$ $\Delta GOX1253$ waren etwas geringer als die der anderen Mutanten oder die des Wildtyps.

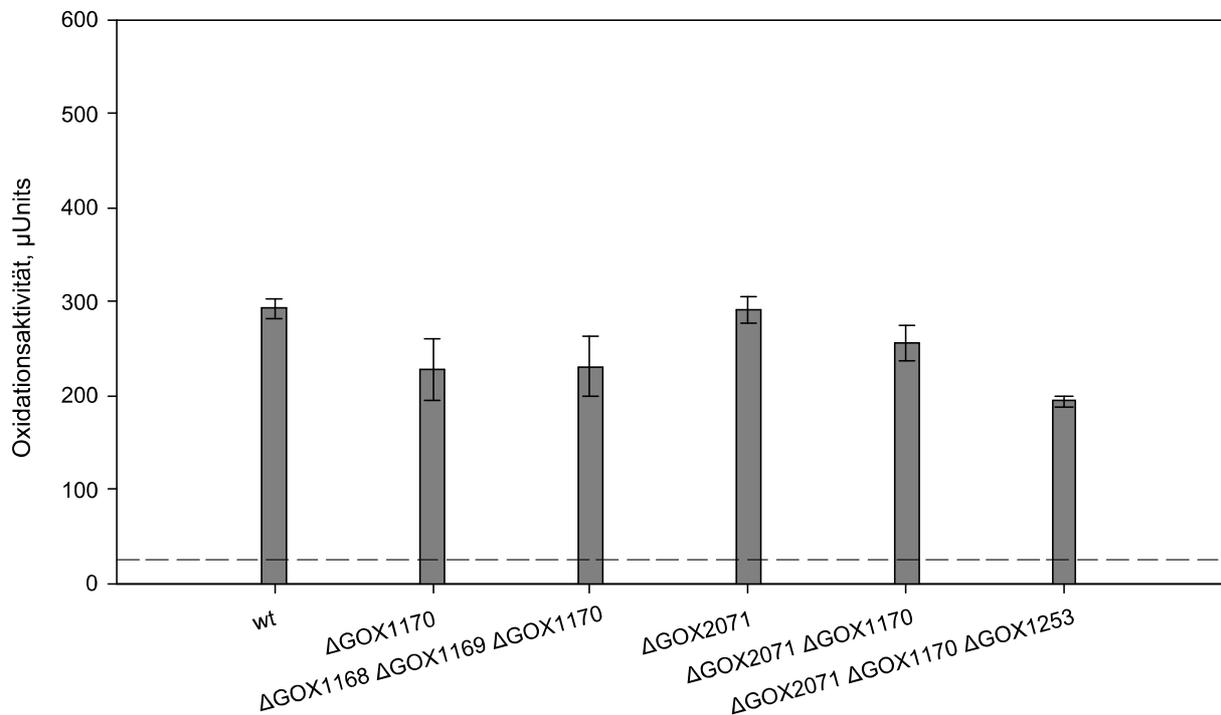


Abbildung 33: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* Δupp (wt) sowie *G. oxydans* Δupp $\Delta GOX1170$, *G. oxydans* Δupp $\Delta GOX1170$, *G. oxydans* Δupp $\Delta GOX1168 \Delta GOX1169 \Delta GOX1170$, *G. oxydans* Δupp $\Delta GOX2071 \Delta GOX1170$, *G. oxydans* Δupp $\Delta GOX2071 \Delta GOX1170 \Delta GOX1253$ in Anwesenheit von L-Lactat. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

3.2.2.3. Vergleich mit einem klassischen DCPIP-Assay

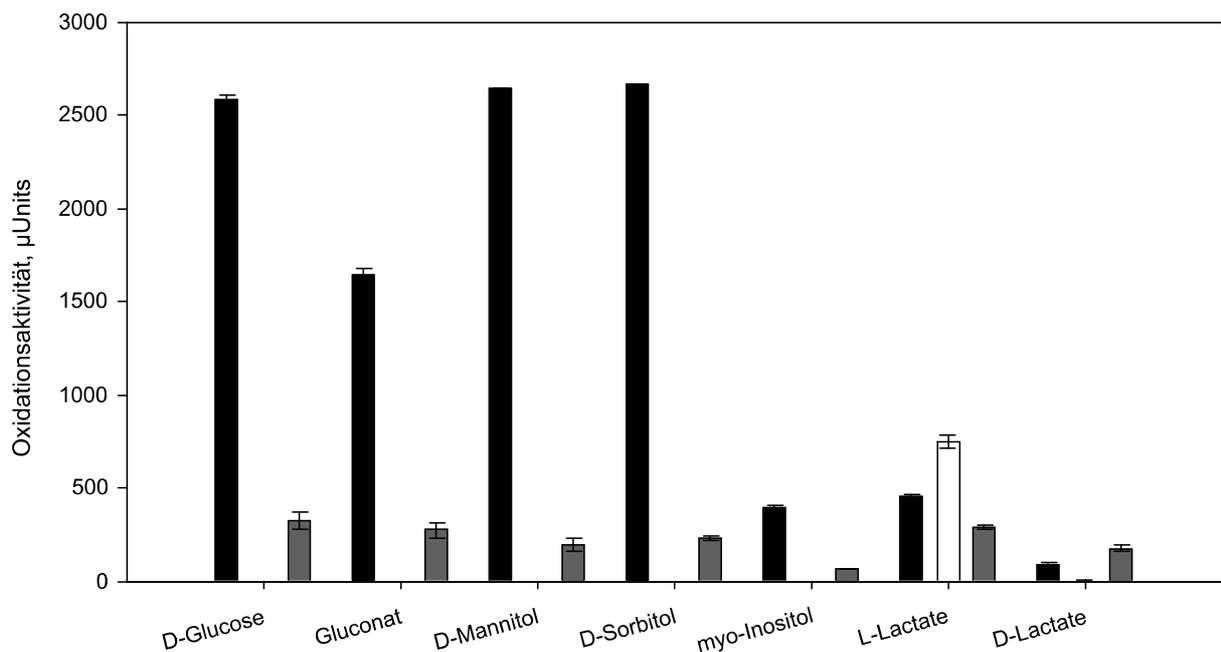


Abbildung 34: Oxidationsaktivität einer Membranfraktion isoliert aus wt (schwarz) und BP.10 (weiß) in Anwesenheit von D-Glucose, Gluconat, D-Mannitol, D-Sorbitol, myo-Inositol, L-Lactat und D-Lactat. wt Zellen (grau) repräsentiert die jeweiligen Werte für den Wildtyp aus Ganzzell-DCPIP Assays zum Vergleich.

Um die Aussagen der Ganzzell-Assays exemplarisch zu bestätigen, wurden klassische DCPIP-Assays vom Wildtyp und der Komplettdelentionsmutante BP.10 durchgeführt. Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, waren die Oxidationsaktivitäten auf Grund des größeren Zellvolumens, das für eine Aufreinigung verwendet wurde und natürlich durch die Aufreinigung selbst in den meisten Fällen wesentlich höher als die Aktivitäten der Ganzzell-Assays. Die einzige Ausnahme bilden die Lactate, die im Falle von D-Lactat im Ganzzell-Assay sogar höhere Aktivität zeigten. Bei L-Lactat ist der Unterschied viel geringer als z.B. bei Glucose. Der absolute Wert ist aber immer noch höher für den klassischen Assay als für den Ganzzell-Assay. BP.10 zeigte nur eine Aktivität für L-Lactat. Dies beweist, dass es sich bei der noch nicht gefundenen L-Lactat-Dehydrogenase um eine membranständige Dehydrogenase handeln muss.

3.3. Integration von membranständigen Dehydrogenasen in das Chromosom von *G. oxydans*

Mit der Deletion aller 10 gefundenen membranständigen Dehydrogenasen sollte *G. oxydans* BP.10 als Expressionsstamm für membranständige Dehydrogenasen verwendet werden. Eine Möglichkeit zur Expression membranständiger Dehydrogenasen ist die Integration der für eine membranständige Dehydrogenase codierenden Gene an die Stelle im Chromosom von *G. oxydans*, an der sich vorher membranständige Dehydrogenasen befunden haben. Da die Promotorregionen an diesen Stellen noch vorhanden sind, würde die neue membranständige Dehydrogenase, genau wie die deletierte, exprimiert werden.

3.3.1. Erstellung der Integrationmutanten

Zunächst sollten bereits deletierte Dehydrogenasen an die ursprüngliche Stelle zurückgesetzt werden, an der sie vorher deletiert wurden, um zu zeigen, dass mit der upp-Deletionsmethode auch eine Integration ins Genom möglich ist. Außerdem könnten somit Substrataktivitäten nachgewiesen werden, die durch die konsekutive Deletion der membranständigen

Dehydrogenasen in den vorher gezeigten DCPIP-Assays nicht sichtbar gewesen sind, da sie von erst später deletierten Dehydrogenasen und deren Aktivitäten überschattet wurden.

3.3.1.1. Integration der Alkohol-Dehydrogenase

Zur Reintegration der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 GOX1068) wurde, wie in Abbildung 35 gezeigt, ein Integrationsfragment der Länge 3740 bp mit den Primern *up_GOX1068-7_fwd* und *do_GOX1068-7_rev* amplifiziert, das die beiden ehemaligen Flanken und die beiden Untereinheiten GOX1068 und GOX1067 enthält. Auf Grund der *EcoRI*-Schnittstelle im ehemaligen Down-Fragment wurde das Integrationsfragment in der anschließenden Inkubation mit *XbaI* und *EcoRI* auf 3230 bp verkürzt und anschließend in pAJ63a kloniert. Die Integration in *G. oxydans* BP.9 wurde, wie in Material und Methoden Punkt 2.2.9 beschrieben, durchgeführt. Der daraus resultierende Stamm wurde *G. oxydans* BP.9:ADH (*G. oxydans* Δ *upp* Δ GOX1857 Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587 Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097 Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232 Δ GOX0265 Δ GOX1441 Δ GOX0516 Δ GOX0854 Δ GOX0855) genannt.

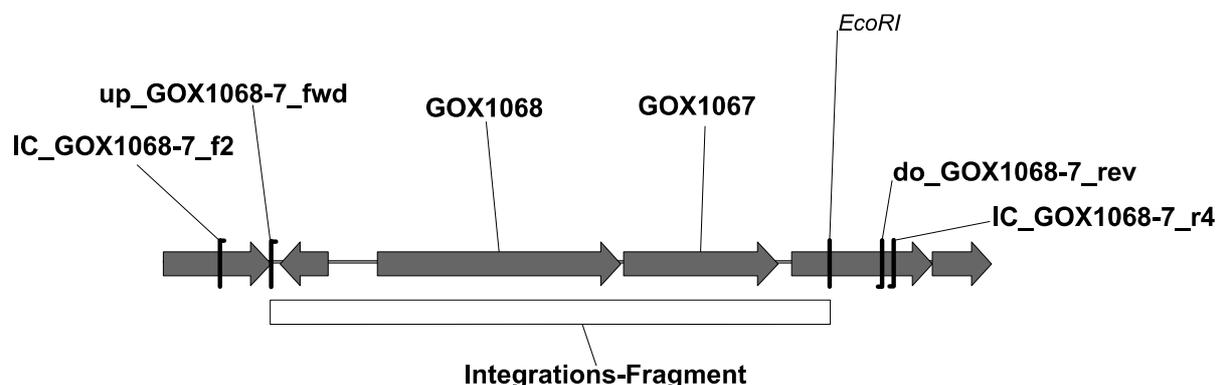


Abbildung 35: Konstruktion des Integrationskonstrukts (3230 bp) mit den Primern *up_GOX1068-7_fwd* und *do_GOX1068-7_rev* zur Reintegration der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 GOX1068) ins Chromosom von *G. oxydans* BP.9. Die Integration wurde mit den Primern *IC_GOX1068-7_f2* und *IC_GOX1068-7_r4* überprüft.

3.3.1.2. Integration der Polyol-Dehydrogenase an die Stelle der Alkohol-Dehydrogenase

Um zu zeigen, dass auch Gene für membranständige Dehydrogenasen in die Loci von Genen anderer membranständigen Dehydrogenasen gesetzt werden können, wurde die

membranständige Polyol-Dehydrogenase (GOX0854 GOX0855) in den Locus der deletierten Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067 GOX1068) in den Stämmen BP.9 und BP.8.1 gesetzt. Die Konstruktion des Integrationsfragments wurde bereits in Material und Methoden Punkt 2.2.9 beschrieben. Aus dem Stamm BP.9 wurde durch Integration der Stamm *G. oxydans* BP.9 $\Delta madh::sldAB$ (*G. oxydans* Δupp $\Delta GOX1067$ $\Delta GOX1068$ $\Delta GOX1857$ $\Delta GOX0585$ $\Delta GOX0586$ $\Delta GOX0587$ $\Delta GOX2094$ $\Delta GOX2095$ $\Delta GOX2096$ $\Delta GOX2097$ $\Delta GOX1230$ $\Delta GOX1231$ $\Delta GOX1232$ $\Delta GOX0265$ $\Delta GOX1441$ $\Delta GOX0516$ $\Delta GOX0854$ $\Delta GOX0855$ $\Delta madh::sldAB$), aus BP.8.1 *G. oxydans* BP.8.1 $\Delta madh::sldAB$ (*G. oxydans* Δupp $\Delta GOX1067$ $\Delta GOX1068$ $\Delta GOX1857$ $\Delta GOX0585$ $\Delta GOX0586$ $\Delta GOX0587$ $\Delta GOX2094$ $\Delta GOX2095$ $\Delta GOX2096$ $\Delta GOX2097$ $\Delta GOX1230$ $\Delta GOX1231$ $\Delta GOX1232$ $\Delta GOX0265$ $\Delta GOX0854$ $\Delta GOX0855$ $\Delta GOX1441$ $\Delta madh::sldAB$).

3.3.2. Physiologie der Integrationsmutanten

Nach der Konstruktion der Integrationsmutanten wurde durch Ganzzell-DCPIP-Assays die erfolgreiche Expression der integrierten Gene überprüft.

3.3.2.1. Physiologie der Reintegrationsmutante *G. oxydans* BP.9:ADH

Zunächst wurde die chromosomale Expression der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase mit dem Stamm BP.9:ADH in Ganzzell-DCPIP-Assays überprüft. Wie in Abbildung 36 zu sehen, konnte die integrierte Alkohol-Dehydrogenase wieder erfolgreich exprimiert und die Alkohole Ethanol, 1,2-Butandiol, 1,2-Hexandiol und 1,2-Pentandiol mit einer primäre Alkoholgruppe oxidieren werden. In Anwesenheit von D-Glycerinaldehyd und D-Erythrose zeigte der Stamm eine sehr schwache Aktivität, die unter dem Schwellenwert von 25 μ Units lag. Die Substrate D-Threose und L-Fucose konnten auch durch die Alkohol-Dehydrogenase umgesetzt werden. Außerdem wurden 1,2-Cyclopentandiol, 1,2-Cyclohexandiol, D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Allose, Glycerol, D-Lyxose, D-Galactose, D-Mannose, L-Erythrulose, D-Ribose, L-Arabinose, D-Arabitol, D-Glucose, D-Turanose und

D-Xylose getestet, in deren Anwesenheit BP.9:ADH aber keine Aktivität zeigte (nicht gezeigt).

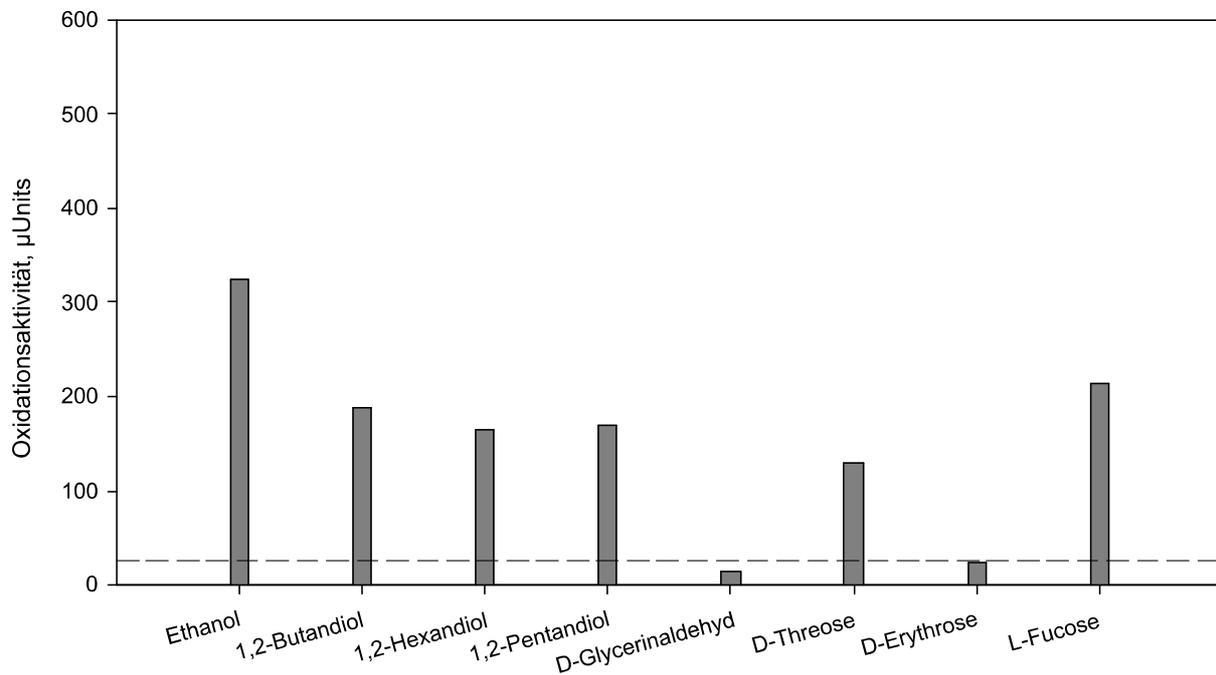


Abbildung 36: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* BP.9:ADH in Anwesenheit von Ethanol, 1,2-Butandiol, 1,2-Hexandiol, 1,2-Pentandiol, D-Glycerinaldehyd, D-Threose, D-Erythrose und L-Fucose. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

3.3.2.2. Physiologie der Integrationsmutante *G. oxydans* BP.8.1 $\Delta madh::sldAB$

Nachdem gezeigt worden war, dass eine deletierte membranständige Dehydrogenase mit dem upp-System erfolgreich zurück in das Chromosom gesetzt werden konnte, wurde nun eine Dehydrogenase an einem fremden Locus untersucht. Wie in Abbildung 37 gezeigt, kann auch die Mutante *G. oxydans* BP.8.1 $\Delta madh::sldAB$ mit einer Polyol-Dehydrogenase im Locus der Alkohol-Dehydrogenase die wichtigsten Substrate der Polyol-Dehydrogenase wie *meso*-Erythritol, Glycerin, D-Mannitol und D-Sorbitol umsetzen. Da das Substratspektrum der Polyol-Dehydrogenase bereits mit den Multideletionsmutanten untersucht werden konnte, wurden keine weiteren Substrate außer Negativkontrollen wie Glucose getestet. Der Stamm *G. oxydans* BP.8.1 $\Delta madh::sldAB$ konnte auch wieder auf Mannitol wachsen (nicht gezeigt). Da die Strategie zur Expression von membranständigen Dehydrogenasen mit der Etablierung eines Plasmid-gestützten Expressionssystems (Mientus *et al.* 2013) geändert wurde, wurden

keine weiteren Integrationsmutanten erzeugt und die schon erzeugte Mutante *G. oxydans* BP.9 $\Delta madh::sldAB$ nur auf ein positives Wachstum auf Mannitolmediumsplatten untersucht (nicht gezeigt).

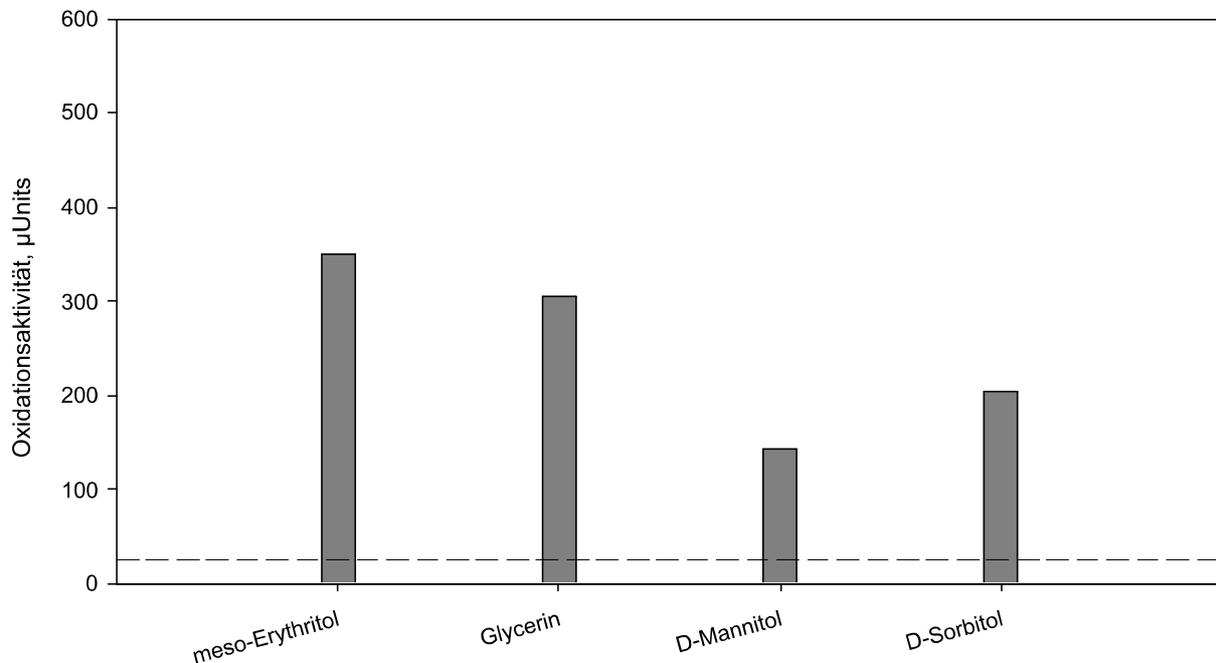


Abbildung 37: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* BP.8.1 $\Delta madh::sldAB$ in Anwesenheit von meso-Erythritol, Glycerin, D-Mannitol und D-Sorbitol. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

3.4. Das Metagenom einer Essigmutter

Wie bereits erwähnt, sollte die Quelle für neue membranständige Dehydrogenasen, die in dem konstruierten Multideletionsstamm exprimiert werden sollten, ein Metagenom aus einer Essigmutter sein.

3.4.1. Kultivierung einer Essigmutter und Isolation der DNA

Um ein Metagenom von Essigsäurebakterien zu bekommen, wurde versucht, aus mehreren gekauften oder gezüchteten Essigmüttern DNA zu isolieren. Dafür wurden verschiedene Versuche mit einer Fruchtfliege (F), einem biofilmartigen Bodensatz eines *Aceto balsamico* (B) und mit über eine Online-Auktionsplattform erworbenen Essigmüttern (EI, EII und EIII), durchgeführt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: In der Arbeit untersuchte Essigmütter. N = keine Kultivierung möglich, B = Biofilm(-bildung) beobachtet, S = Sedimentbildung beobachtet, I = Isolierung von DNA erfolgreich.

Abk.	Herkunft	Kultivierungsmaßnahmen				
		keine	Wein	50 % Wein	50 % Traubensaft	50 % Federweißer
EI	Online-Auktion	B/I	N	S	B	B
EII	Online-Auktion	B/I	-	-	-	-
EIII	Online-Auktion	B/I	-	-	-	B/I
B	Privat	B	N	N	B	B
F	-	-	N	N	N	N

Die gekauften Essigmütter und der *Aceto balsamico*-Bodensatz hatten bereits eine biofilmartige Konsistenz wie am Beispiel der Essigmutter EII in Abbildung 38A gezeigt ist. Aus den gekauften EI, EII und EIII war auch ohne Kultivierung eine Isolation von hochmolekularer DNA mit dem in Material und Methoden Punkt 2.4.2 gezeigten Protokoll möglich. Aus diesem Grund wurde die Kultivierung der Essigmutter EII nicht weiterverfolgt. EI wurde als Positivkontrolle in den einzelnen Kultivierungsversuchen mitkultiviert. Da aus dem *Aceto balsamico*-Bodensatz keine Isolation von DNA möglich war, wurde eine Kultivierung versucht, um eventuelle störende Komponenten zu verdünnen oder um die Biofilmstruktur zu lockern, die eventuell die Isolation der DNA verhinderte. Aus der Begleitflora der Fruchtfliege sollte durch die Kultivierung zunächst ein Biofilm entstehen. Die Kultivierung wurde gemäß Material und Methoden Punkt 2.4.1 durchgeführt. Als erstes wurde eine Kultivierung in Wein versucht. Dazu wurde von jeder Probe ein kleines Stück des Ausgangsbiofilms bzw. eine Fliege in Fernbachkolben mit Wein oder mit Wein eins zu eins mit sterilem Leitungswasser verdünnt, gegeben. Allerdings konnte hier selbst nach 2 Monaten bei keiner Probe ein Wachstum beobachtet werden. Alleine bei der Essigmutter EI zeigte sich ein sedimentartiger Bodensatz im Versuch mit verdünntem Wein (siehe Abbildung 38B). Der nächste Versuch wurde mit Traubensaft, eins zu eins mit Wasser verdünnt, durchgeführt. Hier konnte eine Biofilmbildung nach spätestens 6 Wochen bei allen Ansätzen, außer dem Fruchtfliegenansatz, beobachtet werden. Exemplarisch sind hierzu die durch die Kultivierung

gebildeten Biofilme des *Aceto balsamico*-Bodensatzes B in Abbildung 38C und der Essigmutter EI in Abbildung 38D abgebildet. Es wurden auch noch Versuche mit sterilfiltriertem „Neuem Wein“ (Federweißer) durchgeführt, die ebenfalls zu dem gleichen Ergebnis kamen.

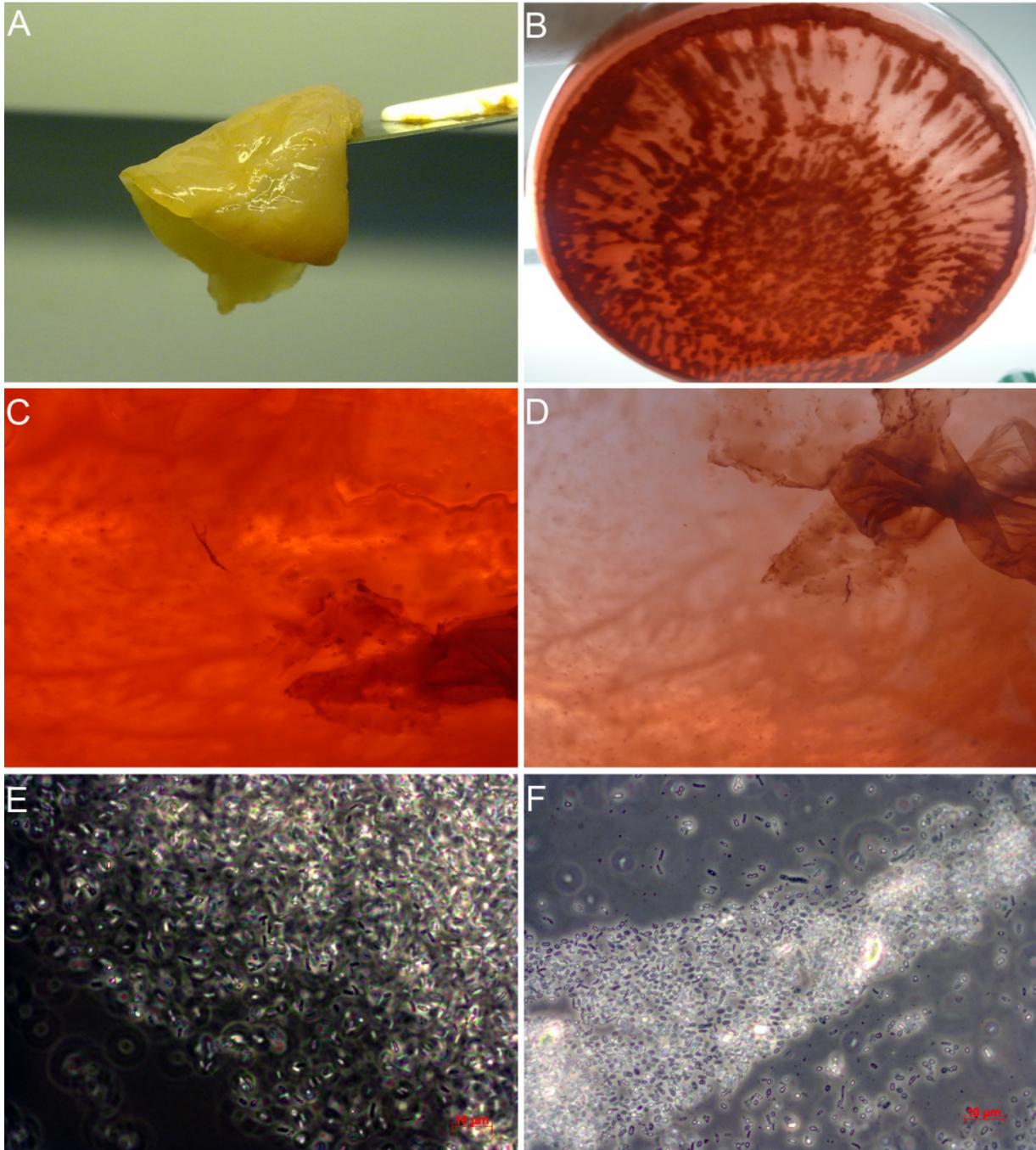


Abbildung 38: Essigmutter EII aus Weißwein vor der DNA Isolation (A), Essigmutter EI aus Rotwein kultiviert mit Rotwein 1:1 verdünnt mit sterilem Leitungswasser (B), Essigmutter B aus dem *Aceto balsamico*-Bodensatz kultiviert auf Traubensaft (C), Essigmutter EI kultiviert auf Traubensaft (D), Mikroskopische Untersuchung mit 1000-facher Vergrößerung und Phasenkontrast der Essigmutter B vor der Kultivierung (E), Mikroskopische Untersuchung mit 1000-facher Vergrößerung und Phasenkontrast der Essigmutter EI vor der Kultivierung (F).

Eine Essigmutter auf der Basis von EIII wurde in diesem Versuch auch in 50 % weißem Federweißen über 4 Monate kultiviert, da zwar hochmolekulare DNA aus der unkultivierten Probe isoliert werden konnte, die Menge allerdings zu gering für eine potentielle Metagenombank war (Probe 9oP). EI und B wurden vor der Kultivierung unter dem Mikroskop beobachtet (siehe Abbildung 38 E & F) und eine gewisse morphologische Vielfalt in den untersuchten Proben festgestellt. Allerdings war selbst nach diesen Kultivierungsmaßnahmen keine DNA-Isolation aus dem *Aceto balsamico*-Bodensatz B möglich, auch nicht mit diversen anderen DNA-Isolationsprotokollen oder diversen kommerziellen DNA-Isolationskits für Umweltproben.

3.4.2. Untersuchung der Diversität

Um zu überprüfen ob sich die isolierte DNA für eine Metagenombank eignet, wurde die Diversität von EI, EII und Probe 9oP (EIII) gemäß Material und Methoden Punkt 2.4.3 bestimmt und das Ergebnis zunächst mit dem Programm MEGAN4 (Huson *et al.* 2011) visualisiert.

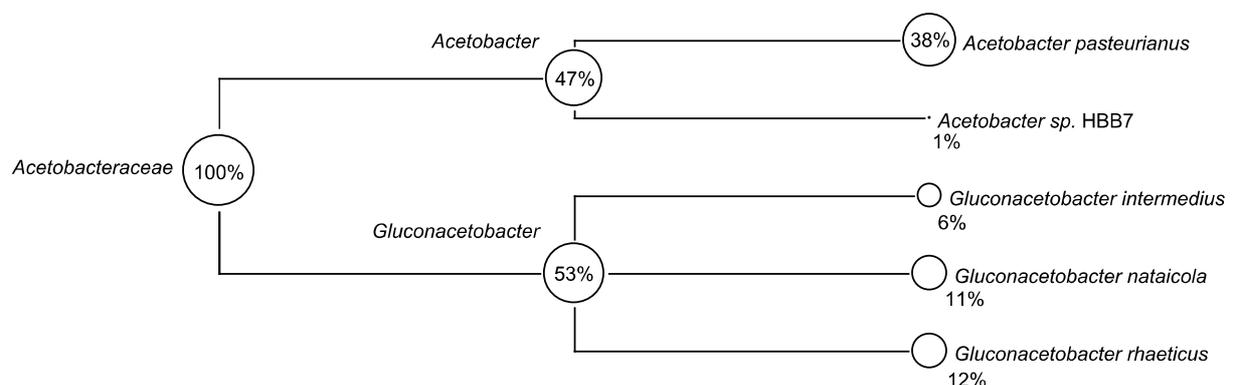


Abbildung 39: Diversität der amplifizierten 16S rDNA der Essigmutter EI ohne Kultivierung. 95 von 96 Klonen konnten in ausreichender Qualität sequenziert werden um die resultierenden Sequenz mit der nt-Datenbank zu vergleichen.

Wie in Abbildung 39 zu sehen, enthielten 100 % der 95 sequenzierten Klone der Essigmutter EI Amplicons mit 16S rDNA von Mitgliedern der *Acetobacteraceae*. 47 % enthielten 16S rDNA des Genus *Acetobacter*, 53 % des Genus *Gluconacetobacter*. 38 % der 16S rDNA wurde der Spezies *Acetobacter pasteurianus* und 1 % *Acetobacter sp. HBB7* zugeordnet. 6 %

waren eng verwandt zu *Gluconacetobacter intermedius*, 11 % zu *Gluconacetobacter nataicola* und 12 % zu *Gluconacetobacter rhaeticus*. Die restlichen 8 % *Acetobacter* und 24 % *Gluconacetobacter* konnten nicht bis auf Spezies-Level eingeordnet werden.

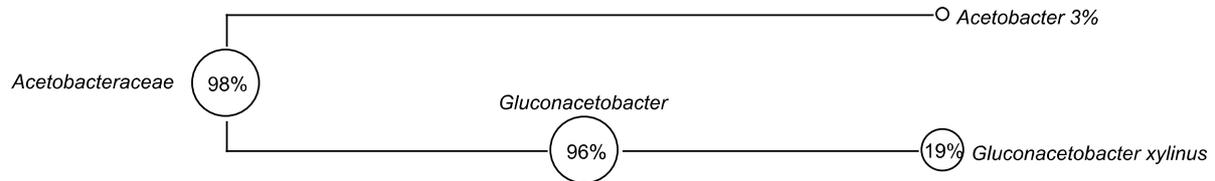


Abbildung 40: Diversität der amplifizierten 16S rDNA der Essigmutter EII ohne Kultivierung. 96 von 96 Klonen konnten in ausreichender Qualität sequenziert werden um die resultierenden Sequenz mit der nt-Datenbank zu vergleichen.

In Abbildung 40 ist zu sehen, dass die Diversität in der amplifizierten 16S rDNA der Essigmutter EII wesentlich geringer ist als in EI. In EII konnten 95 Klone Mitgliedern der *Acetobacteraceae* zugeordnet werden. 1 Klon lieferte keinen signifikanten BLASTn Treffer. Nur 3 % der Klone enthielten ein Plasmid mit 16S rDNA von einer nicht näher definierten *Acetobacter*-Spezies. 96 % enthielten 16S rDNA des Genus *Gluconacetobacter* und 19 % konnten der Spezies *Gluconacetobacter xylinus* zugeordnet werden.

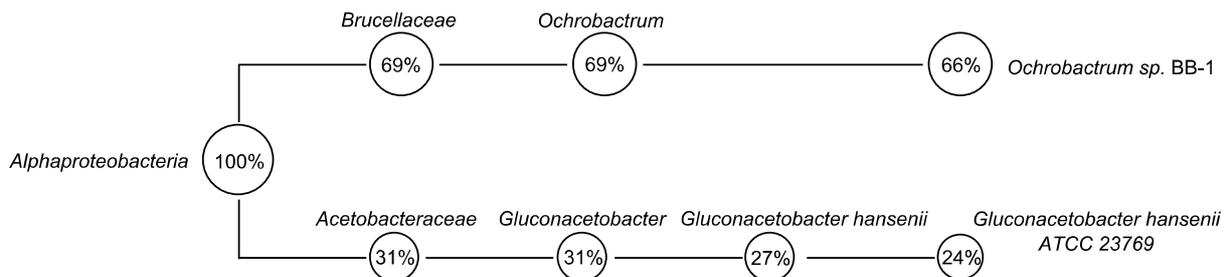


Abbildung 41: Diversität der amplifizierten 16S rDNA der Essigmutter EIII nach 4 Monaten Kultivierung in 50 % „Neuem Wein“ (Probe 9oP). 93 von 96 Klonen konnten in ausreichender Qualität sequenziert werden um die resultierenden Sequenz mit der nt-Datenbank zu vergleichen.

In Abbildung 41 ist zu sehen, dass in der für 4 Monate in „Neuem Wein“ kultivierten Essigmutter EIII (Probe 9oP) erstmals Bakterien zu erwarten sind, die nicht den *Acetobacteraceae*, sondern den *Brucellaceae* angehören. 69 % der in den 93 Klonen enthaltenen 16S rDNA wurde dem Genus *Ochrobactrum* zugeordnet, wobei 66 % der Spezies *Ochrobactrum sp. BB-1* zugeordnet werden konnten. Die restlichen 31 % der Klone gehörten

zum Genus *Gluconacetobacter*. 27 % konnten der Spezies *Gluconacetobacter hansenii* und 24 % dem Stamm *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 zugeordnet werden.

Nachdem bekannt war, dass in Essigmutter EI die höchste Diversität zu erwarten war, wurde ein phylogenetischer Baum aller 16S rDNA-Sequenzen im Vergleich zu den bekannten 16S rRNA-Sequenzen der wichtigsten *Acetobacteraceae*-Typstämmen aus dem SILVA Projekt (Pruesse *et al.* 2007) mit Hilfe des Programms ARB (Ludwig *et al.* 2004) erstellt.

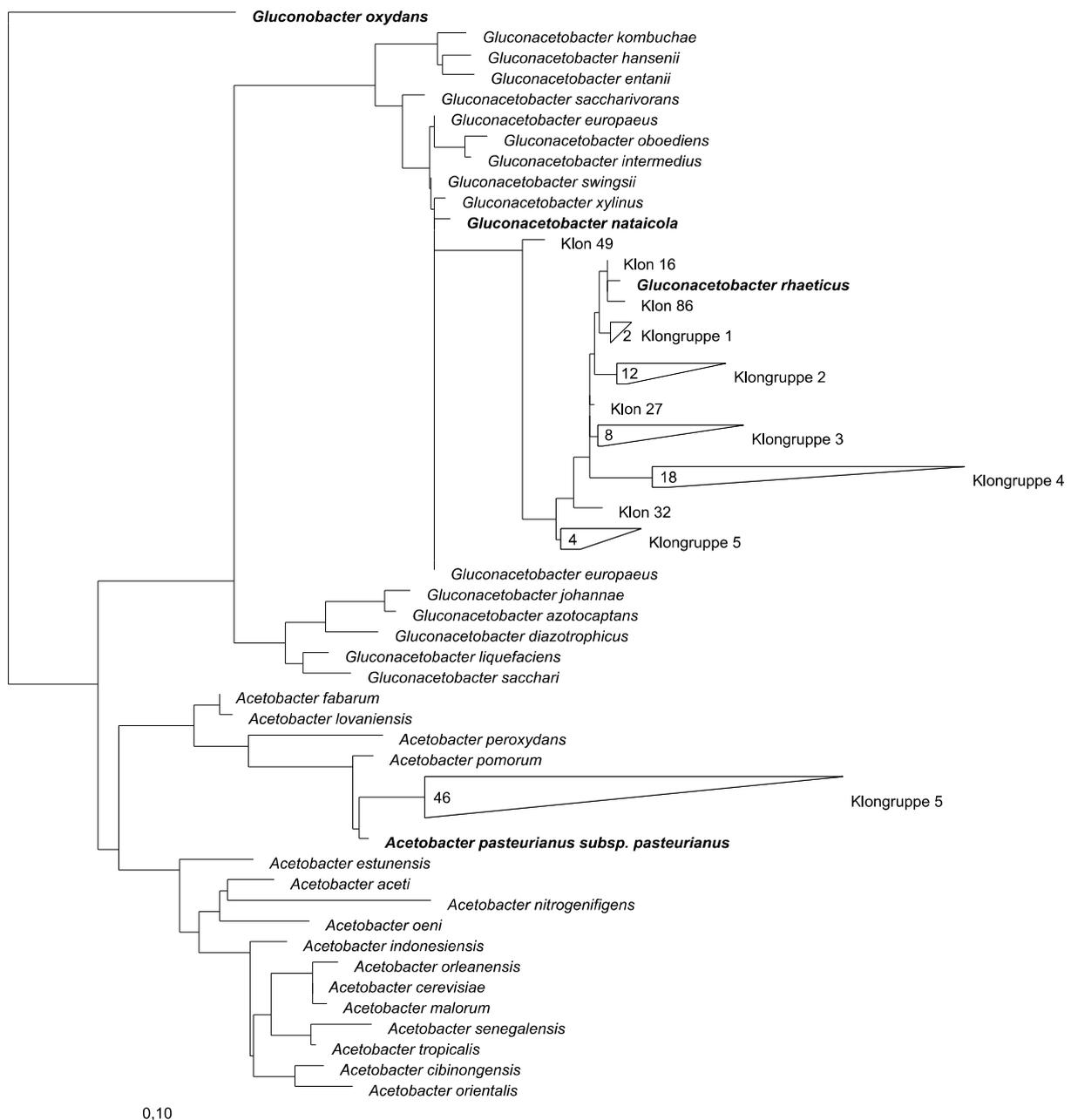


Abbildung 42: Phylogenetischer Baum (Maximum-Likelihood-Methode) der 16S rDNA Sequenzen der Essigmutter EI und relevanter Spezies der *Acetobacteraceae*.

Wie in Abbildung 42 ersichtlich, trägt, wie auch schon in der MEGAN4 Visualisierung (Abbildung 39) gezeigt, die eine Hälfte der Klone die 16S rDNA von Spezies des Genus *Acetobacter* und die andere die des Genus *Gluconacetobacter*. Die längste Seite der Klongruppen-Dreiecke repräsentiert den am weitesten entfernten verwandten Klon innerhalb der Gruppe. Daran kann man erkennen, dass die Diversität in den Gruppen sehr hoch zu sein scheint, da die Länge der Dreiecke zum Teil größer ist, als die Länge der Zweige zwischen bekannten Spezies. Bei den *Gluconacetobacter* Gruppen ist eine Gruppe sehr nahe zu *Gluconacetobacter rhaeticus* verwandt, die andere könnte auch bei *Gluconacetobacter nataicola* einordnet werden, wie dies auch bei der MEGAN Auswertung geschehen ist. Eine Gruppe, die nah verwandt zu *Gluconacetobacter intermedius* ist, konnte mit dieser Methode allerdings nicht bestätigt werden. Die Diversität der beiden anderen Essigmütter EII und EIII wurde ebenfalls durch Berechnung eines phylogenetischen Baums untersucht (nicht gezeigt). Sie waren aber noch geringer als die von EI. Auch zeigten sich kaum Diversitäten innerhalb der Gruppen, so dass die zuvor dargestellten Abbildungen für EII und EIII (Probe 9oP) die Ergebnislage ausreichend wiedergeben. Aus diesem Grund wurde im Folgenden nur mit der metagenomischen DNA der Essigmutter EI weiter gearbeitet.

3.4.3. Etablierung einer *in silico* Screeningmethode für membranständige Dehydrogenasen

Als nächstes wurde eine Metagenombank gemäß Material und Methoden Punkt 2.4.4 aus EI erstellt und die Fragmente von 570 Klonen sequenziert. Aus der Sequenz wurden potentielle *open reading frames* (ORF) mit Hilfe des Programms Artemis (Rutherford *et al.* 2000) ermittelt. Dazu wurden alle Bereiche der aus der Sequenzierung resultierten zusammengehörigen Sequenzen (*contigs*), die für mehr als 100 Aminosäuren codieren und nicht durch Stopcodons (TAG, TAA, TGA) getrennt sind, in allen drei Leserahmen ermittelt. Die gefundenen ORFs wurden nun am Leseanfang bis zum ersten Startcodon (ATG, GTG,

TTG, ATT, CTG) verkürzt, wobei alternative Startcodons meistens nach einer Begutachtung auf das nächste ATG reduziert wurden.

Tabelle 10: PSORTb und Pfam-Ergebnisse membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H (CM = cytoplasmatische Membra, C = Cytoplasma, P = Periplasma, U = Unbekannt)

ID	Beschreibung	PSORTb	PFAM Ergebnis
GOX0265	membranständige Glucose-Dehydrogenase	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ, PQQ
GOX0516	membranständige PQQ abhängige Dehydrogenase 4	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ_C, PQQ
GOX0585		CM	Cytochrom_C
GOX0586	membranständige Aldehyd-Dehydrogenase	C	Fer2, Fer2_2
GOX0587		CM	Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2
GOX0854	membranständige Polyol-Dehydrogenase	P	PQQ_N, PQQ_C, PQQ, PQQ
GOX0855		CM	-
GOX1067	membranständige Alkohol-Dehydrogenase	CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C
GOX1068		P	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ,
GOX1230		CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C
GOX1231	membranständige Gluconat-Dehydrogenase	U	FAD_binding_3, GMC_oxred_N, GMC_oxred_C
GOX1232		U	-
GOX1253	membranständige D-Lactat-Dehydrogenase	CM	FAD_binding_4, Lact-deh-memb
GOX1441	membranständige PQQ abhängige Dehydrogenase 3	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ,
GOX1857	membranständige Inositol-Dehydrogenase	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ
GOX2094		CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C
GOX2095	membranständige Sorbitol-Dehydrogenase	U	GMC_oxred_C
GOX2096		U	DAO
GOX2097		P	FAD-SLDH

Die gefundenen ORFs wurden durchnummeriert und die translatierte Proteinsequenz in einer Multi-FASTA-Datei gespeichert. Von jedem ORF wurde anschließend eine Vorhersage der intrazellulären Lokalisation mit dem Programm PSORTb (siehe Material und Methoden 2.5.3) durchgeführt. Auch wurden alle ORFs mit den in der Pfam-A Datenbank abgelegten Familien verglichen und so Domänen oder signifikante *Repeats* identifiziert (siehe Material und Methoden 2.5.2). Der dritte Schritt war ein Vergleich aller ORFs mit den Proteinsequenzen aus der nr-Datenbank von NCBI mittels BLASTp (siehe Material und

Methoden 2.5.1). Die Ergebnisse wurden in drei verschiedenen Dateien abgespeichert und mit einem eigens dafür entwickelten *Parsing-Tool* in eine MySQL-Datenbank eingelesen. Der Programmcode für das *Parsing-Tool* und die Datenbankstruktur befinden sich im Anhang (MetagenomeDB.sql, functions.php, upload.php). Die gleichen Prozeduren wurden mit den bekannten membranständigen Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H unter Vorlage der Genomsequenz von Prust *et al.* (2005) durchgeführt. Wie in Tabelle 10 gezeigt, befinden sich die meisten Gene der membranständigen Dehydrogenasen von *G. oxydans* 621H in der cytoplasmatischen Membran oder im Periplasma. Ein Vergleich der Familien von Pfam ergab, dass viele Dehydrogenasen in *G. oxydans* Pyrrolochinolinchinon-Bindemotive (PQQ), Domänen aus der Cytochrom *c* Familie (Cytochrom_C), oder andere signifikante Motive besitzen. Mit einem Datenbank-Auslese-*Tool* (Programmcode siehe Anhang: functions.php, index.php, search.php, details.php, compare.php, download.php) wurde die Datenbank nun nach metagenomischen ORFs durchsucht, die sowohl eine Lokalisationsvorhersage für die cytoplasmatische Membran oder dem Periplasma aufwiesen, als auch mindestens ein Motiv besaßen, dass in membranständigen Dehydrogenasen von *G. oxydans* vorkommt.

Tabelle 11: Auflistung aller metagenomischen ORFs für putative membranständige Dehydrogenasen, die mittels *in silico*-Analyse des Essigmuttermetagenoms EI gefunden wurden. ORFs eines putativen Operons sind mit Klammern markiert. * ORFs, für die ein Expressionsvektor konstruiert wurde. Bei erfolgreich exprimierten Dehydrogenasen mit mindestens einer positiven Oxidationsaktivität ist eine Abkürzung in Klammern unter der ORF-ID angegeben (CM = cytoplasmatische Membran, C = Cytoplasma, P = Periplasma, U = Unbekannt).

ID	PSORTb	Pfam	Beschreibung	%
ORF01979c*	P	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ_C	Alkohol-Dehydrogenase große Untereinheit [<i>Acetobacte pasteurianus</i> NBRC 101655]	99,44
ORF01982c*	CM	Aldedh	Aldehyd-Dehydrogenase [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	99,19
ORF03128c	O	PQQ, PQQ	Dehydrogenase [<i>Acetobacter pomorum</i> DM001]	98,1
ORF08606c* (mPQQ4)	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ	Glucose-Dehydrogenase, Methanol-Dehydrogenase Untereinheit 1 [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	100

ID	PSORTb	Pfam	Beschreibung	%	
ORF09466c	CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C	Alkohol-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01]	98,39	┘
ORF09471c	CM	Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2	Alkohol-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01]	98,39	┘
ORF11493*	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ	Glucose-Dehydrogenase, Methanol-Dehydrogenase Untereinheit 1 [<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01]	98,89	
ORF11862c	P	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ	Alkohol-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	99,04	
ORF18630c* (mmDLDH)	CM	FAD_binding_4, Lact-deh-memb	D-Lactat-Dehydrogenase NAD abhängig [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	99,82	
ORF18747c	CM	Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2	Membranständige Aldehyd-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	100	┘
ORF18756c	C	Fer2, Fer2_2	Isoquinolin-1-Oxidoreductase Untereinheit alpha [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	100	
ORF18758c	CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C	Gluconat-2-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	99,54	┘
ORF23011c*	C	Fer2, Fer2_2, FAD_binding_5, CO_deh_flav_C	Xanthin-Dehydrogenase XdhA [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	96,98	┘
ORF23012c*	CM	Ald_Xan_dh_C, Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2	Xanthin-Dehydrogenase XdhB [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	98,03	┘
ORF23506c* (mmADH)	U	Cytochrom_C, Cytochrom_C	Alkohol-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Gluconacetobacter europaeus</i> LMG 18494]	97,46	┘
ORF23512c* (mmADH)	P	PQQ_N, PQQ, PQQ, PQQ, PQQ_C, PQQ, Cytochrom_C	Alkohol-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	97,03	┘
ORF23808c* (mmAcDH)	CM	Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2	Aldehyd-Dehydrogenase große Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	99,87	┘
ORF23814c* (mmAcDH)	C	Fer2, Fer2_2	Aldehyd-Dehydrogenase kleine Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01]	100	
ORF23816c* (mmAcDH)	CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C	Gluconate-2-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Acetobacter pomorum</i> DM001]	99,34	┘
ORF24554	CM	PQQ_N, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ, PQQ	Quinoprotein Glucose-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	99,62	

ID	PSORTb	Pfam	Beschreibung	%
ORF25756*	C	Aldedh	Aldehyd/L-Sorbose-Dehydrogenase [<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01]	99,4
ORF25760*	CM	GMC_oxred_N, GMC_oxred_C	L-Sorbose-Dehydrogenase [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	99,62
ORFB04323c* (mmGDH)	P	PQQ_N, PQQ, PQQ_C, PQQ, PQQ, PQQ	Glucose-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter europaeus</i> LMG 18494]	95,6
ORFB08389c*	CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C	Sorbitol-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Gluconacetobacter xylinus</i> NBRC 3288]	83,26
ORFB08393c*	C	DAO, GMC_oxred_C	Sorbitol-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter xylinus</i> NBRC 3288]	96,15
ORFB09566c* (msldAB)	P	PQQ_N, PQQ_C, PQQ	Glycerin-Dehydrogenase große Untereinheit [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	99,59
ORFB09576c* (msldAB)	CM	-	Glycerin-Dehydrogenase kleine Untereinheit [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	99,14
ORFB12596*	CM	Cytochrom_C, Cytochrom_C	Gluconat-2-Dehydrogenase Cytochrom C Untereinheit [<i>Acetobacter pomorum</i> DM001]	98,25
ORFB12603*	C	Fer2, Fer2_2	Aldehyd-Dehydrogenase kleine Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01]	100
ORFB12605*	CM	Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2	Aldehyd-Dehydrogenase große Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> NBRC 101655]	99,87
ORFB17453c	CM	FAD_binding_4, Lact-deh-memb	D-Lactat-Dehydrogenase [<i>Gluconacetobacter sp.</i> SXCC-1]	99,49
ORFB18357c	CM	Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2, Ald_Xan_dh_C2, Cytochrom_C, Cytochrom_C, Cytochrom_C	Aldehyd-Dehydrogenase Cytochrom c Untereinheit [<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>subsp. pasteurianus</i> LMG 1262 = NBRC 106471]	99,33
ORFB18361c	C	Fer2, Fer2_2	Oxidoreductase [<i>Acetobacter pasteurianus subsp.</i> <i>pasteurianus</i> LMG 1262 = NBRC 106471]	100

Über die Darstellung der *contigs* in Artemis wurde überprüft, ob die ORFs vollständig waren und nicht durch plötzliches Enden der *contigs* abgeschnitten wurden. Auch wurden ORFs, die in einem Operon mit den gefundenen ORFs liegen könnten, auch wenn sie nicht ins Suchschema passten, als potentielle Untereinheiten mit in die Auswahl aufgenommen.

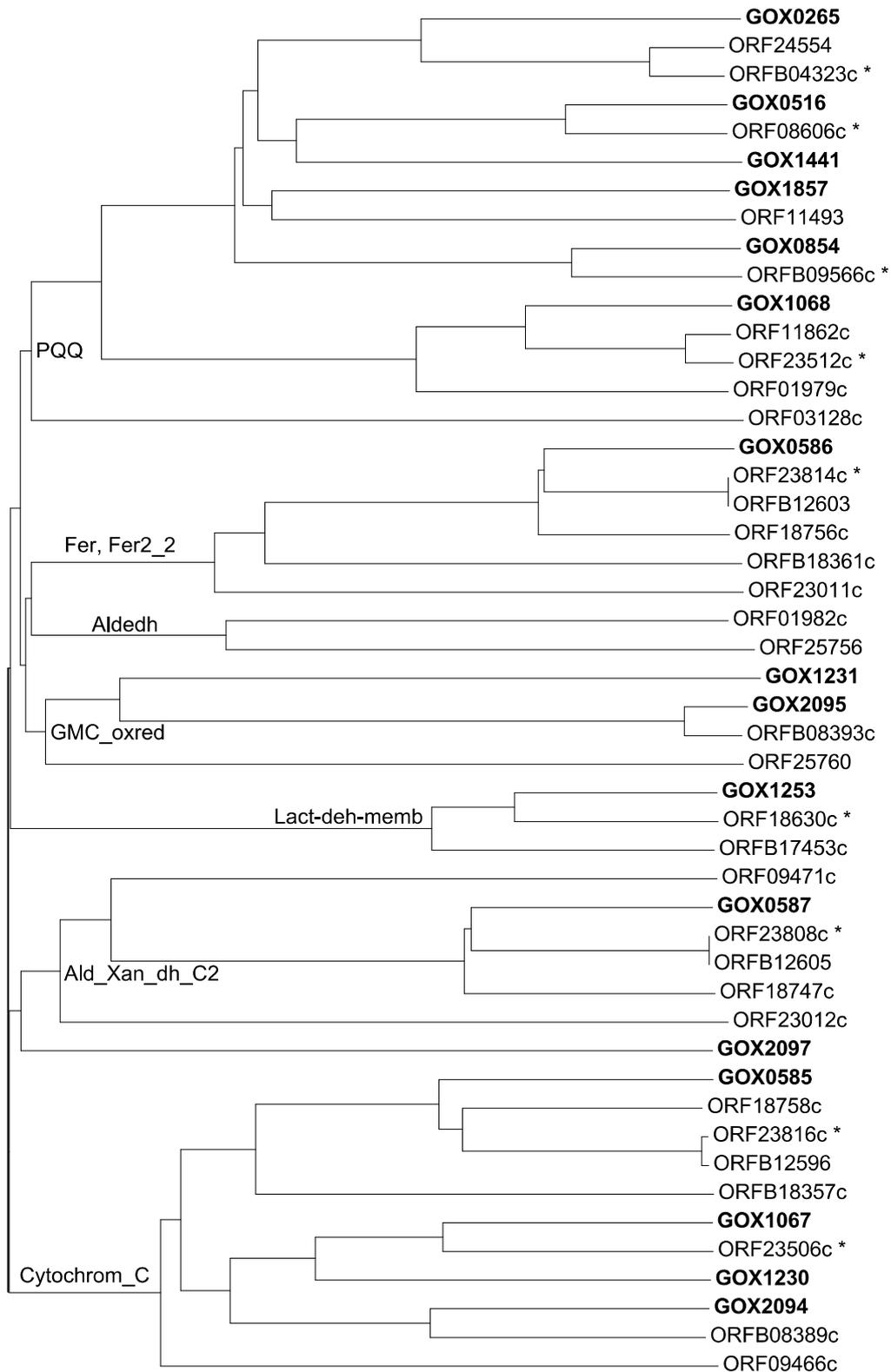


Abbildung 43: Kladogramm eines *Multialignments* aller ermittelten metagenomischen Dehydrogenasen und der Dehydrogenasen von *G. oxydans* 621H (fett gedruckt). GOX0855, GOX1232 und ORFB09576c konnten auf Grund ihrer geringen Größe nicht berücksichtigt werden. Die Namen der Pfam-Familien stehen an der höchsten gemeinsamen Verzweigung. *ORF wurde erfolgreich exprimiert.

Anschließend wurde über die abgespeicherten BLAST-Ergebnisse eine Funktionsvorhersage getroffen und ORFs, die eindeutig keine membranständigen Dehydrogenasen waren, aus der Auswahl entfernt, wie z.B. Quinoloxidasen. Am Ende konnten die in Tabelle 11 aufgelisteten 33 ORFs als Untereinheiten für 19 verschiedene putative metagenomische, membranständige Dehydrogenasen identifiziert werden. Die metagenomischen Dehydrogenasen wurden am Ende anhand des in Abbildung 43 abgebildeten Kladogramms in Gruppen mit ihren nächsten Verwandten in *G. oxydans* 621H eingeordnet.

3.5. Expression metagenomischer Dehydrogenasen in *G. oxydans*

3.5.1. Erstellung der Expressionsplasmide

Von diesen putativen Dehydrogenasen wurden die Gene von 12 Enzymen (= 22 ORFs) gemäß Material und Methoden Punkt 2.4.5 in Expressionsvektoren gebracht (Forschungsarbeit Markus Mientus) und diese dann in *G. oxydans* BP.9 bzw. BP.10 für eine Expression konjugiert (siehe Tabelle 11). Die dafür verwendeten Primer, aus denen sich auch der jeweils amplifizierte Bereich ableiten lässt, befinden sich in Tabelle 15 im Anhang.

3.5.2. Substratscreening mit Ganzzell-DCPIP-Assays

Anschließend wurden alle Expressionsstämme in Ganzzell-DCPIP-Assays auf neuartige Oxidationsaktivitäten untersucht. Von den 12 getesteten Stämmen zeigten die in Tabelle 11 mit Abkürzungen versehenen sechs Stämme Oxidationsaktivitäten in Anwesenheit von mindestens einem getesteten Substrat. Es wurden alle Substrate getestet, die auch zur Charakterisierung der Dehydrogenasen in *G. oxydans* (3.2.2.2) verwendet wurden. Allerdings wurden aus Kostengründen dieses Mal keine Tests mit D-Threose, D-Allose, D-Altrose und *allo*-Inositol durchgeführt. Auch wurden keine Tests mit ungeeigneten Substraten wie den spontanen DCPIP-Reduzierern durchgeführt. Da selbst der Stamm *G. oxydans* BP.10 2-Hydroxybuttersäure und L-Lactat noch oxidieren konnte, konnten bei diesen Substraten

keine Aussage über das Oxidationspotential der metagenomischen Dehydrogenasen getätigt werden. L-Lactat diente deswegen als Positivkontrolle.

3.5.2.1. Oxidationsaktivität von mmGDH

ORFB04323c codiert für eine metagenomische Dehydrogenase, die Ähnlichkeiten mit der membranständigen Glucose-Dehydrogenase (GOX0265) von *G. oxydans* 621H aufweist und deswegen im Folgenden metagenomische membranständige Glucose-Dehydrogenase (mmGDH) genannt wird.

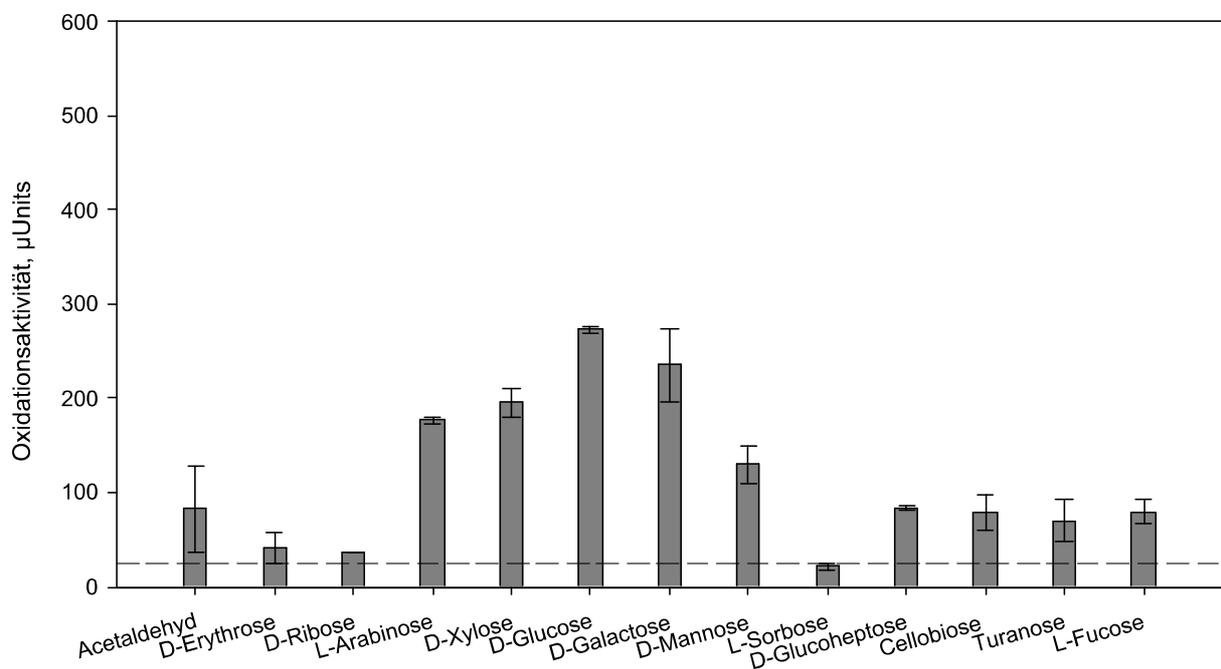


Abbildung 44: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* mmGDH in Anwesenheit von für die mmGDH positiv getesteten Substraten. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Wie in Abbildung 44 zu sehen, wurde in Anwesenheit von 13 Substraten eine Oxidationsaktivität für den Expressionsstamm *G. oxydans* mmGDH festgestellt. Der Stamm oxidierte L-Arabinose, D-Xylose, D-Glucose, D-Galactose und D-Mannose stärker als Acetaldehyd, D-Erythrose, D-Ribose, D-Glucoheptose, Cellobiose, Turanose und L-Fucose. Eine geringe Aktivität konnte auch für L-Sorbose festgestellt werden, die allerdings unter dem Schwellenwert von 25 µUnits lag.

3.5.2.2. Oxidationsaktivität von mPQQ4

ORF08606c codiert für eine metagenomische Dehydrogenase, die ähnlich der PQQ abhängigen Dehydrogenase 4 (GOX0516) aufgebaut ist und deswegen im Folgenden metagenomische PQQ abhängige Dehydrogenase 4 (mPQQ4) genannt wird.

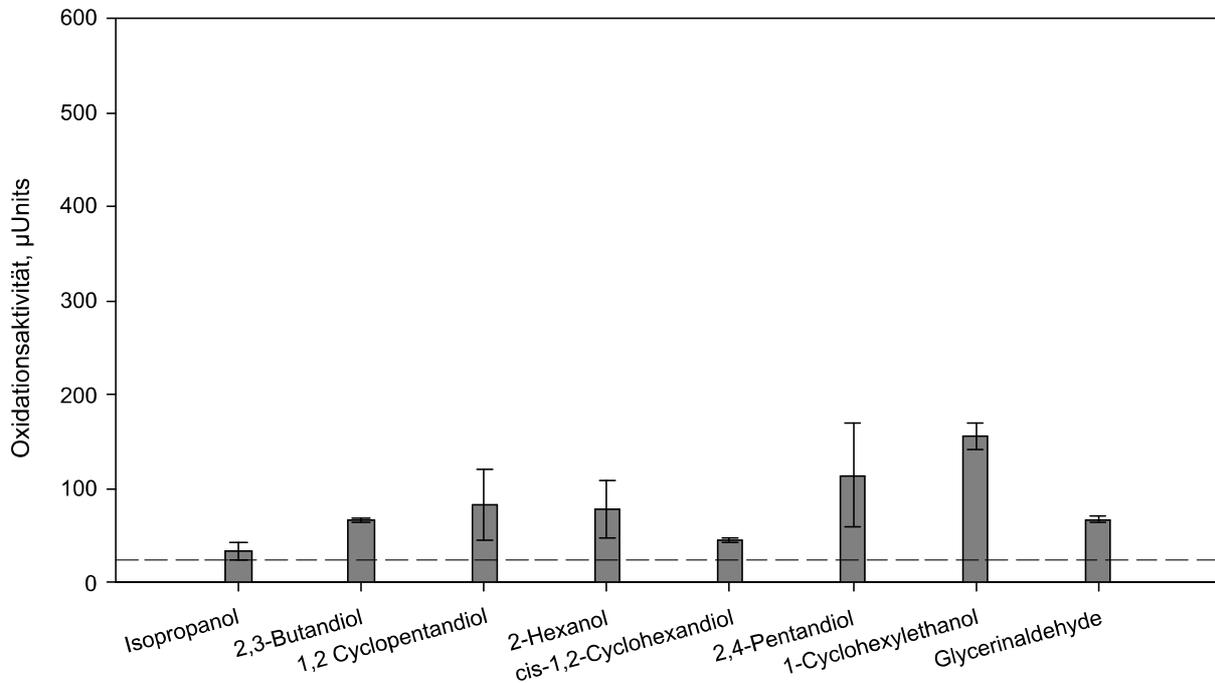


Abbildung 45: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* mPQQ4 in Anwesenheit von für die mPQQ4 positiv getesteten Substraten. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Wie in Abbildung 45 erkennbar, wurde in Anwesenheit von acht Substraten eine Oxidationsaktivität für den Expressionsstamm *G. oxydans* mPQQ4 festgestellt. Der Stamm oxidierte Isopropanol, 2,3-Butandiol, 2-Hexanol, 1,2-Cyclopentandiol, *cis*-1,2-Cyclohexandiol, 2,4-Pentandiol und Glycerinaldehyd. Die höchste Oxidationsaktivität wurde in Anwesenheit von 1-Cyclohexylethanol gemessen.

3.5.2.3. Oxidationsaktivität von msldAB

ORFB09566c und ORFB09576c liegen nebeneinander und codieren für eine metagenomische Dehydrogenase, die der Polyol-Dehydrogenase (GOX0854, GOX0855 oder *sldAB*) ähnelt und deswegen im Folgenden metagenomische Polyol-Dehydrogenase (msldAB) genannt wird. In Anwesenheit von drei Substraten wurde eine Oxidationsaktivität beim Expressionsstamm

G. oxydans mslAB festgestellt (Abbildung 46). Der Stamm oxidiert 1,2-Cyclopentandiol, *cis*-1,2-Cyclohexandiol und D-Arabitol, allerdings mit sehr geringer Aktivität.

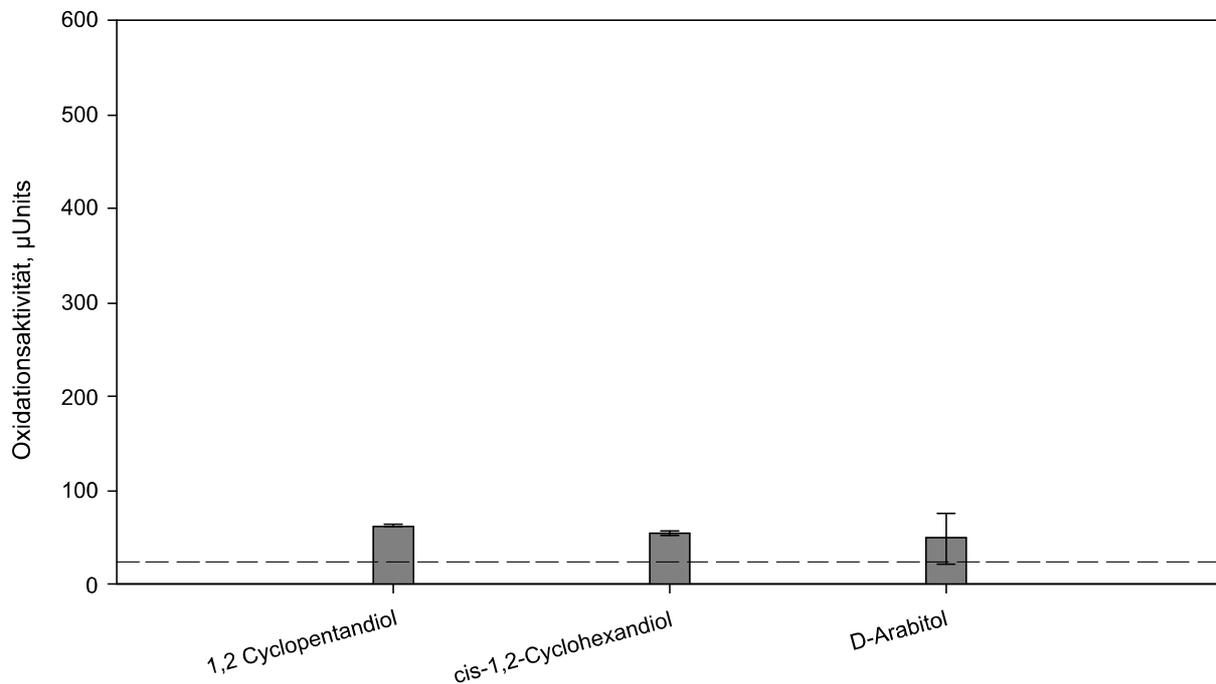


Abbildung 46: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* mslAB in Anwesenheit von für die mslAB positiv getesteten Substraten. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 µUnits ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

3.5.2.4. Oxidationsaktivität von mmADH

ORF23506c und ORF23512c liegen ebenfalls nebeneinander und codieren für eine metagenomische Dehydrogenase, die ähnlich der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067, GOX1068) aufgebaut ist und deswegen im Folgenden metagenomische membranständige Alkohol-Dehydrogenase (mmADH) genannt wird. Wie in Abbildung 47 und Abbildung 48 zu sehen, wurde in Anwesenheit von 30 Substraten eine Oxidationsaktivität für den Expressionsstamm *G. oxydans* mmADH festgestellt. Der Stamm zeigt eine starke Oxidation von 2-Cyclohexylethanol. Etwas geringer war die Aktivität bei Isopropanol, 1,2-Pentandiol, 1,2-Hexandiol, 1-Hexanol, 3-Hexanol, 1,3-Propandiol, 1,4-Butandiol, Formaldehyd, Acetaldehyd, Valeraldehyd, Cellobiose und L-Fucose.

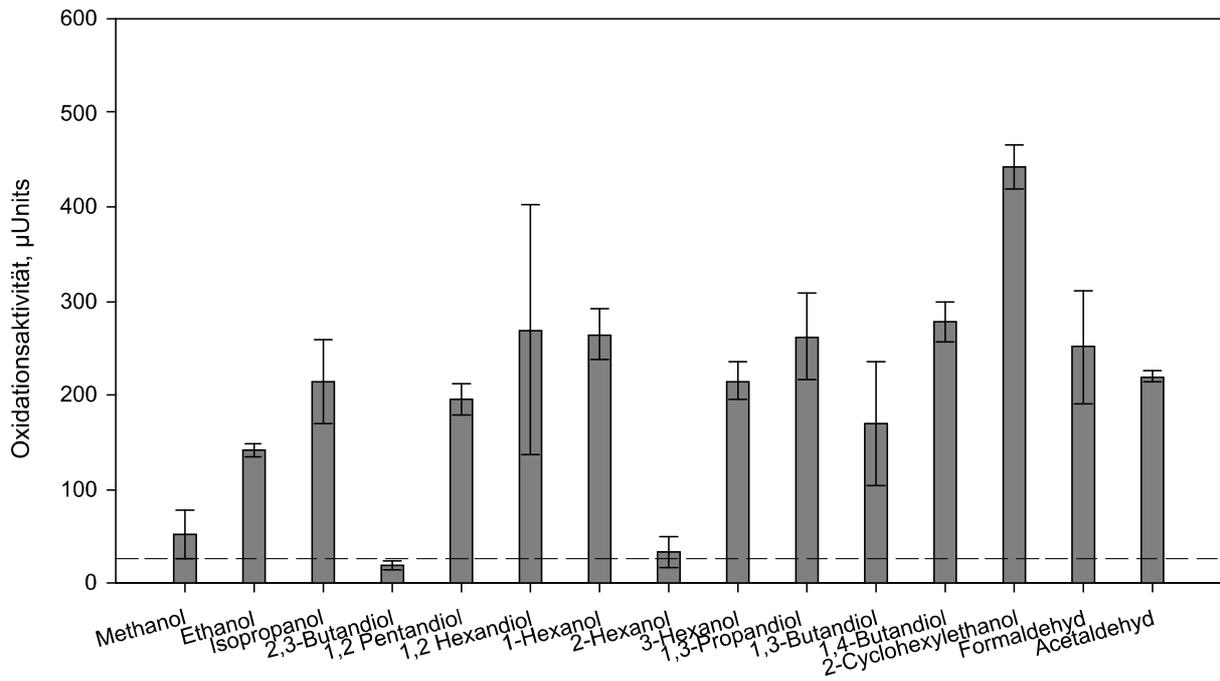


Abbildung 47: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* mmADH in Anwesenheit von für die mmADH positiv getesteten Substraten (Teil 1/2). Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 μ Units ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

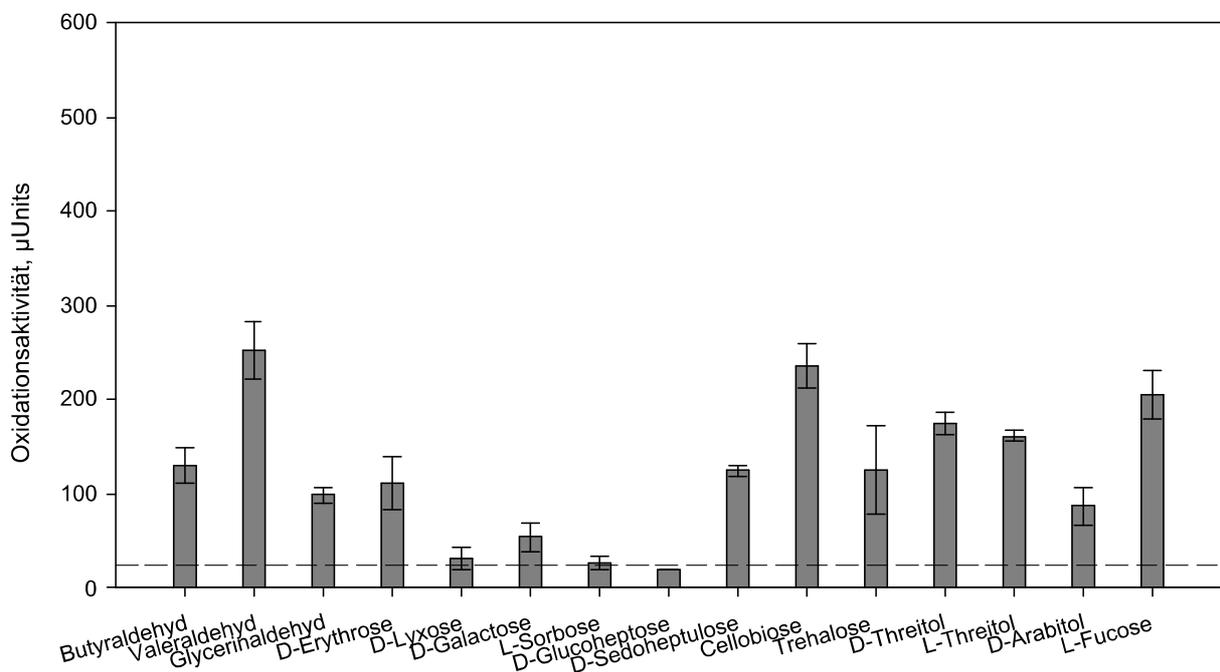


Abbildung 48: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* mmADH in Anwesenheit von für die mmADH positiv getesteten Substraten (Teil 2/2). Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 μ Units ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Noch geringer war die Aktivität bei Ethanol, 1,3-Butandiol, Butyraldehyd, Glycerinaldehyd, D-Erythrose, D-Sedoheptulose, Trehalose, D-Threitol, L-Threitol und D-Arabitol. Kaum

Aktivität wurde bei Methanol, 2-Hexanol, D-Lyxose und D-Galactose verzeichnet. Die Aktivitäten für 2,3-Butandiol, L-Sorbose und D-Glucoheptose lagen unter dem Schwellenwert von 25 μ Units.

3.5.2.5. Oxidationsaktivität von mmAcDH

ORF23808c, ORF23814c und ORF23816c liegen nebeneinander und codieren für eine metagenomische Dehydrogenase, die der membranständigen Aldehyd-Dehydrogenase (GOX0585, GOX0586 GOX0587) ähnlich ist und deswegen im Folgenden metagenomische membranständige Aldehyd-Dehydrogenase (mmAcDH) genannt wird.

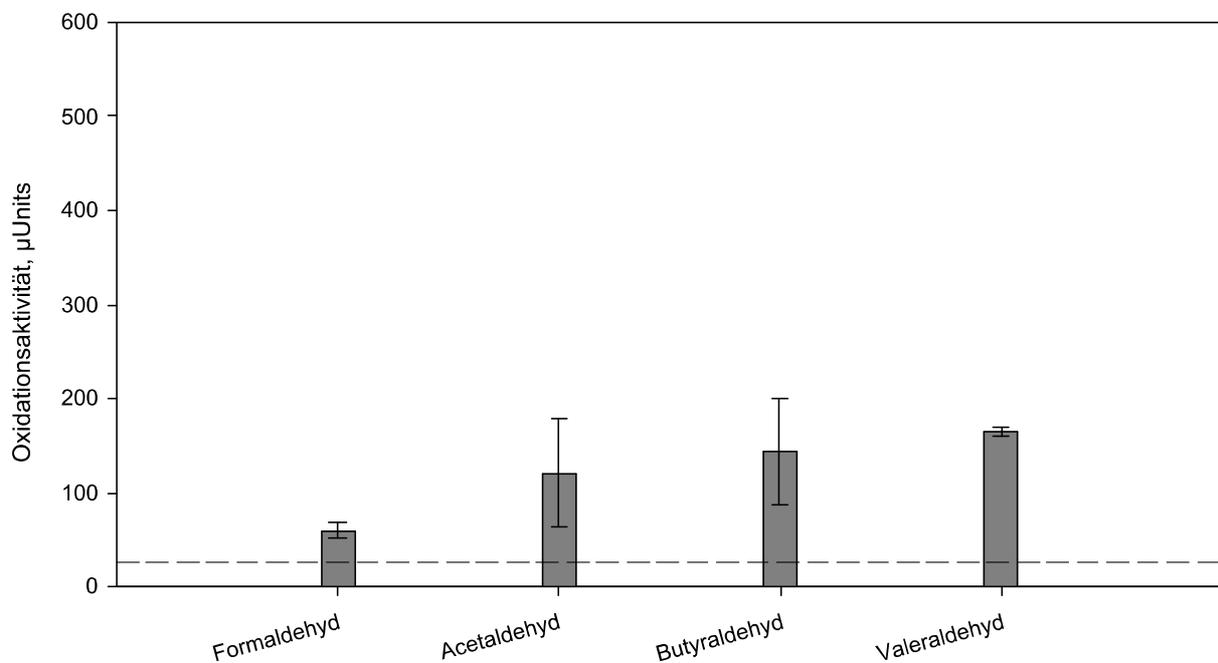


Abbildung 49: Oxidationsaktivität von *G. oxydans* mmAcDH in Anwesenheit von für die mmAcDH positiv getesteten Substraten. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 25 μ Units ab dem Substrate als positive Substrate eingestuft wurden.

Wie in Abbildung 49 zu sehen, wurde in Anwesenheit von vier Substraten eine Oxidationsaktivität für den Expressionsstamm *G. oxydans* mmAcDH festgestellt. Der Stamm oxidiert Acetaldehyd, Butyraldehyd und Valeraldehyd und zeigt eine geringere Aktivität für Formaldehyd.

3.5.2.6. Oxidationsaktivität von mmDLDH

ORF18630c codiert für eine metagenomische Dehydrogenase, die ähnlich der membranständigen D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253) aufgebaut ist und deswegen im Folgenden metagenomische membranständige D-Lactat-Dehydrogenase (mmDLDH) genannt wird. Da davon ausgegangen wurde, dass mmDLDH D-Lactat umsetzen kann, wurde diese Dehydrogenase als einzige in *G. oxydans* BP.10 exprimiert, da BP.9 noch die eigene D-Lactat-Dehydrogenase enthielt. Wie erwartet, setzte mmDLDH D-Lactat mit einer Aktivität von $145,5 \pm 34,9 \mu\text{Units}$ um. Allerdings wurden keine weiteren positiven Substrate gefunden.

3.6. Untersuchung des Acetatstoffwechsels in *G. oxydans*

Die Untersuchung des Acetatstoffwechsels in *G. oxydans* 621H wurde im Rahmen von zwei studentischen Forschungsprojekten durchgeführt. Wie bereits in Einleitung 1.1.2 erwähnt, konnte angenommen werden, dass die Pyruvat-Decarboxylase (GOX1081), die cytoplasmatischen Acetaldehyd-Dehydrogenasen (wie GOX1122 oder GOX2018) und die Acetyl-CoA-Synthetase (GOX0413) eine wichtige Rolle in der Acetatproduktion in *G. oxydans* spielen. Eine Deletion dieser und eine anschließende Untersuchung der Wachstumsphysiologie der daraus resultierenden Deletionsmutanten sollte dies beweisen.

3.6.1. Erstellung der Deletionsmutanten

3.6.1.1. Deletion der Pyruvat-Decarboxylase

Zunächst wurde die Pyruvat-Decarboxylase in *G. oxydans* Δ_{upp} vom Start- bis zum Stopcodon inklusive weiterer drei Basen *downstream* von GOX1081 von David Kostner und Katharina Brauer im Rahmen eines studentischen Forschungspraktikums von Katharina Brauer komplett deletiert. Die Deletionsstrategie für die daraus resultierende Deletionsmutante *G. oxydans* $\Delta_{upp} \Delta\text{GOX1081}$ wurde bereits im Material und Methodenteil

2.2.8 in Abbildung 3 näher gezeigt. Die Deletion wurde per PCR, Southern Blot und Sequenzierung überprüft.

3.6.1.2. Deletion der cytoplasmatischen Acetaldehyd-Dehydrogenasen GOX1122 und GOX2018

Für weitere Untersuchungen wurden zwei cytoplasmatische Acetaldehyd-Dehydrogenasen GOX1122 und GOX2018 deletiert. In Abbildung 50 ist zu sehen, dass auf Grund der Leserichtungen der benachbarten Gene keine Rücksicht auf diese genommen werden muss und GOX1122 vom Start- bis zum Stopcodon restlos aus dem Genom entfernt werden konnte. Daraus resultierte die Mutante *G. oxydans* Δ upp Δ GOX1122. Die Deletion wurde per PCR und Sequenzierung überprüft.

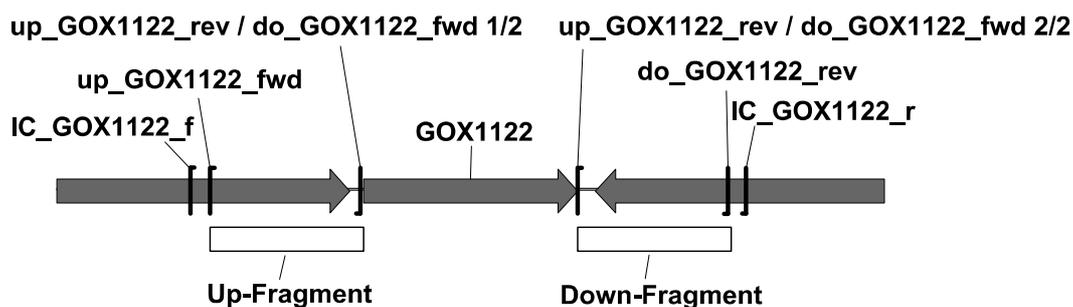


Abbildung 50: Strategie zur Deletion der cytoplasmatischen Acetaldehyd-Dehydrogenase GOX1122. Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX1122_fwd und up_GOX1122_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX1122_fwd und do_GOX1122_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX1122_fwd und do_GOX1122_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX1122_fwd wurde eine *Xba*I-Schnittstelle, mit do_GOX1122_rev eine *Eco*RI-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX1122 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX1122_f und do_GOX1122_rev, sowie up_GOX1122_fwd und IC_GOX1122_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX1122_f und IC_GOX1122_r.

Für die Deletion von GOX2018 mussten, wie in Abbildung 51 zu sehen, die benachbarten Gene, die für ein hypothetisches Protein und eine putative Esterase codieren, berücksichtigt werden, da ihre putativen Promotorregionen innerhalb von GOX2018 liegen könnten. Trotzdem wurde die Deletion zunächst komplett vom Start- bis zum Stopcodon versucht und auf Grund des unveränderten Wachstumsverhaltens der Mutante keine neue Deletionsstrategie ausprobiert. Die daraus resultierende Mutante wurde *G. oxydans* Δ upp Δ GOX2018 genannt. Die Deletion wurde per PCR und Sequenzierung überprüft.

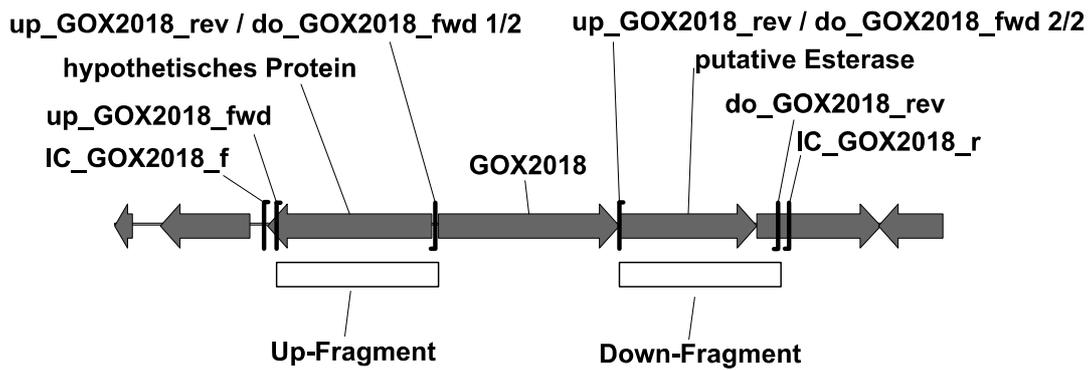


Abbildung 51: Strategie zur Deletion der cytoplasmatischen Acetaldehyd-Dehydrogenase GOX2018. Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX2018_fwd und up_GOX20187_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX2018_fwd und do_GOX2018_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX2018_fwd und do_GOX2018_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX2018_fwd wurde eine *XbaI*-Schnittstelle, mit do_GOX2018_rev eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX2018 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX2018_f und do_GOX2018_rev, sowie up_GOX2018_fwd und IC_GOX2018_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX2018_f und IC_GOX2018_r.

3.6.1.3. Deletion der Acetyl-CoA-Synthetase

Um einen alternativen Acetatbildungsweg auszuschließen, wurde die Mutante *G. oxydans* Δ upp Δ GOX0413 im Rahmen des Forschungspraktikums von Bernadette Mühlthaler durch Deletion der Acetyl-CoA-Synthetase GOX0413 erzeugt. Wie in Abbildung 52 zu sehen, konnte die Deletion wieder ohne Berücksichtigung der benachbarten Gene auf Grund ihrer Leserichtung vom Start- bis zum Stopcodon komplett durchgeführt werden. Die Deletion wurde per PCR und Sequenzierung überprüft.

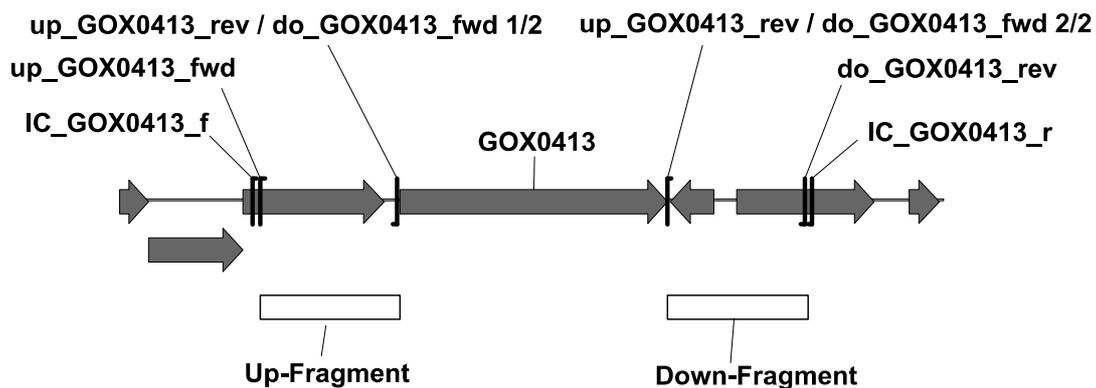


Abbildung 52: Strategie zur Deletion der Acetyl-CoA-Synthetase GOX0413. Das Up-Fragment (1000 bp) wurde mit den Primern up_GOX0413_fwd und up_GOX04137_rev, das Down-Fragment (1000 bp) mit den Primern do_GOX0413_fwd und do_GOX0413_rev amplifiziert. Durch eine Amplifikation unter Vorlage beider Fragmente mit up_GOX0413_fwd und do_GOX0413_rev wurde das Fusionskonstrukt (2000 bp) erstellt. Mit up_GOX0413_fwd und do_GOX0413_rev wurden zwei *XbaI*-Schnittstellen zur Ligation in pAJ63a eingefügt. Der konstruierte Deletionsvektor wurde pAJ63a:FusionGOX0413 genannt. Die Integration nach der Konjugation wurde mit den Primern IC_GOX0413_f und do_GOX0413_rev, sowie up_GOX0413_fwd und IC_GOX0413_r überprüft, die anschließende Deletion mit den Primern IC_GOX0413_f und IC_GOX0413_r.

3.6.2. Physiologie der Deletionsmutanten

Um zu untersuchen, welche Deletion der Gene GOX1081, GOX1122, GOX2018 oder GOX0413 eine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten oder die Acetatbildung von *G. oxydans* hat, wurden Wachstumsexperimente in Schüttelkolben mit anschließender Messung der Metabolite Acetat und Pyruvat durchgeführt.

3.6.2.1. Wachstumsexperimente

Wie in Abbildung 53 gezeigt, hatten Wildtyp und die Pyruvat-Decarboxylasemutante die gleiche Lag-Phase und die gleiche Wachstumsrate während der exponentiellen Wachstumsphase, sowohl in einem Experiment mit Mannitol-Vollmedium als auch mit Fructose-Vollmedium. Wie auch schon in vorherigen Experimenten gezeigt, war das Wachstum auf Mannitol besser als das Wachstum auf Fructose.

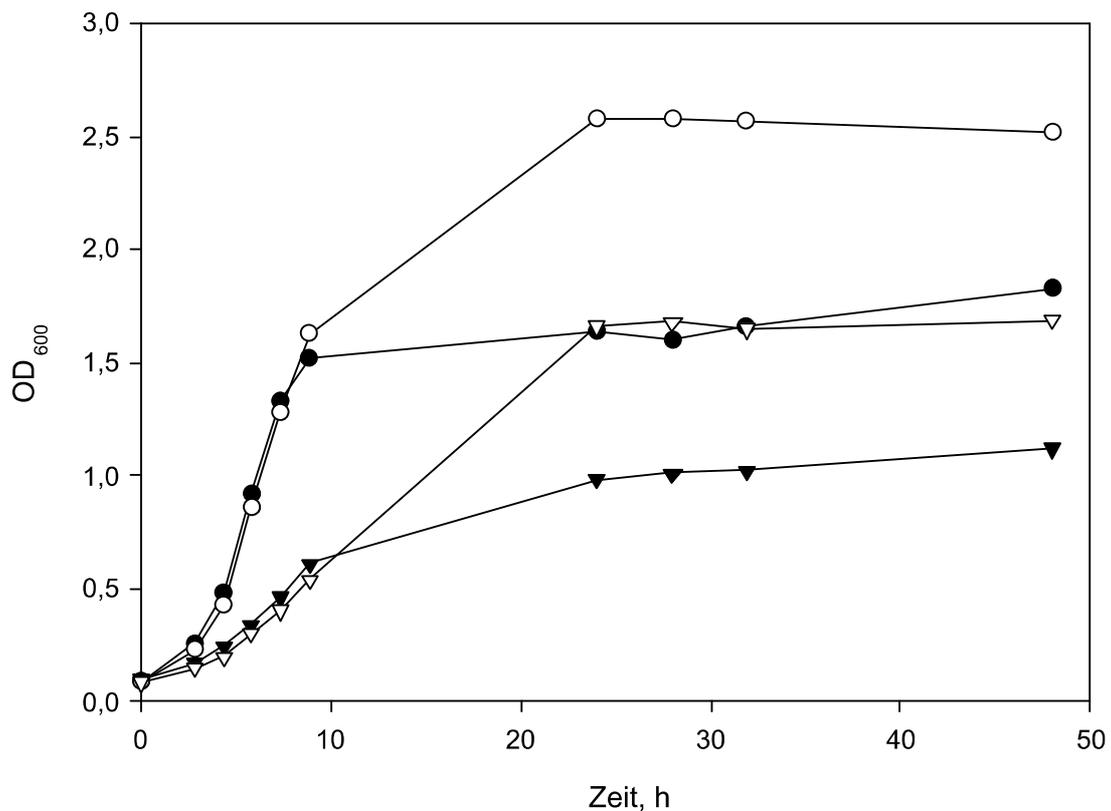


Abbildung 53: Wachstum von *G. oxydans* Δupp auf Mannitol (schwarze Kreise) und Fructose (schwarze Dreiecke), sowie von *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX1081$ auf Mannitol (weiße Kreise) und Fructose (weiße Dreiecke) (siehe auch Peters *et al.* (2013a)).

Für die Mutante wurde sowohl beim Wachstum auf Mannitol als auch auf Fructose schon nach 24 h eine 1,5-fach höhere Zelldichte als beim Wildtyp beobachtet. Dieses Verhältnis veränderte sich bis zum Ende des Experiments nach 48 h nicht. Die Mutante erreichte eine optische Dichte von ca. 2,5 für Mannitol bzw. 1,7 für Fructose. Es wurden auch Wachstumsexperimente mit *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX1122$, *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX2018$ und *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX0413$ durchgeführt. Hier entsprach das Wachstumsverhalten allerdings exakt dem des Wildtyps (nicht gezeigt).

3.6.2.2. Vergleich der Metabolite

Am Schluss der Wachstumsexperimente wurden, wie in Abbildung 54 gezeigt, die Konzentration des Stoffwechsellendprodukts Acetat gemessen. Da durch die Deletion der Pyruvat-Decarboxylase eine Akkumulation von Pyruvat erwartet wurde, wurde auch die Konzentration von Pyruvat enzymatisch bestimmt. Wie erwartet, zeigte der Wildtyp eine Akkumulation von 8 mM Acetat beim Wachstum auf Mannitol. Im Gegensatz dazu konnte für die Mutante fast kein Acetat dafür aber 12 mM Pyruvat gemessen werden. Obwohl die erreichte Zellkonzentration auf Fructose geringer war als auf Mannitol, akkumulierte hier, wie auch schon in vorherigen Experimenten gezeigt, 10 mM Acetat beim Wachstum des Wildtyps. Die Pyruvatkonzentration der Mutante erreichte jedoch den gleichen Wert wie beim Wachstum auf Mannitol. Es wurde auch untersucht, inwiefern eine Oxidation von Lactat nach Acetat bzw. Pyruvat möglich ist. Der Versuchsaufbau dafür entsprach dem eines Wachstumsexperiments, nur dass statt Mannitol oder Fructose 50 mM L-Lactat im Vollmedium enthalten waren. Die Kulturen wurden wie bei Aufnahme einer Wachstumskurve für 48 h bei 30 °C geschüttelt inkubiert. Auch wenn *G. oxydans* wie erwartet keine neue Zellmasse bilden konnte (nicht gezeigt), wurde für den Wildtyp dennoch nach 48 h eine Akkumulation von 12 mM Acetat und 4 mM Pyruvat gemessen. Die Mutante hingegen akkumulierte eine verschwindend geringe Menge an Acetat, aber die höchste Pyruvatkonzentration von 20 mM im gesamten Experiment. Für die Mutanten

G. oxydans $\Delta upp \Delta GOX1122$, *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX2018$ und *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX0413$ wurden nach Wachstumsexperimenten mit Mannitol und Fructose die gleichen Acetatkonzentrationen wie beim Wildtyp gemessen und ebenso keine Pyruvatakkumulation beobachtet (nicht gezeigt).

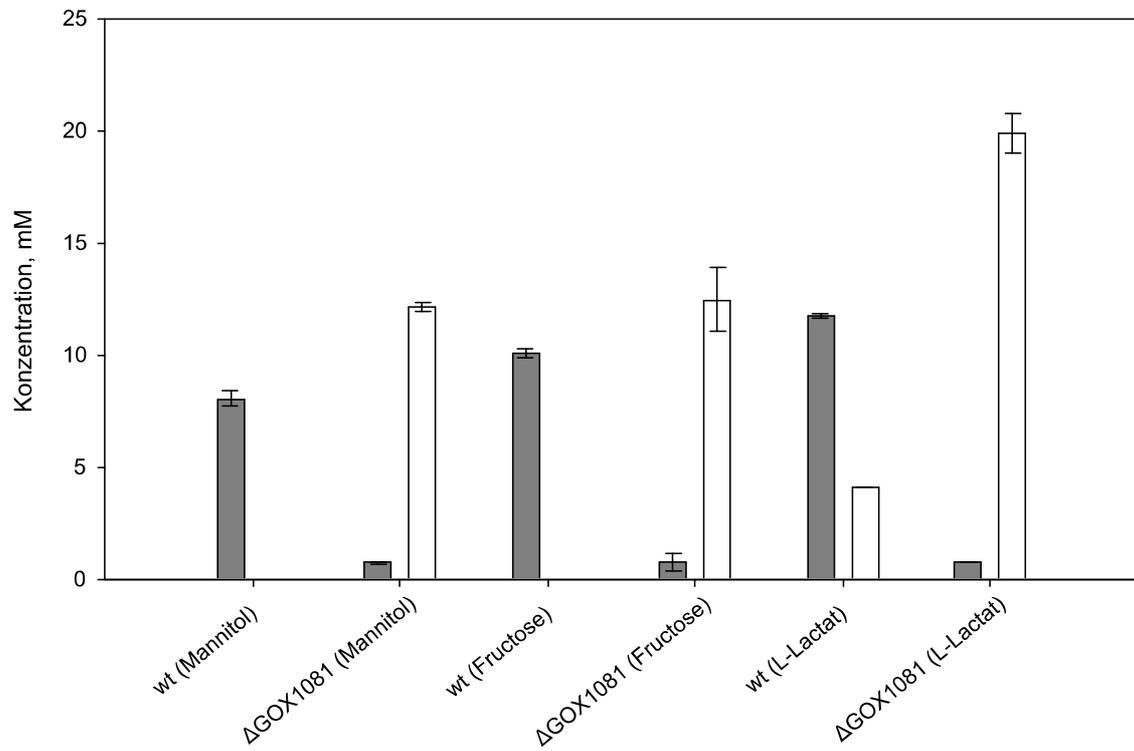


Abbildung 54: Acetat- (grau) und Pyruvat- (weiß) konzentrationen des Wildtyps *G. oxydans* Δupp und der Pyruvat-Decarboxylasemutante *G. oxydans* $\Delta upp \Delta GOX1081$ nach 48 h Wachstumsexperiment und nach einer Inkubation in der Anwesenheit von 50 mM L-Lactat (siehe auch Peters *et al.* (2013a)).

4. Diskussion

4.1. Membranständige Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H

4.1.1. Wachstumsverhalten der Deletionsstämme

Mit der Deletion aller wichtigen membranständigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* konnte gezeigt werden, dass diese Enzymsysteme nicht essentiell für den Organismus sind. Die Multideletionsmutante BP.9 ist weiterhin in der Lage auf D-Fructose, D-Glucose, D-Gluconat oder 5-Ketogluconat zu wachsen (siehe 3.2.1). Membranständige Dehydrogenasen sind nur notwendig, wenn die Kohlenstoffquelle nicht direkt verwendet, sondern erst ein oxidiertes Derivat dieser in den Zentralmetabolismus eingeschleust werden kann. Dies konnte z.B. anhand von D-Mannitol beobachtet werden, das von *G. oxydans* so nicht aufgenommen werden kann (siehe 3.2.1.2). D-Mannitol muss zunächst durch die Polyol-Dehydrogenase zur D-Fructose oxidiert werden und kann dann erst als direkte Kohlenstoffquelle verwendet werden. Dies wurde bereits von Voss *et al.* (2010) für *G. oxydans* DSM 7145 beobachtet und bestätigt Ergebnisse von Hölscher und Görisch (2006). Diese konnten bereits zeigen, dass *G. oxydans* 621H nicht auf D-Mannitol und D-Sorbitol, aber auf D-Gluconat wachsen kann, wenn die PQQ-Produktion durch eine Mutation blockiert wurde und somit viele membranständige Dehydrogenasen inaktiv sind. Ihre Beobachtung, dass der Stamm außerdem nicht auf Glucose wachsen kann, wurde von dem in dieser Arbeit erstellten Multideletionsstamm jedoch nicht bestätigt. Krajewski *et al.* (2010) beobachteten ebenfalls, dass ein Glucose-Dehydrogenase-Deletionsstamm von *G. oxydans* immer noch in der Lage ist auf Glucose zu wachsen und dort sogar einen höheren Zellertrag liefert. Obwohl der 621H-Stamm nicht so hohe Zelldichten erreicht wie der bei Krajewski *et al.* (2010) verwendete N44-1, konnte dieser Effekt trotzdem in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden (siehe 3.2.1.3). Es wurde bestätigt, dass alle Mutanten ohne membranständige Glucose-Dehydrogenase eine geringere exponentielle Wachstumsrate zeigten und kein Gluconat

anhäuften, dafür aber eine höhere optische Dichte am Ende des Versuchs erreichten. Deswegen wird davon ausgegangen, dass die Oxidation von Glucose zu Gluconat durch die membranständige Glucose-Dehydrogenase ein schnelleres Wachstum auf Glucose ermöglicht. Die durch die Oxidation gewonnenen Elektronen werden direkt in die Elektronentransportkette zur Energiegewinnung geschleust. Allerdings würde die Assimilation der Glucose durch die Zellen einen höheren Zellertrag liefern. Diese Beobachtung bestätigt den in der Einleitung angesprochenen Wettbewerb der verschiedenen Stoffwechselwege um das gleiche Substrat.

Die Deletion der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase ergab eine leicht höhere optische Zelldichte am Ende eines Wachstumsexperiments, die Deletion der Polyol-Dehydrogenase erhöhte die Zelldichte auf Fructose und Glucose weiter (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.3). Wir vermuten, dass dies am großen Platzbedarf der beiden sehr bedeutenden Enzyme in der cytoplasmatischen Membran liegen könnte. Ihr Fehlen könnte eventuell die Menge an anderen membranständigen Proteinen, wie z.B. den Komponenten der Atmungskette oder Transporter erhöhen und damit einen höheren Zellertrag verursachen. Auch könnte die Energie, die normalerweise zur Expression der Dehydrogenasen verwendet wird, nun in die Biomassebildung fließen.

Beim Wachstum auf Mannitol verhielt es sich ähnlich wie beim Wachstum auf Fructose, allerdings mit der Ausnahme, dass BP.9 und BP.10 auf Grund der fehlenden Polyol-Dehydrogenase dort nicht wachsen können (siehe 3.2.1.2). Das Einschleusen der Elektronen aus der Mannitoxidation in die Elektronentransportkette durch die membranständige Polyol-Dehydrogenase ist wahrscheinlich die Ursache für das erhöhte Wachstum auf Mannitol im Vergleich zur direkt aufgenommenen Fructose.

4.1.2. Substratspektren membranständiger Dehydrogenasen

Neben den Wachstumsexperimenten, die die Rolle der membranständigen Dehydrogenasen in der Physiologie von *G. oxydans* aufzeigten, wurden deren Substratspektren untersucht. Dafür wurde ein Ganzzell-DCPIP Assay für eine schnelle Charakterisierung der Substratspezifitäten von membranständigen Dehydrogenasen entwickelt (siehe 3.2.2.1). Die Zellvorbereitung wurde in diesem Assay auf einen Waschvorgang mit Phosphatpuffer reduziert und so die gesamte Vorbereitung für acht bis zwölf Stämme gleichzeitig auf ca. 1 h reduziert, eine Zeitersparnis von bis zu 99 % im Vergleich zum klassischen Assay. Die notwendige Versiegelung der Mikrotiterplatte, die leicht flüchtige Substrate wie Ethanol davon abhält in benachbarten Plattenvertiefungen eine falsch positive Aktivität hervorzurufen, machte deutlich, wie sensitiv der Assay für diese Substrate ist. Hier reichten bereits die Moleküle in der Gasphase aus, die sich dann in der wässrigen Phase der Negativkontrolle lösten, um mit Hilfe der enthaltenen Zellen genügen DCPIP für eine sichtbare Reaktion zu reduzieren. Ein weiterer bedeutender Vorteil des Ganzzell-Assays ist, dass es mit diesem zum ersten Mal möglich ist, die Oxidationsaktivität der Dehydrogenasen *in vivo* und nicht nur *in vitro* messen zu können.

Mit diesem Assay und den erzeugten Deletionsmutanten konnten nun die membranständigen Dehydrogenasen von *G. oxydans* charakterisiert werden (siehe 3.2.2.2). Da z.B. die Oxidation einfacher primärer Alkohole von Methanol bis zum Hexanol nach der Deletion der membranständigen Alkohol-Dehydrogenasen (GOX1067, GOX1068) nicht mehr beobachtet werden konnte, wird angenommen, dass diese einfachen primären Alkohole von dieser Dehydrogenase zu den korrespondierenden Aldehyden oxidiert werden. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den Beobachtungen von Adachi *et al.* (1978) überein, die eine Oxidation von C₂-C₆-kettigen Alkoholen durch eine aufgereinigte membranständige Alkohol-Dehydrogenase von *G. suboxydans* beschreiben. Eine Oxidation von Methanol konnte von ihnen allerdings nicht gezeigt werden. Allerdings beschrieben sie eine langsame Oxidation

von Formaldehyd und Acetaldehyd. Habe *et al.* (2009) berichteten außerdem von einer Oxidation von Glycerin zu Glycerinaldehyd durch die Alkohol-Dehydrogenase in *G. oxydans* und zeigten, dass deren Deletion die Ausbeute der Dihydroxyaceton-Produktion aus Glycerin erhöhte (Habe *et al.* 2010). In den in dieser Arbeit konstruierten Multideletionsstämmen war es allerdings nicht möglich, sowohl die Aldehyd- als auch die Glycerinoxidation zu bestätigen, da die Aldehyd-Dehydrogenase- und die Polyol-Dehydrogenaseaktivitäten für diese Substrate viel höher waren. Die bessere Oxidation von Glycerin, die von Habe *et al.* (2010) beobachtet wurde, könnte ebenfalls auf eine Erhöhung des freien cytoplasmatischen Membranplatzes zurückzuführen sein, wie auch schon unter Punkt 4.1.1 angesprochen. Zusätzlich zur Oxidation von azyklischen Alkoholen durch die Alkohol-Dehydrogenase wurde außerdem gezeigt, dass 2-Cyclohexylethanol, ein primärer Alkohol, trotz einer relativ großen cyclischen Seitenkette oxidiert wurde.

Die Inositol-Dehydrogenase (GOX1857) oxidiert *myo*-Inositol und hat eine schwache Aktivität gegenüber *allo*-Inositol in BP.1. Das entspricht den Beobachtungen von Hölscher *et al.* (2007), die diese Aktivität mit einem Vergleich von *G. oxydans* 621H Wildtyp mit einer Einfachdeletionsmutante nachwiesen.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass alle primären Aldehyde von Formaldehyd bis zu Valeraldehyd durch die Aldehyd-Dehydrogenase (GOX0585, GOX0586, GOX0587) oxidiert werden, da die Aktivitäten für diese Substrate mit der Deletion dieser Dehydrogenase verschwinden. Adachi (1980), der dieses Enzym aus *G. suboxydans* isolierte, beobachtete ähnliche Spezifitäten, sogar für primäre Aldehyde mit Phenylgruppen wie Benzaldehyd oder Zimtaldehyd. Allerdings konnten sie die Oxidation von Formaldehyd, die in den Assays der vorliegenden Arbeit eindeutig sichtbar war, nicht nachweisen und haben keine Tests mit Valeraldehyd gemacht.

Soemphol *et al.* (2008) beschrieben zwei separate Sorbitol-Dehydrogenasen in *G. frateurii*, eine PQQ und eine FAD abhängige Sorbitol-Dehydrogenase. Da allerdings die Polyol-Dehydrogenase nach wie vor im Genom von BP.4 vorhanden war, konnte keine Veränderung der Sorbitoloxidationsaktivität durch die Deletion der FAD abhängigen Sorbitol-Dehydrogenase (GOX2094, GOX2095, GOX2096, GOX2097) festgestellt werden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die FAD abhängige Sorbitol-Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H inaktiv ist, da die experimentell charakterisierten Dehydrogenasen von *G. frateurii* und *G. oxydans* IFO 3254 aus drei und nicht aus vier Untereinheiten bestehen (Shinagawa *et al.* 1982; Soemphol *et al.* 2008). Eine Mutation in *G. oxydans* 621H könnte dafür verantwortlich sein, dass ein zusätzliches Stopcodon innerhalb der großen Untereinheit entstanden ist, das diese in GOX2095 und GOX2096 aufspaltet und so die Dehydrogenase inaktiviert (Prust 2004).

Für die membranständige Gluconat-Dehydrogenase (GOX1230, GOX1231, GOX1232) konnte als einziges Substrat D-Gluconat gefunden werden. Gluconat wird von zwei membranständigen Dehydrogenasen oxidiert. Die Gluconat-Dehydrogenase oxidiert es zu 2-Ketogluconat, weswegen sie auch Gluconat-2-Dehydrogenase genannt wird. Die Polyol-Dehydrogenase oxidiert Gluconat zu 5-Ketogluconat (Shinagawa *et al.* 1984; Shinagawa *et al.* 1999; Matsushita *et al.* 2003). In Übereinstimmung mit diesen *in vitro*-Ergebnissen wurde in BP.5 durch die Deletion der Gluconat-Dehydrogenase die Gluconatoxidation nur verringert und verschwand erst durch die zusätzliche Deletion der Polyol-Dehydrogenase in BP.9.

Für die Glucose-Dehydrogenase (GOX0265) konnten einige bisher noch nicht bekannte Substrate identifiziert werden. Zusätzlich zu den für das aufgereinigte Enzym schon veröffentlichten Substraten wie D-Xylose, D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, L-Arabinose, D-Allose (Buchert 1991; Meyer *et al.* 2012) wurden D-Altrose, Cellobiose und Turanose als Substrate für dieses Enzym nachgewiesen. Meyer *et al.* (2012) konnten

außerdem noch 2-Deoxy-D-Glucose, D-Fucose, D-Gluconamin, Melibiose und D-Gulose als Substrate identifizieren. Die zusätzlich von ihnen beobachtete Aktivität bei D-Maltose, die auch bei Buchert (1991) auftrat, konnte in dieser Arbeit in mehreren Experimenten nicht reproduzierbar bestätigt werden. Eine sehr leichte Aktivität zeigte sich nur für manche Maltosepräparate in denen eine Verunreinigung mit Glucose nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine fehlende Maltoseoxidationsfähigkeit würde allerdings den Ergebnissen von Cleton-Jansen *et al.* (1991) entsprechen. Dafür wurde in dieser Arbeit eindeutig eine Aktivität bei D-Altrose beobachtet, die laut Meyer *et al.* (2012) nicht messbar war. Sie schlossen ebenfalls D-Mannose aus, deren Oxidation aber sowohl in dieser Arbeit als auch bei Buchert (1991) gezeigt wurde. Zudem beobachtete Meyer *et al.* (2012) keine Aktivität bei D-Talose und D-Idose, die in dieser Arbeit allerdings nicht getestet wurden. Auf Grund dieser Ergebnisse wird erwartet, dass fast alle D-Aldohexosen von der membranständigen Glucose-Dehydrogenase oxidiert werden. Anhand dieser Widersprüche ist außerdem gut erkennbar, dass bei diesen Versuchen hochreine Substanzen sehr essentiell für aussagekräftige Ergebnisse sind, weshalb darauf in dieser Arbeit besonderen Wert gelegt wurde. Es konnte keine Oxidation des Disaccharids Maltose beobachtet werden. Dies galt auch für die Disaccharide Saccharose und Lactose. Die Oxidation von Maltose ist aminosäuresequenzabhängig. Cleton-Jansen *et al.* (1991) konnten zeigen, dass eine Punktmutation von Histidin zu Asparagin an Position 787 in der Nähe des C-Terminus ausreicht, um die Maltoseoxidation zuzulassen. *G. oxydans* 621H besitzt an dieser Stelle ein Histidin, so dass die fehlende Maltoseoxidationsfähigkeit gut zu den Ergebnissen von Cleton-Jansen *et al.* (1991) passt. Ob alle Aldopentosen von der Glucose-Dehydrogenase umgesetzt werden, konnte auf Grund der weiterhin starken Umsetzung durch die Polyol-Dehydrogenase nicht geklärt werden. Laut der in der Literatur schon beschriebenen Ergebnisse mit aufgereinigten Enzymen kann allerdings auch nicht davon ausgegangen werden, da D-Ribose und D-Lyxose, wie von Meyer *et al.* (2012) gezeigt wurde, bereits nicht umgesetzt werden.

Viele der untersuchten Substrate wurden von der membranständigen Polyol-Dehydrogenase (GOX0854 GOX0855) oxidiert. Es konnte gezeigt werden, dass einfache sekundäre Alkohole von Isopropanol bis 2-Hexanol oder 3-Hexanol, sowie Diole, wie 1,2-Pentandiol, 1,3-Butandiol, 2,3-Butandiol oder 2,5-Hexandiol, Substrate dieser Dehydrogenase sind. Das Gleiche wurde für eine Arabitol-Dehydrogenase, isoliert aus *G. suboxydans* IFO 3257, beobachtet (Adachi *et al.* 2001). Auch zyklische Alkohole wie 1,2-Cyclohexandiol wurden, wie bereits für die Membranfraktion und ganze Zellen von *G. oxydans* 621H von Adlercreutz (1989) beschrieben, oxidiert. Die Aldotriose D-Glycerinaldehyd, Aldotetrosen D-Erythrose und D-Threose sowie zwei Aldopentosen D-Lyxose und D-Ribose werden von der Polyol-Dehydrogenase umgesetzt. Die Oxidation der Aldosen scheint abhängig von der Anzahl der Kohlenstoffatome, die Oxidation der Pentosen und Polyole abhängig von der richtigen stereochemischen Konfiguration zu sein. *Meso*-Erythritol, D-Sorbitol, D-Mannitol, D-Arabitol und D-Ribitol, die eine *D-erythro*-Konfiguration haben, werden von der Polyol-Dehydrogenase oxidiert. L-Threitol, D-Threitol, L-Arabitol und Dulcitol, die diese Konfiguration nicht haben, werden nicht als Substrate verwendet. Dies passt exakt zu dem Oxidationsspektrum der Arabitol-Dehydrogenase, isoliert aus *G. suboxydans* IFO 3257 (Adachi *et al.* 2001), und einer Polyol-Dehydrogenase aufgereinigt aus *G. oxydans* 621H, der zu dieser Zeit noch *Acetobacter suboxydans* no. 621 hieß (Arcus und Edson 1956). Matsushita *et al.* (2003) zeigten mittels Immunokreuzreaktivität, dass es sich bei allen isolierten membranständigen PQQ abhängigen Enzymen um das gleichen Enzym handelte. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dies. Die Polyol-Dehydrogenase ist das für die Bertrand-Hudson-Regel verantwortliche Enzym. Diese Regel besagt, dass Polyole mit einer *cis*-Anordnung zweier Hydroxylgruppen in D-Konfiguration zur primären Alkoholgruppe zum korrespondierenden Keton oxidiert werden (Bertrand 1898; Bertrand 1904; Hann *et al.* 1938). Da die Deletion der Polyol-Dehydrogenase die lag-Phase aus einem Glycerinstock um

100 % verlängerte und die Konjugationseffizienz stark nachließ, wurde diese Dehydrogenase als eines der letzten Enzyme deletiert.

Neben der Polyol-Dehydrogenase gab es noch drei weitere Gene im Genom von *G. oxydans* 621H, die als PQQ-abhängige Dehydrogenasen annotiert wurden (Prust *et al.* 2005): die PQQ-abhängigen Dehydrogenasen 2 (GOX1969), 3 (GOX1441) und 4 (GOX0516). 3 und 4 konnten ebenfalls deletiert werden. Allerdings war es nicht möglich ihnen eine Oxidationsaktivität für eins der getesteten Substrate zuzuordnen, auch nicht als Deletionsstämme (BP.7.1 und BP.8.1) konstruiert wurden, bei der die Polyol-Dehydrogenase vor diesen Enzymen deletiert wurde (Daten nicht gezeigt).

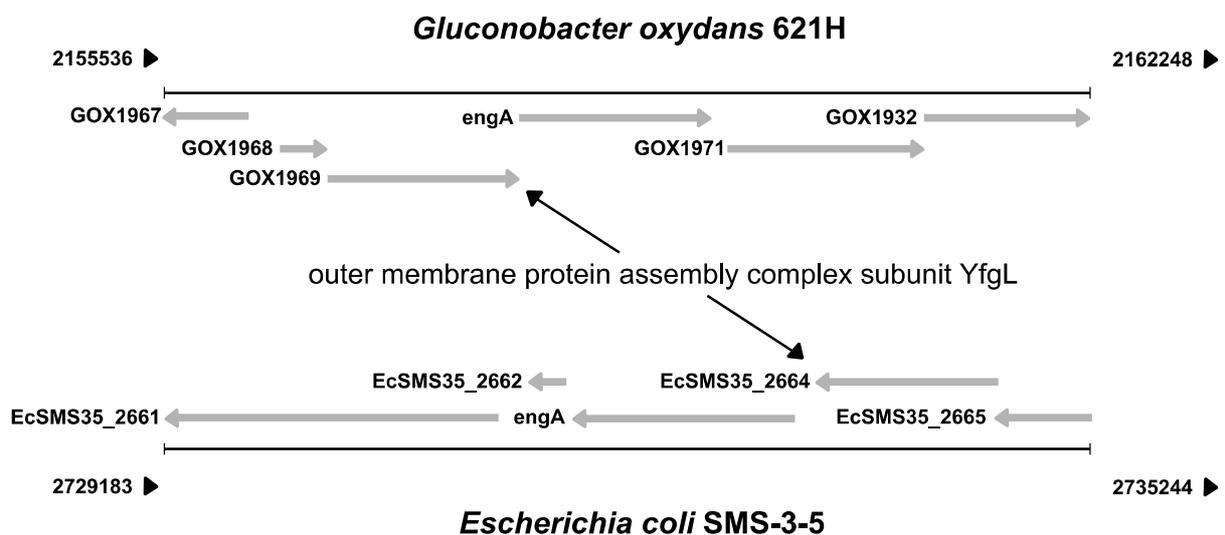


Abbildung 55: Vergleich des Operons um GOX1969 aus *G. oxydans* 621H mit dem Operon aus *E. coli* SMS-3-5 dem nächsten Verwandten mit aufgeklärter Funktion des Operons. GOX1968 und EcSMS35_2665 sind die beiden hypothetischen Proteine, die ebenfalls innerhalb der α -Proteobakterien konserviert sind.

Das als PQQ-abhängige Dehydrogenase 2 annotierte Gen GOX1969 konnte nicht deletiert werden. Bioinformatische Untersuchungen ergaben, dass dieses Gen ein Operon mit einem GTP-Bindeprotein EngA (GOX1970) und einem hypothetischen Protein (GOX1968) bildet. Dieses Operon ist in allen α -Proteobakterien konserviert. Es konnte in dieser Arbeit durch Sequenzvergleich gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein eher um eine Untereinheit für einen Außenmembranproteinmontagekomplex (*outer membrane protein assembly*

complex subunit YfgL) handelt als um eine PQQ-abhängige Dehydrogenase. Dieser Komplex ist verankert in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und baut β -Barrel-Proteine in diese Membran ein (Gatsos *et al.* 2008). In *G. oxydans* scheint dieser Komplex essentiell zu sein, obwohl er es in *E. coli* nicht ist (Onufryk *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2005). Eine weitere Beobachtung, die während dieses Versuchs der GOX1969-Deletion gemacht wurde, war, dass eine Mutante gefunden wurde, die nach einer Überprüfungs-PCR zwei Bandenmuster aufwies (siehe 3.1.8). Eine getrennte Sequenzierung ergab, dass die eine Sequenz die Wildtypsequenz beinhaltet und die andere die erwartete Mutantensequenz. Ein Southern-Blot zeigte auch, dass die Sonde im Genom der Mutante zweimal binden konnte. Durch die Tatsachen, dass die Sequenzier- und PCR-Primer außerhalb der veränderten Sequenz lagen, die Southern-Blot-Sonde auch in der Flanke binden konnte und es sich bei den analysierten Zellen nur um einen Klon handelte, was mehrmals verifiziert wurde, könnte geschlussfolgert werden, dass in dieser Mutante mehr als eine Kopie des Chromosoms vorliegt. Es könnte also sein, dass *G. oxydans* unter großem Stress und Selektionsdruck von einem Gen mehrere Allele auf verschiedenen Chromosomen besitzen kann und somit auch in der stationären Phase polyploid ist. Polyploidie in stationären oder sehr langsamen Wachstumsphasen wurde auch schon für andere Proteobakterien wie *Pseudomonas putida* gezeigt (Pecoraro *et al.* 2011).

Die letzten Substrate, die während der Plattenassays oxidiert wurden, waren Lactat und 2-Hydroxybuttersäure. Die Aktivität für D-Lactat verschwand in BP.10 mit der Deletion der D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253). Diese membranständige D-Lactat-Dehydrogenase wurde, basierend auf sorgfältiger Recherche, bisher nur in weitläufigen Verwandten von *G. oxydans* beschrieben. *E. coli* besitzt eine membranständige D-Lactat-Dehydrogenase, die in der inneren Zellmembran lokalisiert ist und deren aktives Zentrum auf der cytoplasmatischen Seite liegt (Dym *et al.* 2000). D-Lactat war das einzige Substrat, das während der vorliegenden Arbeit der membranständigen D-Lactat-Dehydrogenasen

zugewiesen werden konnte. Vom Multideletionsstamm BP.10 wurden noch L-Lactat und 2-Hydroxybuttersäure oxidiert. Die membranständige Aktivität der L-Lactat-Oxidation wurde auch durch einen klassischen DCPIP-Assay mit einer Membranfraktionspräparation vom Wildtyp und BP.10 bestätigt. Um die L-Lactat-Dehydrogenase zu identifizieren, wurden die Gene GOX1170 und GOX2071, die als L-Lactat-Dehydrogenasen annotiert waren (Prust *et al.* 2005), in zwei Einfachdeletionsstämmen (d1170 und d2071) und einer Doppeldeletionsmutante (dd170/2071) deletiert. Es wurde auch ein Dreifachdeletionsstamm (d1170/2071/1253) konstruiert, in dem auch die D-Lactat-Dehydrogenase deletiert wurde. Allerdings zeigte keiner dieser Mutanten eine Veränderung der L-Lactat-Oxidationsaktivität (siehe 3.2.2.2.9). Ein weiterer potentieller Kandidat für ein Gen für ein L-Lactat-oxidierendes Enzym im Genom von *G. oxydans* 621H war GOX1168, das als putative Oxidoreduktase annotiert ist (Prust *et al.* 2005). Das Protein ist verwandt mit einer charakterisierten membranständigen L-Lactat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* (Ma *et al.* 2007). Die Konstruktion einer Doppeldeletionsmutante von GOX1168 und GOX1170 zusammen mit dem dazwischenliegenden hypothetischen Protein GOX1169 ergab den Stamm d1168/1169/1170, der allerdings ebenfalls keinen Abfall der L-Lactat-Dehydrogenaseaktivität zeigte. Alle Versuche eine Dreifachmutante von GOX1168, GOX1170 und GOX2071 zu erzeugen, schlugen fehl, weswegen davon ausgegangen wird, dass der Verlust aller putativen L-Lactat-Dehydrogenasen letal für den Organismus ist.

Generell stellte sich der in dieser Arbeit entwickelte Ganzzell-DCPIP-Assay als eine ideale Methode heraus, um das Substratspektrum membranständiger Dehydrogenasen mit äußerst geringem Vorbereitungsaufwand *in vivo* beobachten zu können. Im Falle, dass die Ergebnisse bereits in der Literatur beschrieben wurden, stimmten die des Assays sehr gut mit den Literaturdaten überein. Die Oxidationsaktivitäten waren in den meisten Fällen für den Wildtyp höher als für alle Deletionsstämmen. Der Grund könnte das veränderte Wachstumsverhalten, die finale optische Dichte der Deletionsstämmen oder eine unbekannt

Interaktion der als erstes deletierten Alkohol-Dehydrogenase mit anderen membranständigen Dehydrogenasen sein. Auch konnte im Assay eine sehr geringe, nicht immer reproduzierbare Aktivität einer Acetaldehydoxidation für alle Deletionsmutanten beobachtet werden, die keine Aldehyd-Dehydrogenase mehr besaßen. Da dies allerdings nicht in klassischen Assays mit aufgereinigten Membranfraktionen bestätigt werden konnte, handelte es sich hierbei sehr wahrscheinlich um unspezifische Kreuzreaktionen der Redoxmediatoren mit anderen Zellkomponenten.

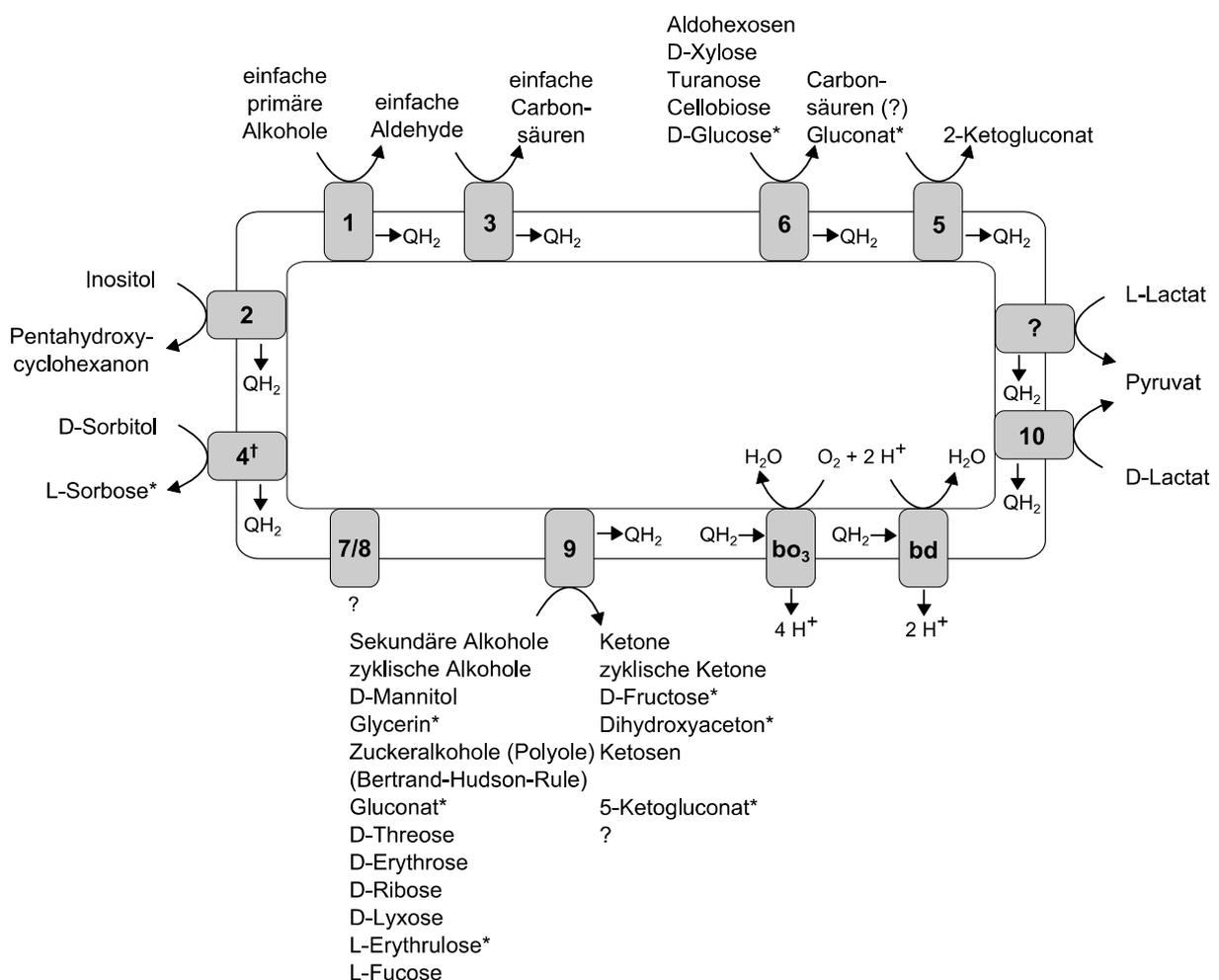


Abbildung 56: Schematische Zusammenfassung der membranständigen Dehydrogenasen und ihrer Substrate in *G. oxydans* 621H (siehe auch Peters *et al.* (2013b)): 1. Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067, GOX1068); 2. Inositol-Dehydrogenase (GOX1857); 3. Aldehyd-Dehydrogenase (GOX0585, GOX0586, GOX0587); 4[†]. Sorbitol-Dehydrogenase (GOX2094, GOX2095, GOX2096, GOX2097) wahrscheinlich inaktiv in *G. oxydans* 621H; 5. Gluconat-Dehydrogenase (GOX1230, GOX1231, GOX1232); 6. Glucose-Dehydrogenase (GOX0265); 7. PQQ abhängige Dehydrogenase 3 (GOX1441); 8. PQQ abhängige Dehydrogenase 4 (GOX0516); 9. Polyol-Dehydrogenase (GOX0854, GOX0855); 10. D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253); ? Unbekannte L-Lactat-Dehydrogenase; *bo*₃ Quinoloxidase *bo*₃-Typ; *bd* Quinoloxidase *bd*-Typ. Membranständige Dehydrogenasen transferieren Elektronen auf Ubiquinol und bilden somit den reduzierten Cofaktor Ubiquinol (QH₂), welcher anschließend von *bo*₃- und *bd*-Oxidase oxidiert wird, um einen Elektronengradienten für die Energieproduktion zu generieren. *Substrate können internalisiert und für Wachstum verwendet werden.

Durch bioinformatische Untersuchungen aller annotierten Gene in *G. oxydans* 621H wurden lediglich weitere Dehydrogenasen gefunden, die eventuell mit membranständigen hypothetischen Proteinen in einem Operon lokalisiert sind. Da aber bisher sowohl während dieser Arbeit als auch in der Literatur keine weiteren Substrataktivitäten gefunden werden konnten, wird davon ausgegangen, dass diese Dehydrogenasen nicht membranständig sind und sich somit keine weiteren membranständigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H befinden. Eine schematische Zusammenfassung der aktuellen Wissenslage ist in Abbildung 56 dargestellt. Der vitalste konstruierte Multideletionsstamm (BP.9), dem die wichtigsten membranständigen Dehydrogenasen genommen wurden, wurde anschließend als Expressionsstamm für metagenomische membranständige Dehydrogenasen verwendet.

4.2. Membranständige Dehydrogenasen aus einem Metagenom

4.2.1. Diversität eines Essigmuttermetagenoms

Die Diversitäten der Essigmütter waren für ein Metagenom vergleichsweise gering. Es konnte gezeigt werden, dass nur zwei Gattungen, *Acetobacter* und *Gluconacetobacter*, das Metagenom dominieren. 38 % aller Bakterien wurden der Spezies *Acetobacter pasteurianus* zugeordnet (siehe 3.4.2). Ein Metagenom aus einem Gramm Erde kann im Vergleich dazu bis zu 10000 verschiedene Spezies enthalten (Curtis *et al.* 2002). Allerdings wurde auch gezeigt, dass während einer Essigfermentation eher ein bis drei Spezies die Regel sind (Gullo *et al.* 2006; Ilabaca *et al.* 2008; Wu *et al.* 2010; Mamlouk *et al.* 2011). Innerhalb der Spezies wurde durch ein Multialignment und Berechnung eines Maximum-Likelihood-Baums eine weitere Diversität vorhergesagt. Diese kann allerdings auch auf Sequenzierfehlern beruhen, da die Sequenzierung der 16S rDNA aus Kostengründen nicht auf der kompletten Sequenzlänge mit doppelter Abdeckung erfolgte. Eine Diversität innerhalb einer Spezies während einer Essigfermentation wurde allerdings auch von Wu *et al.* (2010) beobachtet. Nach der Konstruktion der Metagenombank wurde eine 454-Sequenzierung von zwei Mal ca. 280 Fosmiden durchgeführt. 88 % der Contigs aus der ersten Sequenzierung waren im

Durchschnitt zu 96 % identisch mit den Contigs des zweiten Durchlaufs, so dass die Sequenzierung nach 570 Klonen eingestellt wurde. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Diversität des gesamten Metagenoms nicht besonders hoch war, sondern von einigen wenigen Stämmen dominiert wurde. Nur für zwei weitere Essigmütter konnte eine DNA-Isolation erfolgreich durchgeführt werden. Diese wurden allerdings von *Gluconacetobacter sp.* mit einem Anteil von bis zu 90 % dominiert und einigten sich deswegen noch weniger als die erste Essigmutter. Studien, die den Essigproduktionsprozess über einen längeren Zeitraum beschreiben, zeigten, dass die Diversität bis zu einem dominierenden Stamm abnehmen kann, wenn die Essigbildung voranschreitet und die Essigsäurekonzentration höher als 2-4 % ist (Ilabaca *et al.* 2008; Mamlouk *et al.* 2011). Dies erklärt die geringe Diversität. Eine höhere Diversität könnte eventuell mit Proben aus weniger weit fortgeschrittenen Essigfermentationen erreicht werden. Für weitere Proben war keine Isolation von hochmolekularer DNA in der nötigen Quantität und Qualität möglich. Isolation hochmolekularer DNA aus einer Essigmutter ist ein anspruchsvolles Problem, wie verschiedene Isolationsprotokolle und Abhandlungen beschreiben, deren Strategien allerdings nur darauf getestet wurden, ob die 16S rDNA amplifizierbar war (Mamlouk *et al.* 2011). In den meisten Fällen wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich degradierte DNA aus den Proben gewonnen.

4.2.2. Substratspektren der metagenomischen Dehydrogenasen

Auch wenn die Diversität des Metagenoms eher gering war, konnten dennoch sechs metagenomische membranständige Dehydrogenasen erfolgreich exprimiert und per Ganzzell-DCPIP-Assays charakterisiert werden (siehe 3.5.2). Im Vergleich zu den Dehydrogenasen von *G. oxydans* wurde dabei eine komplett neue Dehydrogenase gefunden. Zwei weitere hatten ähnliche Substratspektren zu denen von *G. oxydans*, wobei einmal das Substratspektrum erweitert und einmal stark verringert war. Die drei restlichen Dehydrogenasen hatten bei den untersuchten Substraten das gleiche Substratspektrum wie in

G. oxydans. Das einfachste Spektrum hatte die metagenomische membranständige D-Lactat-Dehydrogenase mmDLDH. Von allen getesteten Substraten konnte diese nur D-Lactat umsetzen. Dies entspricht dem Substratspektrum der membranständigen D-Lactat-Dehydrogenase (GOX1253) von *G. oxydans* 621H, mit der sie zu 75 % identisch ist. Die metagenomische Aldehyd-Dehydrogenase mmAcDH ist zu 72 % identisch mit der Aldehyd-Dehydrogenase (GOX0585, GOX0586, GOX0587) in *G. oxydans* und oxidierte genau wie diese nur einfache Aldehyde. Die metagenomische Alkohol-Dehydrogenase mmADH hatte ein sehr breites Substratspektrum. Sie oxidierte viele verschiedene Alkohole und Aldehyde. Die verwandte Alkohol-Dehydrogenase aus *G. oxydans* (GOX1067, GOX1068) ist zu 72 % identisch und auch hier sind die Substratspektren mit ziemlicher Sicherheit identisch. Beide oxidierten einfache Alkohole vom Methanol bis zum 1-Hexanol und primäre Dirole wie 1,3-Propandiol oder 1,4-Butandiol. Auch oxidierten beide kleine Zuckeralkohole wie D- oder L-Threitol. Weitere Substrate konnten auf Grund der stärkeren Oxidationsaktivität anderer Dehydrogenasen im Multideletionsstamm nicht der Alkohol-Dehydrogenase von *G. oxydans* zugeordnet werden. Im Zuge weiterer Arbeiten unserer Gruppe, bei denen unter anderem die Alkohol-Dehydrogenase alleine im Multideletionsstamm BP.9 exprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass weitere Substrate auch von der membranständigen Alkohol-Dehydrogenase von *G. oxydans* 621H umgesetzt werden (Mientus *et al.* 2013). Die metagenomische Dehydrogenase oxidierte, wie auch die in *G. oxydans*, einfache Aldehyde von Formaldehyd bis zu Valeraldehyd sowie Dirole mit einer primären und einer sekundären Alkoholgruppe (1,3-Butandiol, 1,2-Pentandiol oder 1,2-Hexandiol). Beide oxidierten keine cyclischen Alkohole und nur sekundäre Alkohole mit maximal einer Alkoholgruppe wie Isopropanol, 2-Hexanol oder 3-Hexanol. Weitere gemeinsame Substrate waren D-Arabitol, D-Glycerinaldehyd, D-Erythrose, D-Sedoheptulose, Cellobiose, Trehalose und L-Fucose. Die geringen Aktivitäten von L-Sorbose, D-Galactose oder D-Lyxose konnten für die Alkohol-Dehydrogenase von *G. oxydans* allerdings nicht bestätigt werden.

Die drei interessantesten Dehydrogenasen sind mmGDH, mPQQ4 und msldAB. mmGDH hat ein ähnliches Substratspektrum wie die membranständige Glucose-Dehydrogenase (GOX0265) in *G. oxydans*, zu der sie zu 60 % identisch ist. Allerdings besitzt sie einige wichtige zusätzliche Aktivitäten. Neben den gemeinsamen Substraten, wie D-Glucose, D-Xylose, D-Allose, D-Galactose, D-Mannose, L-Arabinose, Cellobiose und Turanose sowie die in Mientus *et al.* (2013) zusätzlich beschriebene L-Fucose-Oxidation oxidierte die metagenomische Dehydrogenase außerdem Acetaldehyd, D-Ribose, Glucoheptose und Erythrose. Das Oxidationsspektrum ist anscheinend nicht so sehr an die Kohlenstoffkettenlänge gekoppelt wie das der Glucose-Dehydrogenase von *G. oxydans*. Werden die beiden Enzyme auf Aminosäuresequenzebene miteinander verglichen, sind einige wichtige Unterschiede in den Sequenzen, wie aus Abbildung 57 ersichtlich, erkennbar. Im Signalpeptid unterscheiden sich 14 Aminosäuren. Auch fallen größere Blöcke mit Sequenzunterschieden bei Position 110, 150, 200, 225, 330, 366, 380, 488 und 640 auf. Auch die Deletionen in der Sequenz der metagenomischen Dehydrogenase bei 671 und 710 sind sehr interessant. Sie könnten eventuell dafür verantwortlich sein, dass durch Fehlen einer Schleifenstruktur größere und kleinere Aldosen von der metagenomische Dehydrogenase oxidiert werden können, die bei der Dehydrogenase von *G. oxydans* allerdings nicht in das aktive Zentrum gelangen. Cleton-Jansen *et al.* (1991) konnten, wie bereits erwähnt, zeigen, dass ein Histidin im C-Terminus verantwortlich für die Diskriminierung von Disacchariden gegenüber Monosacchariden ist. Um dieses Histidin (Position 791), das allerdings bei beiden Dehydrogenasen zu finden ist, befinden sich ebenfalls drei unterschiedliche Aminosäuren, die eventuell auch das erweiterte Substratspektrum ermöglichen könnten. Während der *in silico*-Analyse konnte außerdem ein PQQ-Bindemotiv um Position 380 nur für GOX0265, nicht aber für die metagenomische Dehydrogenase gefunden werden. Welche Aminosäuresequenzunterschiede nun für das erweiterte Substratspektrum verantwortlich sind,

könnten allerdings nur gezielte Mutationsexperimente einer Aminosäure (*site directed mutagenesis*) zeigen.

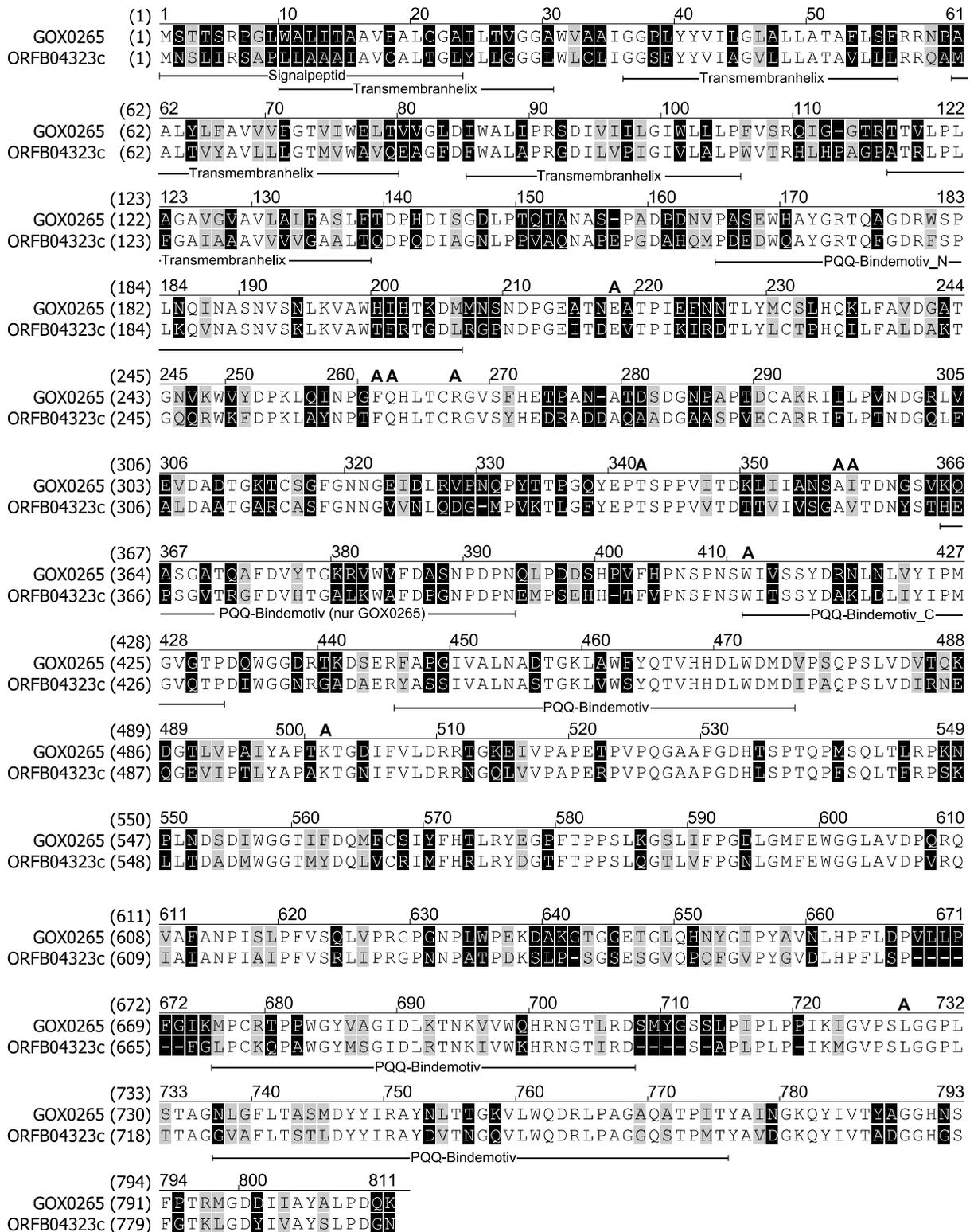


Abbildung 57: Sequenzvergleich der membranständigen Glucose-Dehydrogenase von *G. oxydans* (GOX0265) und der metagenomischen Glucose-Dehydrogenase mmGDH (ORFB04323c). Sequenzunterschiede schwarz hinterlegt, chemisch ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. A Aktives Zentrum nach CD-Modell cd10280. PQQ-Bindemotive mit Pfam, Signalpeptid mit SignalPHMM und Transmembranhelices mit TMHMM über InterProScan vorhergesagt

Ein wesentlich engeres Substratspektrum als die verwandte Dehydrogenase in *G. oxydans* hat msldAB.

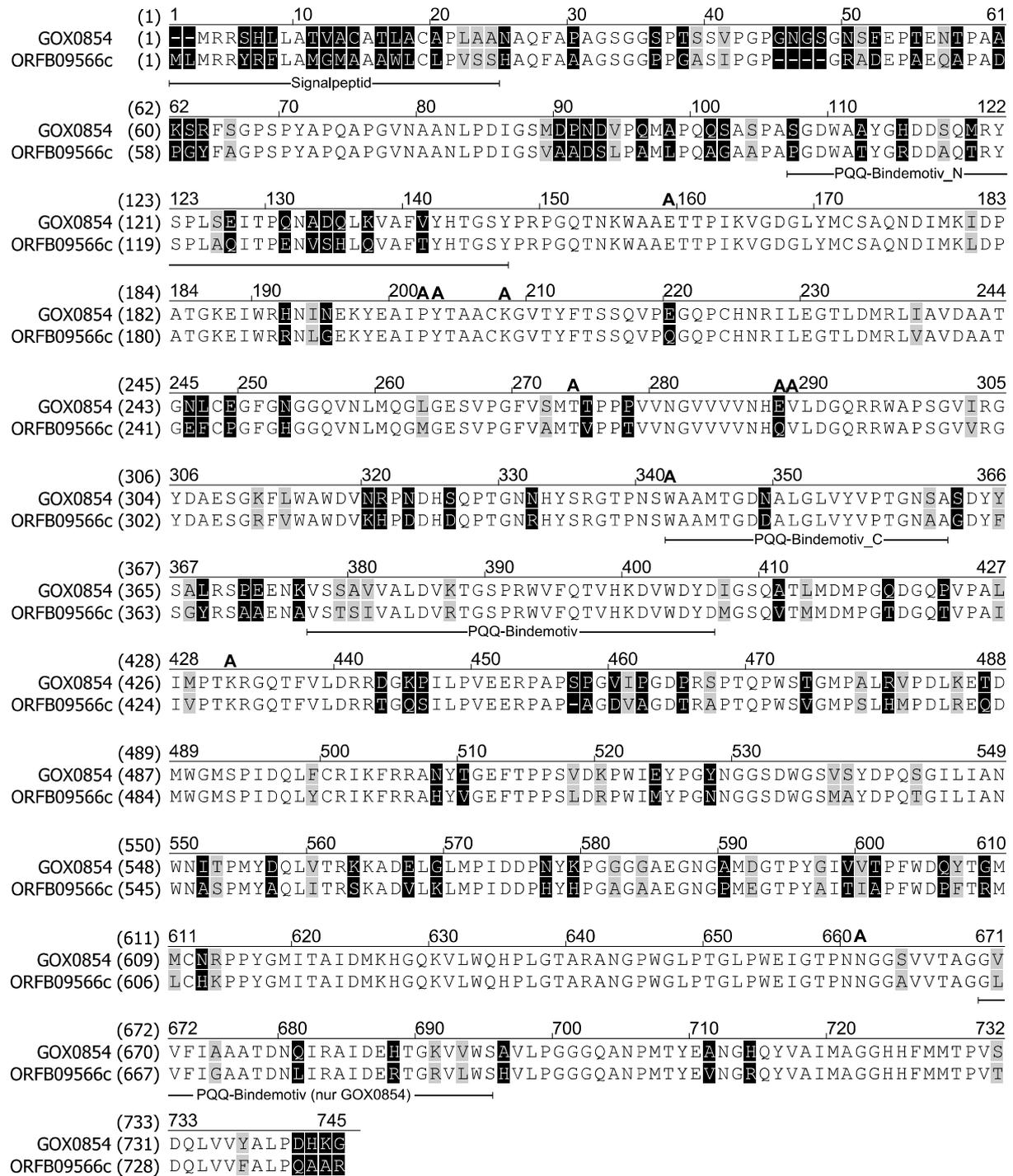


Abbildung 58: Sequenzvergleich der großen Untereinheit der membranständigen Polyol-Dehydrogenase von *G. oxydans* (GOX0854) und der größeren Untereinheit der metagenomischen Polyol-Dehydrogenase mmsldAB (ORFB09566c). Sequenzunterschiede schwarz hinterlegt, chemisch ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. A Aktives Zentrum nach CD-Modell cd10280. PQQ-Bindemotive mit Pfam, Signalpeptid mit SignalPHMM über InterProScan vorhergesagt

Sie oxidiert 1,2-Cyclopentandiol und D-Arabitol, auch Substrate der Polyol-Dehydrogenase von *G. oxydans* (GOX0854, GOX0855 bzw. *sldAB*), und ist zu 74 % identisch mit dieser. Allerdings diskriminiert sie zudem *trans*-1,2-Cyclohexandiol gegenüber *cis*-1,2-Cyclohexandiol, was für SldAB nicht beobachtet wurde, da sie beide Enantiomere gleichermaßen oxidiert. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Dehydrogenasen ist, dass die Hauptsubstrate der SldAB, Glycerin, D-Mannitol oder D-Sorbitol, von msldAB nicht oxidiert werden. Auch hier wurden wieder die Aminosäuresequenzen der beiden Dehydrogenasen verglichen. In Abbildung 58 sind die größeren Untereinheiten dargestellt, in Abbildung 59 die kleinen Untereinheiten. Es fällt auf, dass die meisten Unterschiede am Anfang des Signalpeptids und am Ende der großen Untereinheiten zu finden sind. In ORFB09566c findet man im Vergleich zu GOX0854 wieder eine Deletion bei Position 45. Ansonsten sind größere Blöcke mit Unterschieden in den Positionen 10-20, 90-100, um 460 und am C-terminalen Ende der Enzyme zu erkennen. Die Deletion könnte durch Fehlen eines Schleifenelements dieses Mal den Zugang für einige Substrate beschränken, wenn dadurch der Zugang kleiner wird.

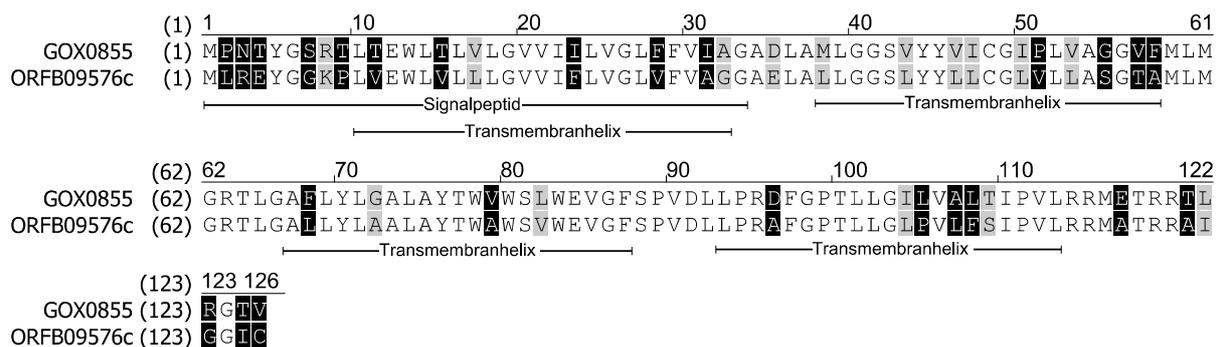


Abbildung 59: Sequenzvergleich der kleinen Untereinheit der membranständigen Polyol-Dehydrogenase von *G. oxydans* (GOX0855) und der kleineren Untereinheit der metagenomischen Polyol-Dehydrogenase mmsldAB (ORFB09576c). Sequenzunterschiede schwarz hinterlegt, chemisch ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Signalpeptid mit SignalPHMM und Transmembranhelices mit TMHMM konnten über InterProScan nur für ORFB09576c vorhergesagt werden.

Auch kann man erkennen, dass um die Position 460 viele Proline von GOX0854 durch andere Aminosäuren ausgetauscht wurden. Eventuell begünstigt dies die Bildung von ausgeprägten

Sekundärstrukturelementen, die dann das Substratspektrum begrenzen, da Prolin diese normalerweise unterbricht. Der genaue Zusammenhang müsste wieder durch zielgerichtete Mutationen untersucht werden. Ein Problem bei der *in silico*-Analyse war, dass für die kleine Untereinheit der SldAB (GOX0855) keine Vorhersagen der Transmembranhelices und des Signalpeptids mit InterProScan gemacht werden konnten. Da die Unterschiede allerdings nicht so zahlreich und gravierend sind, gehen wir davon aus, dass die Vorhersagen für die kleine Untereinheit der metagenomische Dehydrogenase auch für GOX0855 gelten könnten. Gleiches gilt für ein PQQ-Bindemotiv bei GOX0854 um Position 680, das für ORFB09566c nicht gefunden wurde.

Eine komplett neue Dehydrogenase scheint mPQQ4 zu sein. Sie ist zu 79 % mit der membranständigen PQQ abhängigen Dehydrogenase 4 von *G. oxydans* identisch, für die bisher kein einziges Substrat gefunden werden konnte (diese Arbeit und Mientus *et al.* (2013)). mPQQ4 hingegen zeigte Aktivitäten für viele einfache sekundäre Alkohole wie Isopropanol und 2-Hexanol, aber nicht für 3-Hexanol. Sie oxidierte außerdem Dirole wie 2,3-Butandiol oder 2,4-Pentandiol und Glycerinaldehyd. Wie auch schon msldAB, oxidierte sie cyclische Alkohole wie 1,2-Cyclopentandiol und diskriminierte die Oxidation von *trans*-1,2-Cyclohexandiol gegenüber *cis*-1,2-Cyclohexandiol. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sie alle Alkohole mit einer Alkoholgruppe an Position 2 oxidiert, sofern diese keine primäre Alkoholgruppe besitzen. Sogar ein sekundärer Alkohol mit einer großen Seitenkette wie 1-Cyclohexylethanol, der von keiner membranständigen Dehydrogenase in *G. oxydans* oxidiert wurde, wurde von dieser metagenomischen Dehydrogenase mit der höchsten Oxidationsaktivität umgesetzt. Interessant ist, dass dieses metagenomische Enzym zu 100 % identisch mit einem Protein ist, das als Glucose-, Methanol-Dehydrogenase Untereinheit 1 von *Acetobacter pasteurianus* NBRC 101655 (APT_2217) annotiert wurde. Dieser Stamm wurde während einer genomweiten phylogenetischen Analyse von Unterschieden in der Thermotoleranz innerhalb eng verwandter *Acetobacter pasteurianus*

Stämme von Matsutani *et al.* (2012) sequenziert. Das Gen wurde unter Vorlage des nahen Verwandten *Acetobacter pasteurianus* IFO3283-01 annotiert und ist ein Mitglied der membranständigen PQQ abhängigen Dehydrogenasen glucose/quininate/shikimate family (TIGR03074). Diese Familie wird wahrscheinlich nur deshalb so genannt, weil die membranständige Glucose-Dehydrogenase die am nächsten verwandte Dehydrogenase mit einem experimentell bestätigten Substratspektrum ist. Nach intensiven Recherchen konnten keine experimentellen Hinweise auf ein Substratspektrum für mPQQ4 ähnliche Proteine in der Literatur gefunden werden. Deswegen wird vorgeschlagen, solche Enzyme als sekundäre Alkohol-Dehydrogenasen zu bezeichnen. Bislang bleibt allerdings offen, warum die membranständige PQQ-abhängige Dehydrogenase 4 von *G. oxydans* 621H (GOX0516) nicht dasselbe Substratspektrum zeigt wie mPQQ4. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine ergab, wie in Abbildung 60 gezeigt, dass die PQQ abhängige Dehydrogenase 4 von *G. oxydans* (GOX0516) um Position 290 wieder einen Einschub von fünf Aminosäuren besitzt. Auch sind bei Position 270 zwei Aminosäuren mutiert, die laut einem Multialignment (cd10280) von verschiedenen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen als aktiv an der Bindung von PQQ und Calcium beteiligt gekennzeichnet sind. Diese zwei wohlmöglich funktionellen Aminosäuren, Asparaginsäure und Lysin, in mPQQ4 wurden durch zwei Alanine in GOX0516 ersetzt und verhindern eventuell deswegen eine Oxidation. Ansonsten fallen Unterschiede an Position 55 und um Position 125, 160, 210, 285, 380, 640, 650, 785 und am C-terminalen Ende auf. Wie schon bei den beiden vorherigen Aminosäuresequenzvergleichen können auch hier nach dem gegenwärtigen Stand der Arbeiten nur Vermutungen angestellt werden. Welche Aminosäuremutation schließlich die Oxidationen der getesteten sekundären Alkohole in der PQQ abhängigen Dehydrogenase 4 verhindert, müsste in gezielten Mutationen überprüft werden.

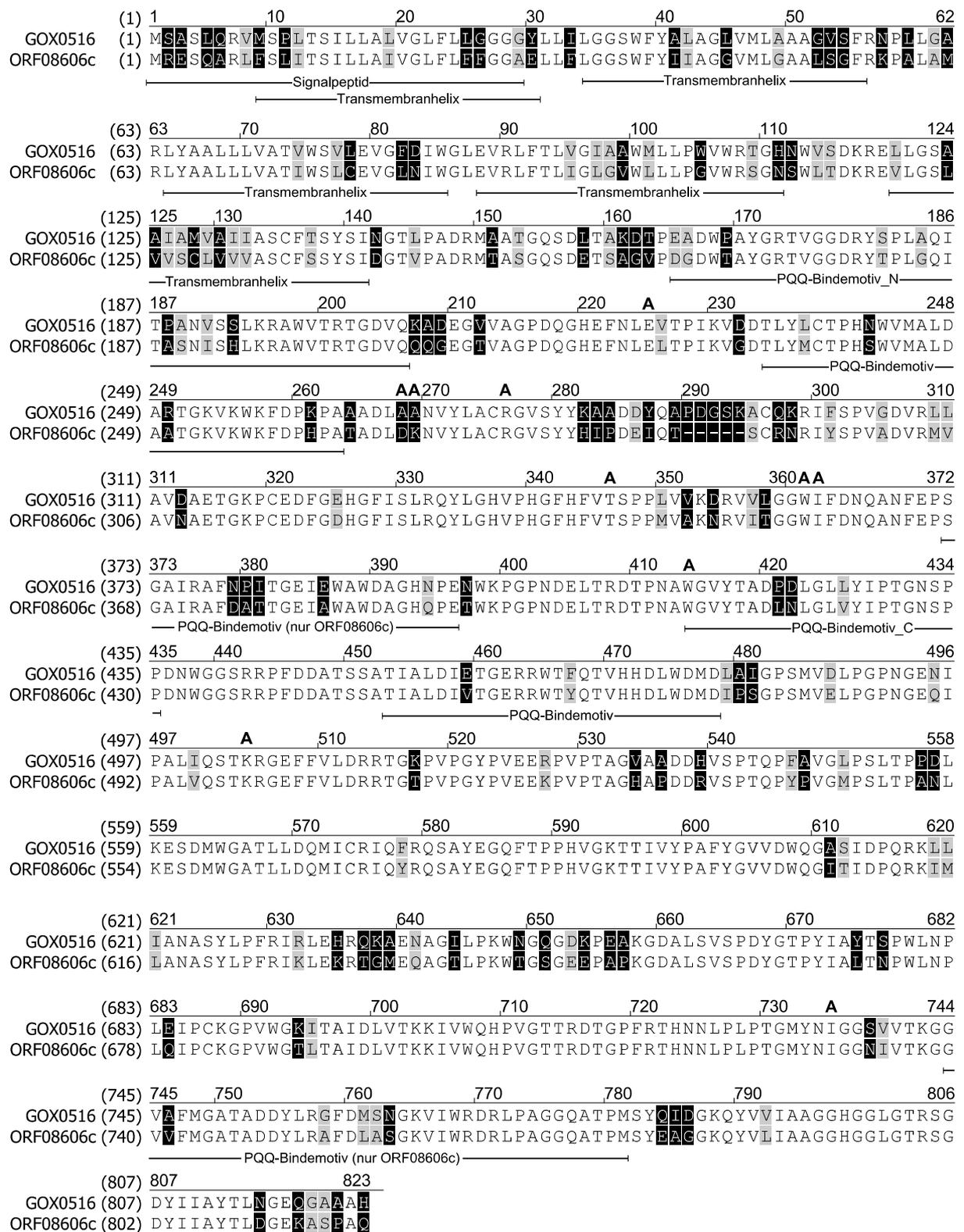


Abbildung 60: Sequenzvergleich der PQQ abhängigen Dehydrogenase 4 von *G. oxydans* (GOX0516) und der metagenomischen PQQ4 ähnlichen Dehydrogenase mmPQQ4 (ORF08606c). Sequenzunterschiede schwarz hinterlegt, chemisch ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. A Aktives Zentrum nach CD-Modell cd10280. PQQ-Bindemotive mit Pfam, Signalpeptid mit SignalPHMM und Transmembranhelices mit TMHMM über InterProScan vorhergesagt

4.3. Acetatstoffwechsel von *G. oxydans* 621H

Während die membranständigen Dehydrogenasen bei *Gluconobacter* stereo- und regioselektive Oxidationen unter Erhalt des Kohlenstoffgerüsts durchführen, ist der Organismus nur zu einer sehr eingeschränkten unvollständigen Oxidation von Substraten über den zellulären Energiestoffwechsel fähig. Zur Untersuchung des Acetatstoffwechsels sollte mit Hilfe einer Pyruvat-Decarboxylase-(PDC)-Mutante, einer Acetyl-CoA-Synthetase-(ACS)-Mutante und weiteren Acetaldehyd-Dehydrogenasemutanten untersucht werden, inwiefern Acetat, wie angenommen über das ungewöhnliche Enzym PDC oder doch auch über andere Enzyme in *G. oxydans* gebildet wird. Pyruvat, welches das Endprodukt des Hexosenabbaus darstellt und in *G. oxydans* vorwiegend über den oxidativen Pentose-Phosphatweg gebildet wird (Richhardt *et al.* 2012), kann zu Acetaldehyd decarboxyliert und anschließend zu Acetat oxidiert werden (King und Cheldelin 1954; Adachi 1980). In anderen Organismen sind die PDCs Teil der Ethanolfermentation und spielen eigentlich keine Rolle im oxidativen Metabolismus (Neale *et al.* 1987; Lowe und Zeikus 1992). Da *G. oxydans* ein obligat aerobes Bakterium ist und kein Ethanol produziert, muss die Funktion der PDC in diesem Organismus eine andere sein. Da weder eine Phosphotransacetylase, oder eine Acetat-Kinase, noch eine Pyruvatquinon-Oxidoreduktase im Genom von *G. oxydans* 621H vorhanden ist (Prust *et al.* 2005), hat der Organismus theoretisch nur eine andere Möglichkeit Acetat aus Pyruvat zu produzieren. Wie in Abbildung 61 gezeigt, könnte Pyruvat zu Acetat metabolisiert werden, indem es durch den Pyruvat-Dehydrogenasekomplex (GOX2289 und GOX2292) zu Acetyl-CoA oxidativ decarboxyliert und anschließend durch die ACS (GOX0413) zu Acetat weiter verstoffwechselt wird. Dabei würde ein ATP generiert werden. Es konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine ACS-Mutante weiterhin dieselbe Menge an Acetat produziert wie der Wildtyp während eine PDC-Mutante kein Acetat mehr produziert, sondern Pyruvat akkumuliert (siehe 3.6.2). Deswegen kann die Acetatbildung über Acetyl-CoA

ausgeschlossen werden, da sogar eine Pyruvatakkumulation der Acetatbildung über Acetyl-CoA vorgezogen wird.

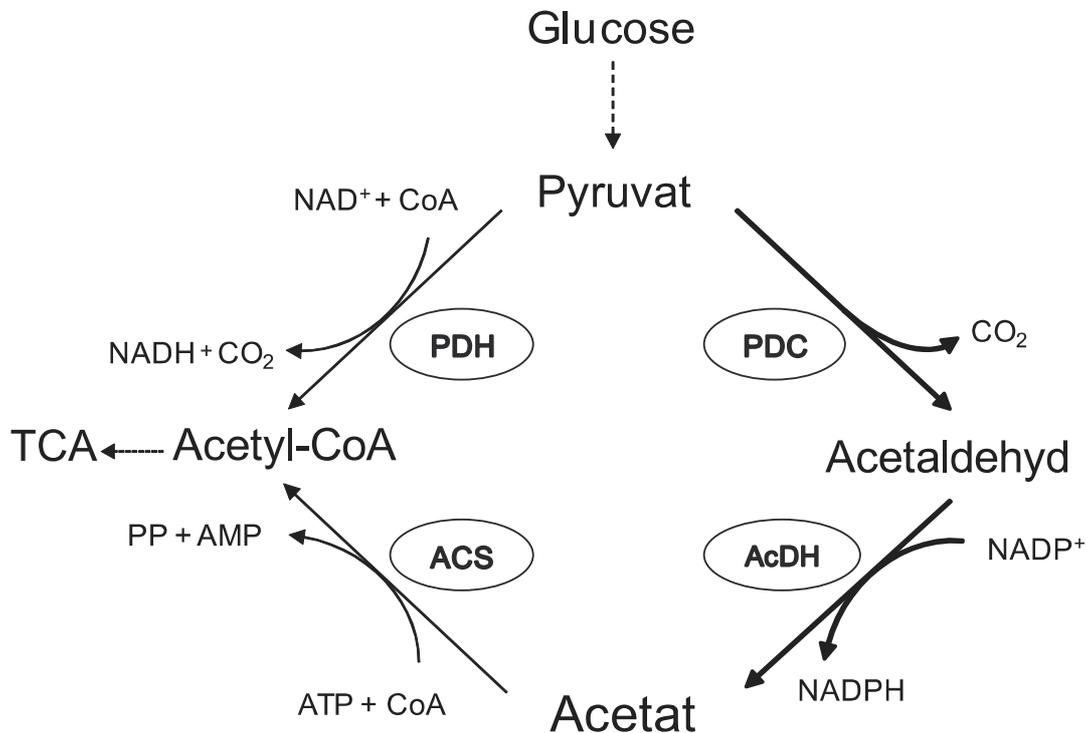


Abbildung 61: Pyruvat- und Acetatmetabolismus in *G. oxydans* (siehe auch Peters *et al.* (2013a)). TCA Citratzyklus, PDC Pyruvat-Decarboxylase, PDH Pyruvat-Dehydrogenase, ACS Acetyl-CoA-Synthetase, AcDH Acetaldehyd-Dehydrogenasen.

Die ACS wird deswegen wahrscheinlich nur zur biosynthetischen Assimilation von Acetat durch *G. oxydans* benutzt. Da während aller Versuche ein Komplexmedium verwendet wurde, konnte ein entsprechender Phänotyp nicht beobachtet werden. Durch die Oxidation von Acetaldehyd durch die Acetaldehyd-Dehydrogenasen GOX1122 (Schweiger *et al.* 2007) und GOX2018 (Krajewski *et al.* 2010) zu Acetat wird NADPH generiert. Für *G. oxydans* könnte die Generierung von NADPH für Biosynthesen der Hauptnutzen dieses bevorzugten Stoffwechselweges sein. Wir vermuten allerdings, dass die vermiedene Acetaldehydbildung in der PDC-Mutante der Grund für die höhere finale Zelldichte ist, da Acetaldehyd ein potentiell toxisches Zwischenprodukt ist (Adachi 1980). Da in dieser Arbeit ausschließlich Komplexmedien verwendet wurden und somit benötigte Stoffe einfach aus dem Medium aufgenommen werden können, spielen Biosynthesen durch die Zellen eine eher

untergeordnete Rolle. Deswegen nehmen wir an, dass der fehlende toxische Effekt des Acetaldehyds in der PDC Mutante den Nachteil der geringeren NADPH-Synthese aufhebt. Acetaldehyd scheint ein wichtiges Problem für *G. oxydans* darzustellen, da ein membranständiges und acht cytoplasmatische Enzyme im Genom von *G. oxydans* 621H annotiert wurden, die Acetaldehyd abbauen können (Prust *et al.* 2005). Da die Deletion von zwei dieser Acetaldehyd-Dehydrogenasen die Acetatproduktion nicht verringerte, vermuten wir, dass mehrere Acetaldehyd-Dehydrogenasen den Verlust eines Enzyms ohne sichtbaren Phänotyp kompensieren können. Die Vorstellung, dass Acetaldehyd das Wachstum inhibiert, würde auch erklären, warum ein stark verbesserter Zellertrag vom Multideletionsstamm BP.9 im Vergleich zum Wildtyp auf Fructose mit 10 mM Ethanol beobachtet wurde (siehe 3.2.1). Dieser Zellertrag ist gemäß den oben geschilderten Überlegungen wahrscheinlich auf die fehlende Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd zurückzuführen, da dieser Effekt bereits bei BP.1 sichtbar ist (nicht gezeigt). In *Acetobacter pasteurianus* wurde ebenfalls eine PDC nachgewiesen, welche Pyruvat vorwiegend während der oxidativen Verstoffwechslung von Lactat oxidiert (Chandra Raj *et al.* 2001). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist *G. oxydans* in der Lage L-Lactat zu Acetat zu konvertieren, kann aber gleichzeitig auf Grund der fehlenden Gluconeogenese (Prust *et al.* 2005; Deppenmeier und Ehrenreich 2009) dabei nicht wachsen. Der Stamm 621H ohne das *pdh*-Gen akkumuliert Pyruvat in Anwesenheit von L-Lactat (siehe 3.6.2.2). Das beweist, dass L-Lactat auch in *G. oxydans* über Pyruvat und Acetaldehyd zu Acetat metabolisiert wird. Eine fehlende PDC-Aktivität in *A. pasteurianus* Zellen während des Wachstums auf Mannitol (Chandra Raj *et al.* 2001) konnte bei *G. oxydans* allerdings nicht beobachtet werden. *G. oxydans* produziert Acetat über die PDC aus Mannitol, Fructose oder L-Lactat. Die hohe Akkumulation von Pyruvat auf diesen Substraten unter Verwendung der PDC-Mutante könnte zur biotechnologischen Produktion von Pyruvat genutzt werden. Die biotechnologische Produktion wurde als kostengünstige Alternative zu traditionellen chemischen Methoden beschrieben (Xu *et al.* 2008). Die

Tatsache, dass *G. oxydans* 621H wenig Biomasse auf Mannitol und Fructose bzw. keine Biomasse auf L-Lactat bildet, ist eine gute Voraussetzung für eine Ganzzellbiokatalyse von Pyruvat aus diversen Kohlenstoffquellen.

5. Zusammenfassung

Zur Expression metagenomischer, membranständiger Dehydrogenasen wurden im *Gluconobacter oxydans* Stamm 621H mit Hilfe eines markerlosen Deletionssystems alle bereits bekannten membranständigen Dehydrogenasen und zwei nicht charakterisierten membranständigen Dehydrogenasen deletiert. Dieser Multideletionsstamm konnte wider Erwarten mit einem verbesserten Zellertrag auf Fructose als Kohlenstoffquelle kultiviert werden, weswegen diese als Standardkohlenstoffquelle für spätere Experimente etabliert wurde. Dieser Stamm wies zuletzt lediglich eine Oxidationsaktivität für L-Lactat und 2-Hydroxybuttersäure auf, deren Ursache auch durch Deletion verschiedener putativer Lactat-Dehydrogenasen nicht geklärt werden konnte. Weitere vermutete membranständige Dehydrogenasen im Genom von *G. oxydans* 621H konnten nicht bestätigt werden. Die Substratspektren aller bekannten Dehydrogenasen konnten allerdings durch einen in dieser Arbeit entwickelten DCPIP-Assay für ganze Zellen, der den Zeitaufwand zur Bestimmung der Substratspektren stark verringerte, bestätigt und erweitert werden. Anschließend wurde der Multideletionsstamm zusammen mit einem in der Arbeitsgruppe etablierten Expressionsvektor dazu verwendet, mit einer *in silico*-Methode identifizierte, membranständige Dehydrogenasen aus einem Essigmuttermetagenom zu exprimieren und *in vivo* zu charakterisieren. Auch wenn die Diversität dieses Metagenoms im Vergleich zu anderen Metagenomen eher gering ausfiel, konnten sechs Dehydrogenasen erfolgreich exprimiert und charakterisiert werden. Drei dieser Dehydrogenasen zeigten erweiterte, verringerte oder aber auch komplett neue Substratspektren gegenüber den bekannten Dehydrogenasen von *G. oxydans*. Ein der Polyol-Dehydrogenase ähnliches Enzym wies lediglich Oxidationsaktivitäten für zyklische Alkohole und D-Arabitol auf. Das Substratspektrum einer metagenomischen Glucose-Dehydrogenase zeigte ein um Aldopentosen und -heptosen erweitertes Spektrum. Außerdem konnte eine komplett neue

sekundäre Alkohol-Dehydrogenase beschrieben werden, die der PQQ abhängigen Dehydrogenase 4 von *G. oxydans* am ähnlichsten war. Sie oxidierte auch Substrate, die von keiner Dehydrogenase aus *G. oxydans* oxidiert wurden. Neben diesen Erkenntnissen über membranständige Dehydrogenasen konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die Pyruvat-Decarboxylase eindeutig für die gesamte Acetatproduktion in *G. oxydans* verantwortlich ist. Ein PDC-Deletionsstamm akkumulierte große Mengen an Pyruvat und bildete kein Acetat mehr.

Sowohl die Expression von metagenomischen Dehydrogenasen mit neuen Substratspektren als auch die Pyruvatakkumulation der PDC-Mutante zeigten deutlich das große biotechnologische Potential von *G. oxydans*. Weitere Experimente mit metagenomischen oder mit gezielt- bzw. zufällig-veränderten Dehydrogenasen scheinen sehr vielversprechend zu sein, um neue Anwendungsgebiete für *G. oxydans* in der weißen Biotechnologie zu finden.

6. Literaturverzeichnis

- Adachi O, Fujii Y, Ghaly MF, Toyama H, Shinagawa E und Matsushita K (2001) Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 65:2755–2762.
- Adachi O, Tayama K, Shinagawa E, Matsushita K und Ameyama M (1978) Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* 42:2045-2056.
- Adachi OT, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Ameyama, M. (1980) Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* 44:503–515.
- Adlercreutz P (1989) Oxidation of *trans* - and *cis* -1,2-cyclohexanediol by *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:257-263. doi:10.1007/bf00256215
- Alauzet C, Teyssier C, Jumas-Bilak E, Gouby A, Chiron R, Rabaud C, Counil F, Lozniewski A und Marchandin H (2010) *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *J Clin Microbiol* 48:3935–3942. doi:10.1128/jcm.00767-10
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amann RI, Ludwig W und Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.
- Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K und Adachi O (1981) D-Glucose Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, Purification and Characterization. *Agric Biol Chem* 45:851-861.
- Arcus AC und Edson NL (1956) Polyol dehydrogenases. 2. The polyol dehydrogenases of *Acetobacter suboxydans* and *Candida utilis*. *Biochem J* 64:385-394.
- Batthey AS und Schaffner DW (2001) Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *J Appl Microbiol* 91:237–247.
- Bertrand G (1898) Recherches sur la production biochimique du sorbes. *Annales de l'Institut Pasteur* 6:385-399.
- Bertrand G (1904) Sur un nouveau sucre des baies de sorbier. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 20:802-805.
- Bories A, Claret C und Soucaille P (1991) Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem* 26:243-248. doi:10.1016/0032-9592(91)85006-a
- Boyer HW und Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41:459–472.
- Buchert J (1991) A xylose-oxidizing membrane-bound aldose dehydrogenase of *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *J Biotechnol* 18:103-113. doi:10.1016/0168-1656(91)90239-r

- Buchert J und Viikari L (1988) Oxidative d-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:375-379. doi:10.1007/bf00265822
- Chandra Raj K, Ingram LO und Maupin-Furlow JA (2001) Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Arch Microbiol* 176:443–451. doi:10.1007/s002030100348
- Chinnawirotpisan P, Theeragool G, Limtong S, Toyama H, Adachi OO und Matsushita K (2003) Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *J Biosci Bioeng* 96:564–571. doi:10.1016/s1389-1723(04)70150-4
- Cleton-Jansen AM, Dekker S, van de Putte P und Goosen N (1991) A single amino acid substitution changes the substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans*. *Mol Gen Genet* 229:206–212.
- Curtis TP, Sloan WT und Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10494-10499. doi:10.1073/pnas.142680199
- De Ley J, Swings J und Gossele F (1984). The genus *Gluconobacter*. In: Krieg N und Holt J (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp 267-278
- Deppenmeier U und Ehrenreich A (2009) Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:69–80. doi:10.1159/000142895
- Deppenmeier U, Hoffmeister M und Prust C (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:233–242. doi:10.1007/s00253-002-1114-5
- Dewanti AR und Duine JA (1998) Reconstitution of membrane-integrated quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme with PQQ and the holoenzyme's mechanism of action. *Biochemistry* 37:6810-6818. doi:10.1021/bi9722610
- Duine JA (1999) The PQQ story. *J Biosci Bioeng* 88:231-236.
- Dym O, Pratt EA, Ho C und Eisenberg D (2000) The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9413–9418.
- Entani E, Ohmori S, Masai H und Suzuki K-I (1985) *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31:475-490.
- Euzeby J (2005) Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:983-985. doi:10.1099/ijs.0.63767-0
- Figurski DH und Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1648–1652.
- Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR und Bateman A (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 38:D211-222. doi:10.1093/nar/gkp985
- Gatsos X, Perry AJ, Anwari K, Dolezal P, Wolyneć PP, Likić VA, Purcell AW, Buchanan SK und Lithgow T (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32:995–1009. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00130.x

- Goldberg JB und Ohman DE (1984) Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J Bacteriol* 158:1115-1121.
- Greenfield S und Claus GW (1972) Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J Bacteriol* 112:1295-1301.
- Gullo M, Caggia C, Vero Ld und Giudici P (2006) Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *Int J Food Microbiol* 106:209-212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.024
- Gupta A, Singh VK, Qazi GN und Kumar A (2001) *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:445-456.
- Habe H, Fukuoka T, Morita T, Kitamoto D, Yakushi T, Matsushita K und Sakaki K (2010) Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 74:1391-1395.
- Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Matsushita K und Sakaki K (2009) Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Appl Environ Microbiol* 75:7760-7766. doi:10.1128/AEM.01535-09
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J und Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5:R245-249.
- Hann RM, Tilden EB und Hudson CS (1938) The Oxidation of Sugar Alcohols by *Acetobacter suboxydans*. *J Am Chem Soc* 60:1201-1203. doi:10.1021/ja01272a058
- Hekmat D, Bauer R und Fricke J (2003) Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess Biosystems Eng* 26:109-116. doi:10.1007/s00449-003-0338-9
- Hoffmeister M (2006) Untersuchungen zur Physiologie des Essigsäurebakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen
- Hölscher T und Görisch H (2006) Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol* 188:7668-7676. doi:10.1128/jb.01009-06
- Hölscher T, Weinert-Sepalage D und Görisch H (2007) Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* 153:499-506. doi:10.1099/mic.0.2006/002196-0
- Hommes RWJ, Postma PW, Neijssel OM, Tempest DW, Dokter P und Duine JA (1984) Evidence of a quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme in several strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 24:329-333.
- Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh HJ, Weber N und Schuster SC (2011) Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res* 21:1552-1560. doi:10.1101/gr.120618.111

- Ilabaca C, Navarrete P, Mardones P, Romero J und Mas A (2008) Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int J Food Microbiol* 126:245–249. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.001
- Junker A (2012) Untersuchung des Zentralstoffwechsels von *Gluconobacter oxydans* durch die Etablierung eines markerfreien Deletionssystems. Dissertation, Technische Universität München
- Kerstens K und Ley Jd (1968) The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 34:393–408.
- King TE und Cheldelin VH (1954) Pyruvic carboxylase of *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* 208:821-831.
- Kitos PA, Wang CH, Mohler BA, King TE und Cheldelin VH (1958) Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J Biol Chem* 233:1295–1298.
- Kondo K und Horinouchi S (1997) Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Appl Environ Microbiol* 63:1131–1138.
- König S (1998) Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochim Biophys Acta* 1385:271-286.
- Krajewski V, Simic P, Mouncey NJ, Bringer S, Sahn H und Bott M (2010) Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans*: improvement of growth rate and growth yield from glucose by elimination of gluconate formation. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/aem.03022-09
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G und Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Landis BH, McLaughlin JK, Heeren R, Grabner RW und Wang PT (2002) Bioconversion of N-Butylglucamine to 6-Deoxy-6-butylamino Sorbose by *Gluconobacter oxydans*. *Organic Process Research & Development* 6:547-552. doi:10.1021/op0255128
- Leipold D und Peter S (1994) Alkoholfreies Erfrischungsgetränk. DE000004406087C1
- Leis B, Angelov A und Liebl W (2013) Screening and expression of genes from metagenomes. *Adv Appl Microbiol* 83:1-68. doi:10.1016/B978-0-12-407678-5.00001-5
- Leisinger T (1965) Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Eissigsäurebakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie* 119:329–376.
- Levering PR, Weenk G, Olijve W, Dijkhuizen L und Harder W (1988) Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621-H. *Arch Microbiol* 149:534-539. doi:10.1007/bf00446757
- Lowe SE und Zeikus JG (1992) Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from *Sarcina ventriculi*. *J Gen Microbiol* 138:803-807.
- Ludwig W, Oliver Glöckner F und Yilmaz P (2011). The Use of rRNA Gene Sequence Data in the Classification and Identification of Prokaryotes. In: Rainey FA und Oren A (ed) *Taxonomy of prokaryotes*, 1. Academic Press, Amsterdam ;, Boston, pp 349–384

- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, Konig A, Liss T, Lussmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A und Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32:1363-1371. doi:10.1093/nar/gkh293
- Ma C, Gao C, Qiu J, Hao J, Liu W, Wang A, Zhang Y, Wang M und Xu P (2007) Membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities of a newly isolated *Pseudomonas stutzeri* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:91-98. doi:10.1007/s00253-007-1132-4
- Madigan MT, Martinko JM, Brock TD und Thomm M (2006) Brock Mikrobiologie. Pearson Education,
- Mamlouk D, Hidalgo C, Torija MJ und Gullo M (2011) Evaluation and optimisation of bacterial genomic DNA extraction for no-culture techniques applied to vinegars. *Food Microbiol* 28:1374-1379. doi:10.1016/j.fm.2011.06.009
- Matsushita K, Fujii Y, Ano Y, Toyama H, Shinjoh M, Tomiyama N, Miyazaki T, Sugisawa T, Hoshino T und Adachi O (2003) 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl Environ Microbiol* 69:1959–1966.
- Matsushita K, Toyama H und Adachi O (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* 36:247–301.
- Matsutani M, Hirakawa H, Saichana N, Soemphol W, Yakushi T und Matsushita K (2012) Genome-wide phylogenetic analysis of differences in thermotolerance among closely related *Acetobacter pasteurianus* strains. *Microbiology* 158:229-239. doi:10.1099/mic.0.052134-0
- Meyer M, Schweiger P und Deppenmeier U (2012) Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s00253-012-4265-z
- Mientus M, Peters B, Liebl W und Ehrenreich A (2013) Promoters of membrane bound dehydrogenases and their ability in a new expression system. In Vorbereitung
- Mullis KB und Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335–350.
- Neale AD, Scopes RK, Wettenhall RE und Hoogenraad NJ (1987) Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:1024-1028.
- Olijve W und Kok JJ (1979) An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Arch Microbiol* 121:291-297. doi:10.1007/bf00425070
- Onufryk C, Crouch ML, Fang FC und Gross CA (2005) Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon. *J Bacteriol* 187:4552-4561. doi:10.1128/JB.187.13.4552-4561.2005
- Pasteur L (1864) Memoire sur la fermentatione acetique. *Ann Sci ENS Paris* 1:113-158.
- Pecoraro V, Zerulla K, Lange C und Soppa J (2011) Quantification of ploidy in proteobacteria revealed the existence of monoploid, (mero-)oligoploid and polyploid species. *PLoS One* 6:e16392. doi:10.1371/journal.pone.0016392

- Peters B, Junker A, Brauer K, Muhlthaler B, Kostner D, Mientus M, Liebl W und Ehrenreich A (2013a) Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2521-2530. doi:10.1007/s00253-012-4354-z
- Peters B, Mientus M, Kostner D, Junker A, Liebl W und Ehrenreich A (2013b) Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Appl Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s00253-013-4824-y
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G und Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786. doi:10.1038/nmeth.1701
- Pronk JT, Levering PR, Olijve W und van Dijken JP (1989) Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol* 11:160-164. doi:10.1016/0141-0229(89)90075-6
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J und Glockner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188-7196. doi:10.1093/nar/gkm864
- Prust C (2004) Entschlüsselung des Genoms von *Gluconobacter oxydans* 621H – einem Bakterium von industriellem Interesse. Ph.D.-thesis, Georg-August-Universität zu Göttingen
- Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, Wiezer A, Fricke WF, Ehrenreich A, Gottschalk G und Deppenmeier U (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat Biotechnol* 23:195–200. doi:10.1038/nbt1062
- Reichstein T und Grüssner A (1934) Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv Chim Acta* 17:311-328.
- Rice P, Longden I und Bleasby A (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16:276-277.
- Richhardt J, Bringer S und Bott M (2012) Mutational Analysis of the Pentose Phosphate and Entner-Doudoroff Pathways in *Gluconobacter oxydans* Reveals Improved Growth of a Δ edd Δ eda Mutant on Mannitol. *Appl Environ Microbiol* 78:6975-6986. doi:10.1128/AEM.01166-12
- Ruiz N, Falcone B, Kahne D und Silhavy TJ (2005) Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* 121:307-317. doi:10.1016/j.cell.2005.02.014
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA und Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16:944-945.
- Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, Imao Y, Akashi T, Yoshikawa K, Noguchi Y, Soeda S, Yoshida M, Niwa M, Hosoda J und Shimomura K (1997) Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl Environ Microbiol* 63:454–460.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- Schedel M (2000). Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, a key reaction in the industrial synthesis of 1-deoxynjirimycin. In: Kelly D (ed) *Biotechnology*, Wiley-VCH, Weinheim, pp 296–308

- Schloss PD und Handelsman J (2005) Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* 6:229. doi:10.1186/gb-2005-6-8-229
- Schmeisser C, Steele H und Streit WR (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:955–962. doi:10.1007/s00253-007-0945-5
- Schweiger P, Volland S und Deppenmeier U (2007) Overproduction and characterization of two distinct aldehyde-oxidizing enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:147–155. doi:10.1159/000103606
- Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O und Ameyama M (1982) Purification and Characterization of D-Sorbitol Dehydrogenase from Membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. α . *Agric Biol Chem* 46:135-141.
- Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O und Ameyama M (1984) D-Gluconate Dehydrogenase, 2-Keto-D-gluconate Yielding, from *Gluconobacter dioxyacetonicus*: Purification and Characterization. *Agric Biol Chem* 48:1517-1522.
- Shinagawa E, Matsushita K, Toyama H und Adachi O (1999) Production of 5-keto-d-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound d-gluconate dehydrogenase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6:341-350. doi:10.1016/s1381-1177(98)00112-x
- Shinjoh M, Tomiyama N, Asakura A und Hoshino T (1995) Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Environ Microbiol* 61:413–420.
- Sievers M, Sellmer S und Teuber M (1992) *Acetobacter europaeus* sp. nov., a Main Component of Industrial Vinegar Fermenters in Central Europe. *Syst Appl Microbiol* 15:386-392. doi:10.1016/s0723-2020(11)80212-2
- Soemphol W, Adachi O, Matsushita K und Toyama H (2008) Distinct physiological roles of two membrane-bound dehydrogenases responsible for D-sorbitol oxidation in *Gluconobacter frateurii*. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 72:842-850.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.
- Tillett D und Neilan BA (1999) Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites. *Nucleic Acids Res* 27:e26.
- Toyama H, Soemphol W, Moonmangmee D, Adachi O und Matsushita K (2005) Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-sorbitol dehydrogenase from thermotolerant *Gluconobacter frateurii* isolated from Thailand. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 69:1120–1129.
- Trifonov A, Stefanova S, Konstantinov H und Tepavicharova I (1991) Biochemical oxidation of d-sorbitol to l-sorbose by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells. *Appl Biochem Biotechnol* 28-29:397-405. doi:10.1007/bf02922619
- Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS und Banfield JF (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43. doi:10.1038/nature02340
- Velizarov S und Beschkov V (1994) Production of free gluconic acid by cells of *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Lett* 16:715-720. doi:10.1007/bf00136477

- Voss J, Ehrenreich A und Liebl W (2010) Characterization and inactivation of the membrane-bound polyol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 7145 reveals a role in *meso*-erythritol oxidation. *Microbiology* (Reading, England) doi:10.1099/mic.0.037598-0
- Vostiar I, Ferapontova EE und Gorton L (2004) Electrical “wiring” of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte. *Electrochemistry Communications* 6:621-626. doi:10.1016/j.elecom.2004.04.017
- Wach A (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* 12:259–265. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19960315)12:3<259::AID-YEA901>3.0.CO;2-C
- Wu J, Gullo M, Chen F und Giudici P (2010) Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Curr Microbiol* 60:280–286. doi:10.1007/s00284-009-9538-0
- Xu P, Qiu J, Gao C und Ma C (2008) Biotechnological routes to pyruvate production. *J Biosci Bioeng* 105:169–175. doi:10.1263/jbb.105.169
- Yamada Y, Hosono R, Lisdyanti P, Widyastuti Y, Saono S, Uchimura T und Komagata K (1999) Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of general and applied microbiology* 45:23–28.
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ und Brinkman FS (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26:1608-1615. doi:10.1093/bioinformatics/btq249
- Zdobnov EM und Apweiler R (2001) InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17:847-848.

7. Anhang

Tabelle 12: Weitere während dieser Arbeit konstruierte aber nicht näher analysierte Deletiosmutanten

Name	Deletierte Dehydrogenasen	Beschreibung
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ slmA Δ sldB	Δ slmA Δ sldB	Einfachdeletion der Polyol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX1857	Δ GOX1857	Einfachdeletion der Inositol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587	Δ GOX0585 Δ GOX0586 Δ GOX0587	Einfachdeletion der membranständigen Aldehyd-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232	Δ GOX1230 Δ GOX1231 Δ GOX1232	Deletion der Gluconate-2-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX0265	Δ GOX0265	Deletion der membranständigen PQQ-abhängigen Glucose-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097	Δ GOX2094 Δ GOX2095 Δ GOX2096 Δ GOX2097	Deletion der membranständigen Sorbitol-Dehydrogenase
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX1441	Δ GOX1441	Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 3
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX0516	Δ GOX0516	Deletion der PQQ-abhängigen Dehydrogenase 4
<i>G. oxydans</i> Δ upp Δ GOX1253	Δ GOX1253	Deletion der D-Lactat-Dehydrogenase

Tabelle 13: Konstruktionsprimer für Deletionsplasmide

Gen(e)	Primer-ID	Sequenz
GOX1081	1081_Sall_F	TGCGTCGACTCGTCTGGGCGATTTCATGC
	1081_Fus_R	CCTGAGGTACTGAAATCATGACAAAGCGTCTGATCCTTCC
	1081_Fus_F	GGAAGGATCAGACGCTTTGTTCATGATTTTCAGTACCTCAGG
	1081_PstI_R	GCACTGCAGAGGCATGAGACCTACCTGAT
GOX1122	up_GOX1122_fwd	AGCTCTAGACGGCGGATGAGCTTGGCTGG
	up_GOX1122_rev	CGAAGAAGCCCGATACGCATCAAGACGAGTCATGTTCCCTATGT
	do_GOX1122_fwd	ACATAGGAACATGACTCGTCTTGATGCGTATCGGGCTTCTTCG
	do_GOX1122_rev	TCAGAATTCTTGCCGGGAAACGCGCCTT
GOX2018	up_GOX2018_fwd	AGCTCTAGAGTTGCAGGAGGTTCGCGCTCG
	up_GOX2018_rev	CCAGAACCTCGATATCGGACACGCAACATCACTCTCCTCTGAAA
	do_GOX2018_fwd	TTTCAGAGGAGAGTGATGTTGCGTGTCCGATATCGAGGTTCTGG
	do_GOX2018_rev	TCAGAATTCGCCGCCGTCGCGCAGAAAC

Gen(e)	Primer-ID	Sequenz
GOX0413	up_GOX0413_fwd	AGCTCTAGAGGCTGGTGGCCGGACGACG
	up_GOX0413_rev	TGAACCTGTGAGGGCTGACAGAGGACCTGAAACCTTACGCACGAAA
	do_GOX0413_fwd	TTTCGTGCGTAAGGTTTCAGGTCCTCTGTGACCCCTGACAGGGTTCA
	do_GOX0413_rev	AGCTCTAGATTTCCCCTTCAGTCTCGACCCG
GOX1067	up_GOX1068-7_fwd	AGCTCTAGAACTGATCCACGATCAGCACG
GOX1068	up_GOX1068-7_rev	ACTGACAGGGGTGGGACGCGATCCAAGTGTCTTTTTGT
	do_GOX1068-7_fwd	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGCGTCCCCACCCCTGTCAGT
	do_GOX1068-7_rev	TCAGAATTCCTTCGATCTCGTCTTCGGTTTCG
GOX1857	up_GOX1857_fwd	AGCTCTAGAAAGCTCCGCAATCGCCGTGC
	up_GOX1857_rev	CTTTCTGTTCTGCGCTCTGGGACGGCTCCTGCGCA
	do_GOX1857_fwd	TGCGCAGGAGGCCTGCCAAGAGCGCAGAACCAGGAAAAAG
	do_GOX1857_rev	TCAGAATTCGTGAGACAATTGTCAGAGTAAGA
GOX0585	up_GOX0585-7_fwd	AGCTCTAGATGGTCCATTGGATCGGCAAG
GOX0586	up_GOX0585-7_rev	GTCGTGATGTGCGGGCTGGATTGCCACAAAAGGTGGCAGT
GOX0587	do_GOX0585-7_fwd	ACTGCCACCTTTTGTGGCAATCCAGCCCGCACATCACGAC
	do_GOX0585-7_rev	TCAGAATTCCTGCCGGTCTGCGCTACGG
GOX2094	up_GOX2094-7_fwd	AGCTCTAGACCTTATGCCGCGATCTTCAA
GOX2095	up_GOX2094-7_rev	CTGCGCGGAACGGGACGGCGGTAAAATCACTCTTCGCATA
GOX2096	do_GOX2094-7_fwd	TATGCGAAGAGTGATTTTACCGCCTGCCCGTCCGCGCAG
GOX2097	do_GOX2094-7_rev	TCAGAATTCAGGCAGGTCCAGAT
GOX1230	up_GOX1230-2_fwd	AGCTCTAGAAAGTCCCTTTTCGGTCTGTCT
GOX1231	up_GOX1230-2_rev	TTCTGCCCTGAGGCGGCGTAGGTTTCTCCGGACAGTAGA
GOX1232	do_GOX1230-2_fwd	TCTACTGTCCGGAGAAACCTACGCCGCTCAGGGCAGGAA
	do_GOX1230-2_rev	TCATCTAGATCACATGCCAGTATATCAGC
	up_GOX0265_fwd	AGCTCTAGATATCGAGATCGTCAGCCATA
GOX0265	up_GOX0265_rev	GCCCCGAGGGTCTGTGAGAGATGTTCTGGATCTGTTGT
	do_GOX0265_fwd	ACAACAGATCCAGGAACATCTCTGACAGGACCCTCGGGGC
	do_GOX0265_rev	TCAGAATTCCTTCGTGAACTTGCCCTTGTCTGTC
	up_GOX1441_fwd	AGCTCTAGAGGAAGTTCGAGCGCCTGCGGA
GOX1441	up_GOX1441_rev	GATGAAAAACGCCTGTTCCGGGCGGATGTTTTCTTCGGAAT
	do_GOX1441_fwd	ATTCCGAAGGAAAAACATCCGCCGAACAGGCGTTTTTCATC
	do_GOX1441_rev	TCAGAATTCGCGGCAGATGGAAGTTCGTCA
	up_GOX0516_fwd	AGCTCTAGAGAAACAGTTTCTCCTCCACGCGC
GOX0516	up_GOX0516_rev	CTCCATCCATGACCCGGGAGACACCTCGTTCTTGCGAAA
	do_GOX0516_fwd	TTTCGCAAGAACGAGGTGTCTCGCCGGGTCATGGATGGAG
	do_GOX0516_rev	TCAGAATTCGCGCAGCGCCTGAAACAGGC
	up_sldA_fwd	AGCTCTAGAATATGCCGAGAACGTGGTCC
GOX0854	up_sldA_rev	CGGCCTCAGCCCCGCTTCTGGTGAAAGCCTCCAGAAT
	do_sldB_fwd	AGTTCTGGAGGCTTTCACCAGAAAGCGGGGGCTGAGGCCG
	do_sldB_rev	TCAGAATTCGGTGCAGGTTCCAGCGAAAC
GOX1253	up_GOX1253_fwd	AGCTCTAGACGACGAAGCCGAAATCCGGT
	up_GOX1253_rev	GAAAGAGAACCGGGAGCGCGTCTGTTGTCTTCTCCGCCA
	do_GOX1253_fwd	TGGCGGCAGGAAAGACAACAGACGCGCTCCCGTTCTCTTTC
	do_GOX1253_rev	TCAGAATTCGCTGCCACGCTTTTCCACGC
GOX1170	up_GOX1170_fwd	AGCTCTAGAAGGATCTGGATTGGCTGCGCTCCG
	up_GOX1170_rev	AGCCTGAGAAGGAACGCGCCCCGAAAACCTCGTTCCCGCA
	do_GOX1170_fwd2	TGCGGGAACGAGTTTTCCGGGGCGGTTCTTCTCAGGCT
	do_GOX1170_rev	AGCTCTAGACCCGCGGCTCTGGAGCACTG

Gen(e)	Primer-ID	Sequenz
GOX2071	up_GOX2071_fwd	AGCTCTAGACAGGATTTCCCGTCGATCAC
	up_GOX2071_rev	ATGAAGGGCATCCTTTCTTCGCTTTCCGGGATCTTTCAGC
	do_GOX2071_fwd	GCTGAAAGATCCCCGAAAGCGAAGAAAGGATGCCCTTCAT
	do_GOX2071_rev	AGCTCTAGAGAGATGGCTGCCAGCCTGTCTG
GOX1168	up_GOX1168_fwd	AGCTCTAGAAGGAGGGTCTGGCCCTTCTGAA
GOX1169	up_GOX1168_rev	AGCCTGAGAAGGAACGCGCCTCCCCGTTGTTCTCCCGTTC
GOX1170	do_GOX1170_fwd	GAACGGGAGAACAACGGGGAGGCGCGTTCCTTCTCAGGCT
	do_GOX1170_rev	AGCTCTAGACCCGCGGCTCTGGAGCACTG
GOX1969	up_GOX1969_fwd	AGCTCTAGACATCGTACAGATAGGCCGTGTTGCA
	up_GOX1969_rev	GGGCAGTTTCTCAGAGGTCATTCGTCAACCGGCGTCTCCAAATGTCTC
	do_GOX1969_fwd	GAGACATTTGGAGACGCCGTTGACGAATGACCTCTGAGAACCTGCC C
	do_GOX1969_rev	TCAGAATTCGATTTCCAAACGGTCCAGAATCGC
GOX1969	up2_GOX1969_fwd	AGCTCTAGAGAGGCGGCATGGACCGCTTC
(länger)	do2_GOX1969_rev	TCAGAATTCCTCGAAACACACCTTCTTCAA

Tabelle 14: Überprüfungsprimer für Deletions- und Integrationsmutanten

Gen(e)	Primer-ID	Sequenz
GOX0265	IC_GOX0265_f	ATCCCACTGGGCGCGGTCCT
	IC_GOX0265_r	CGGTTGTCGGGCACTTCGTG
GOX0413	IC_GOX0413_f	GCTTCATGGCGAAGATACGGGTC
	IC_GOX0413_r	CCGGCAGGAATGCATCAGATGC
GOX0516	IC_GOX0516_f	TCGACGATGATGACGTGGACGG
	IC_GOX0516_r	ACAGCGGCACAGTATGACTGCGA
GOX0585	IC_GOX0585-7_f	CGACATCCAGGCCAGTTCCT
GOX0586	IC_GOX0585-7_r	CGGCGTTCGATGCGTTTATC
GOX585		
GOX1067	IC_GOX1068-7_f2	TCGGTGCTGCGCGTAACATC
GOX1068	IC_GOX1068-7_r4	CACGACGTCTGCCTGTTTCAGC
GOX1122	IC_GOX1122_f	GATTGCAGGCGAGCGGGGCG
	IC_GOX1122_r	CTTCGGCCACAGGCGCAGG
GOX1168	IC_GOX1168_f	GTGGTGATCGGTGAAGGTGAGGCA
GOX1169	IC_GOX1170_f	AACGGGATGCCGAAAATCGG
GOX1170	IC_GOX1170_r	GGTCTATAATGCGGGCCTGTCAGA
GOX1230	IC_GOX1230-2_f	CTCCCAGTGGAACAACCGGCTTC
GOX1231	IC_GOX1230-2_r	CAGCAGTCTGGGCGGCAATGGC
GOX1232		
GOX1253	IC_GOX1253_f	TGATCGAGCGTGGCCGGTTT
	IC_GOX1253_r	CTTTGCAGGGCAGCACGATGA
GOX1441	IC_GOX1441_f	CGCCGTCATCCGCATGTCTT
	IC_GOX1441_r	ATAGGCCTCACGCATGGTCTCGGT
GOX1857	IC_GOX1857_f	TCTGCGTCGCTCAATGACTTTC
	IC_GOX1857_r	ATGACGCATACCATGTCCACCTCAT
GOX1969	IC_GOX1969_f	AGTAGGGCTGCGGCGGAGGC
	IC_GOX1969_r	GTCAGCGCGGAGAACGTCACG
	IC2_GOX1969_f	AAGGCGGCGCTGTTTGGTCT
	IC2_GOX1969_r	CGGCCCTCACTGGAAGACG

Gen(e)	Primer-ID	Sequenz
GOX2018	IC_GOX2018_f	TGTCCGTCAGGGCTGAACGC
	IC_GOX2018_r	CAGTCCGTGCAGACCAATCGAGA
GOX2071	IC_GOX2071_f	AGGGATGATGTTTTTCGGCGTAAGG
	IC_GOX2071_r	TGTCACGAAAGACACGAAGCCCG
GOX2094	IC_GOX2094-7_f	GGCTGCACAACCTCGTCCTGAA
GOX2095	IC_GOX2094-7_r	ATCTGCTGATACTCCGGCTCGTCC
GOX2096		
GOX2097		
GOX0854	IC_sldAB_f	CATCAGCGGCGGCTTTTACG
GOX0855	IC_sldAB_r	ATCACAGGGCGGCCCATCAT

Tabelle 15: Konstruktionsprimer für Expressionsvektoren

metagenomischer ORF	Primer-ID	Sequenz
pMM3b Vector- amplifikation Produkt 1	pADHuniV1.for	CGCTTGGCGTAATCATGG
	pADHuniV1.rev	GATCCAACGTGCCTTTTTGT
pMM3b Vector- amplifikation Produkt 2	pADHuniV2.for	GGTCATAGCTGTTTCCTG
	pADHuniV2.rev	AAAGACTGTTTCCGCTGTGA
ORF18630 Produkt 1	pADHORF18630I1.for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGTGACAACCG CCGCAGAAAA
	pADHORF18630I1.rev	ATGATTACGCCAAGCGTTATACGCTTTCTGCA ACCC
ORF18630 Produkt 2	pADHORF18630I2.for	GTGACAACCGCCGCAGAAAA
	pADHORF18630I2.rev	TTATACGCTTTCTGCAACCC
ORF23512c + ORF23506c Produkt 1	pADHORF23512I1-3.for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGTTAGTTTTCT GAGGACA
	pADHORF23512I1.rev	ATGATTACGCCAAGCGTACTGCGCGGCGTC CTGAC
ORF23512c + ORF23506c Produkt 2	pADHORF23512I2-3.for	GTTAGTTTTCTGAGGACA
	pADHORF23512I2.rev	TTACTGCGCGGCGTCTGAC
ORFB04323c Produkt 1	pADHORFB04323I1.for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGAATAGCCT TATACGCTC
	pADHORFB04323I1.rev	ATGATTACGCCAAGCGTCAGTTCCGTCAGG CAGGC
ORFB04323c Produkt 2	pADHORFB04323I2.for	ATGAATAGCCTTATACGCTC
	pADHORFB04323I2.rev	TCAGTTTCCGTCAGGCAGGC
ORFB08389c + ORFB08393c Produkt 1	pADHORFB08393-I1.for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGCCGTCCGA ACAAGACC
	pADHORFB08393-I1.rev	CCATGATTACGCCAAGCGTTAGGGAGTCTTG GGCAGTTC
ORFB08389c + ORFB08393c Produkt 2	pADHORFB08393-I2.for	ATGCCGTCCGAACAAGACC
	pADHORFB08393-I2.rev	TTAGGGAGTCTTGGGCAGTTC
ORFB09566c + ORFB09576c Produkt 1	pADHORFB09576-I1.for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGTTGCGTGA ATATGGGGGC
	pADHORFB09576-I1.rev	CCATGATTACGCCAAGCGCTATCGTGCCGCC TGTGG

metagenomischer ORF	Primer-ID	Sequenz
ORFB09566c + ORFB09576c Produkt 2	pADHORFB09576-I2.for pADHORFB09576-I2.rev	ATGTTGCGTGAATATGGGGGC CTATCGTGCCGCCTGTGG
ORFB12596 + ORFB12603 + ORFB12605 Produkt 1	pADHORFB12596-I1.for pADHORFB12596-I1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGTGTTGCCCGC CAGATGGTA CCATGATTACGCCAAGCGTCAGGCGTTCCT TTTTCTTC
ORFB12596 + ORFB12603 + ORFB12605 Produkt 2	pADHORFB12596-I2.for pADHORFB12596-I2.rev	GTGTTGCCCGCCAGATGGTA TCAGGCGTTCCTTTTTCTTC
ORF01982c + ORF01979c Produkt 1	ORF01982c1.for ORF01982c1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGTCATGGACTC TTTGCTGG CCATGATTACGCCAAGCGTTATGGCGTCTTTT TGCCTT
ORF01982c + ORF01979c Produkt 2	ORF01982c2.for ORF01982c2.rev	GTCATGGACTCTTTGCTGG TTATGGCGTCTTTTTGCCTT
ORF08606c Produkt 1	ORF08606c1.for ORF08606c1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGCGAGAGA GTCAGGCGAG CCATGATTACGCCAAGCGTACTGAGCGGGA GAAGC
ORF08606c Produkt 2	ORF08606c2.for ORF08606c2.rev	ATGCGAGAGAGTCAGGCGAG TACTGAGCGGGAGAAGC
ORF11493 Produkt 1	ORF11493-1.for ORF11493-1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGGCTGACAC TCAGCCC CCATGATTACGCCAAGCGTATTTCTGCGCA GTACCAT
ORF11493 Produkt 2	ORF11493-2.for ORF11493-2.rev	ATGGCTGACACTCAGCCC TTATTTCTGCGCAGTACCAT
ORF23808c + ORF23814c + ORF23816c Produkt 1	ORF23816c1.for ORF23816c1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGTGTTGCCCGC CAGATG CCATGATTACGCCAAGCGTCAGGCGTTCCT TTTTC
ORF23808c + ORF23814c + ORF23816c Produkt 2	ORF23816c2.for ORF23816c2.rev	GTGTTGCCCGCCAGATG TCAGGCGTTCCTTTTTC
ORF25756 + ORF25760 Produkt 1	pADH25756V1.for pADHORF25760V1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGACAAATAT GACCAAGACG ATGATTACGCCAAGCGTCAGACAGCGGAAAT CAGAT
ORF25756 + ORF25760 Produkt 2	pADH25756V2.for pADHORF25760V2.rev	ATGACAAATATGACCAAGACG TCAGACAGCGGAAATCAGAT
ORF25760 Produkt 1	pADH25760V1-2.for pADHORF25760V1.rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGTCACGCG GGTATGAT ATGATTACGCCAAGCGTCAGACAGCGGAAAT CAGAT
ORF25760 Produkt 2	pADH25760V2-2.for pADHORF25760V2.rev	ATGTCACGCGGGTATGAT TCAGACAGCGGAAATCAGAT

Tabelle 16: Sonstige Primer

Primer-ID	Sequenz	Funktion
100K	GGTTACCTTGTTACGACTT	Amplifikation von
616Valt	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	16S rDNA
SB_GOX1969_f	TGTGGCGACTGGATGTATGTCCTG	Southern Blot
SB_GOX1969_r	GATCAGCAGGACCGGACGGTTC	Sondenprimer GOX1969
fusdo2sldAB_fwd	TGCCTGATCACAAGGGCTGAGCGTCCCCACCCCTGTCAGT	Integration von
fusdo2sldAB_rev	ACTGACAGGGGTGGGGACGCTCAGCCCTTGTGATCAGGCA	<i>sldAB</i> in den Locus
fusup2sldAB_fwd	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGCCGAATACTTATGGCAG	der <i>mADH</i>
fusup2sldAB_rev	CTGCCATAAGTATTTCGGCATGATCCAACCTGTCCTTTTGT	

Tabelle 17: Oxidationsaktivitäten von *G. oxydans* 621H wt und den Multideletionsstämmen mit verschiedenen Substraten untersucht mittels Ganzzell-DCPIP-Assay. Alle Aktivitäten sind in μ Units angegeben: mADH = membranständige Alkohol-Dehydrogenase (GOX1067, GOX1068); mAcDH = membranständige Aldehyd-Dehydrogenase (GOX0585, GOX0586, GOX0587); sldAB = membranständige Polyol-Dehydrogenase (GOX0854, GOX0855); mGDH = membranständige Glucose-Dehydrogenase (GOX0265); mGIDH = membranständige Gluconat-Dehydrogenase (GOX1230, GOX1231, GOX1232); mIDH = membranständige Inositol-Dehydrogenase (GOX1857); ? = unbekannte Aktivität; *mögliche Aktivität mit Acetaldehyd, aber unterhalb vom Schwellenwert von 25 μ Units; **Aktivität von *allo*-Inositol in BP.1 unterhalb vom Schwellenwert.

Substrat	wt	BP.1	BP.2	BP.3	BP.4	BP.5	BP.6	BP.7	BP.8	BP.9	BP.10	Enzym
Methanol	43,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mADH
Ethanol	373,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mADH
1-Hexanol	319,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mADH
1,3-Propandiol	175,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mADH
1,4-Butandiol	75,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mADH
2-Cyclohexyl-ethanol	430,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mADH
Isopropanol	180,9	122,6	144,8	144,1	152,3	161,9	187,6	178,3	182,5	-	-	sldAB
2-Hexanol	168	58,9	57,1	54,1	56,1	64,8	86,1	84,5	68,6	-	-	sldAB
3-Hexanol	182,4	187,5	180,5	186,9	175,2	179	180,3	175	171	-	-	sldAB
2,3-Butandiol	169,9	130,8	144	132,5	123,8	142,4	180,7	175	192,3	-	-	sldAB
2,4-Pentandiol	142,2	113,3	95,6	110,3	96	91,3	85,9	98,9	95	-	-	sldAB
2,5-Hexandiol	100,8	67,4	59,1	54,6	42,5	62,1	46	49,9	58,1	-	-	sldAB
1,3-Butandiol	110,8	80,9	66,2	54,6	31	45,3	35,8	42	49,7	-	-	sldAB
1,2-Pentandiol	217,2	162,4	147,1	152,3	158,3	203,9	232,4	210,4	211,9	-	-	sldAB
1,2-Hexandiol	219,8	183,9	132,3	142	175,8	214,8	194,8	208,1	203,1	-	-	sldAB
1,2-Cyclopentandiol	166,8	151,8	142,7	102,4	124,5	128,9	176,6	161,1	139,6	-	-	sldAB
1,3-Cyclopentandiol	242,5	191,5	144,1	210	148,6	137,2	174,3	173,7	183,8	-	-	sldAB
1,2-Cyclohexandiol	167,8	157,5	121,8	157,8	176,6	217,8	227,3	250,3	237	-	-	sldAB
Formaldehyd	254,8	94,4	82,3	-	-	-	-	-	-	-	-	mAcDH
Acetaldehyd	188,6	122,3	101,1	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	.*	mAcDH
Butyraldehyd	127,2	117,1	118,8	-	-	-	-	-	-	-	-	mAcDH
Valeraldehyd	399,8	231,2	189	-	-	-	-	-	-	-	-	mAcDH
Glycerin	205,2	182,7	140,3	162,7	108	170,4	208	192,3	192	-	-	sldAB

Programmcode für das Metagenomanalysetool

MetagenomeDB.sql

```
-- phpMyAdmin SQL Dump
-- version 3.4.3.1
-- http://www.phpmyadmin.net
--
-- Host: localhost
-- Erstellungszeit: 20. Jul 2012 um 10:15
-- Server Version: 5.1.57
-- PHP-Version: 5.3.3

SET SQL_MODE="NO_AUTO_VALUE_ON_ZERO";
SET time_zone = "+00:00";

/*!40101 SET @OLD_CHARACTER_SET_CLIENT=@@CHARACTER_SET_CLIENT */;
/*!40101 SET @OLD_CHARACTER_SET_RESULTS=@@CHARACTER_SET_RESULTS */;
/*!40101 SET @OLD_COLLATION_CONNECTION=@@COLLATION_CONNECTION */;
/*!40101 SET NAMES utf8 */;

--
-- Datenbank: `metagenomeorfs`
--
-----

--
-- Tabellenstruktur für Tabelle `ORF_blast`
--
CREATE TABLE IF NOT EXISTS `ORF_blast` (
  `blast_id` bigint(20) NOT NULL AUTO_INCREMENT,
  `ORF_id` varchar(20) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `result` varchar(50) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `Identity` decimal(5,2) NOT NULL,
  `AlignLength` smallint(6) NOT NULL,
  `MisMatches` smallint(6) NOT NULL,
  `Gaps` smallint(6) NOT NULL,
  `QueryStart` smallint(6) NOT NULL,
  `QueryEnd` smallint(6) NOT NULL,
  `ResultStart` smallint(6) NOT NULL,
  `ResultEnd` smallint(6) NOT NULL,
  `E-value` double NOT NULL,
  `Score` decimal(6,1) NOT NULL,
  PRIMARY KEY (`blast_id`)
) ENGINE=MyISAM DEFAULT CHARSET=utf8 COLLATE=utf8_unicode_ci
AUTO_INCREMENT=1 ;

-----

--
-- Tabellenstruktur für Tabelle `ORF_location`
--
CREATE TABLE IF NOT EXISTS `ORF_location` (
  `ORF_id` varchar(20) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `location` tinyint(4) NOT NULL,
  `probability` decimal(3,2) NOT NULL,
  `sequence` text COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  PRIMARY KEY (`ORF_id`)
```

```

) ENGINE=MyISAM DEFAULT CHARSET=utf8 COLLATE=utf8_unicode_ci
COMMENT='Cellular location of ORFs';

-----

--
-- Tabellenstruktur für Tabelle `ORF_pfam`
--

CREATE TABLE IF NOT EXISTS `ORF_pfam` (
  `pfam_id` bigint(20) NOT NULL AUTO_INCREMENT,
  `ORF_id` varchar(20) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `alignment_start` smallint(6) NOT NULL,
  `alignment_end` smallint(6) NOT NULL,
  `envelope_start` smallint(6) NOT NULL,
  `envelope_end` smallint(6) NOT NULL,
  `hmm_acc` varchar(20) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `hmm_name` varchar(30) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `type` varchar(6) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  `hmm_start` smallint(6) NOT NULL,
  `hmm_end` smallint(6) NOT NULL,
  `hmm_length` smallint(6) NOT NULL,
  `bit_score` decimal(5,1) NOT NULL,
  `E-value` double NOT NULL,
  `significance` tinyint(1) NOT NULL,
  `clan` varchar(20) COLLATE utf8_unicode_ci NOT NULL,
  PRIMARY KEY (`pfam_id`)
) ENGINE=MyISAM DEFAULT CHARSET=utf8 COLLATE=utf8_unicode_ci COMMENT='pfam
results for all ORFs' AUTO_INCREMENT=1 ;

/*!40101 SET CHARACTER_SET_CLIENT=@OLD_CHARACTER_SET_CLIENT */;
/*!40101 SET CHARACTER_SET_RESULTS=@OLD_CHARACTER_SET_RESULTS */;
/*!40101 SET COLLATION_CONNECTION=@OLD_COLLATION_CONNECTION */;

```

functions.php

```

<?php
//Define MySQL connection settings

//Please enter here your settings for MySQL-Server adress, username,
password and name of the database you want to store Metagenome ORF DB in
define(MYSQLADDR, 'localhost');
define(MYSQLUSER, 'MYSQLUSER');
define(MYSQLPASS, 'MYSQLPASS');
define(MYSQLDB, 'MYSQLDB');

// Write Array of Data $data into table $stab guided by array of columns
$column
function writetoDB($stab, $column, $data) {
  //Connecting to DB
  $db = @new mysqli(MYSQLADDR, MYSQLUSER, MYSQLPASS, MYSQLDB);
  //If no connection is possible break off with ERROR
  if (mysqli_connect_errno()) {
    die ('No connection to database possible:'.mysqli_connect_error().
      '(' .mysqli_connect_errno().')');
  }
  //Generate insert mysql query from $stab for table and the arrays
  $column for columns and $data for the data
  $sql = 'INSERT INTO `'.$stab.'` (`'.implode(',', `', $column).'`) VALUES
    (''.implode('"', "", $data).'")';
  //Write mysql query to html output for debugging (normally commented
  out)

```

```

//echo $sql.<br />';
//Execute mysql query
$db->query($sql);
//If error occurs write sql query to html output with error number
if ($db->errno > 0){
    echo 'ERROR '.$db->errno.': ( '.$sql.')<br />';
}
//Return error number (no error = 0) and close database connection
return $db->errno;
$db->close();
}

// Write Array of Data $data into table $stab guided by array of columns
$column
function updateDB($stab,$column,$data){
    //Connecting to DB
    $db = @new mysqli(MYSQLADDR, MYSQLUSER, MYSQLPASS, MYSQLDB);
    //If no connection is possible break off with ERROR
    if (mysqli_connect_errno()) {
        die ('No connection to database possible:'.mysqli_connect_error().
            '('.mysqli_connect_errno().')');
    }
    // Generate update mysql query from $stab for table and the arrays
    $column for columns and $data for the data
    $sql = 'UPDATE `'.$stab.`` SET ' ;
    // Append all columns with the perspective data
    foreach ($column as $i => $columnname){
        $sql = $sql.'`'.$columnname.``='".$data[$i]."'";
    }
    // Delete last "," from the sql query
    $sql = rtrim($sql,",");
    // Append WHERE clause which is always the first element in both column
    and data arrays
    $sql = $sql.' WHERE '.$column[0].`='".$data[0]."'";
    // Write mysql query to html output for debugging (normally commented
    out)
    // echo $sql.<br />';
    // Execute mysql query
    $db->query($sql);
    // If error occurs write sql query to html output with error number
    if ($db->errno > 0){
        echo 'ERROR '.$db->errno.': ( '.$sql.')<br />';
    }
    // Return error number (no error = 0) and close database connection
    return $db->errno;
    $db->close();
}

// Checks if $data exists in Column $column in table $stab
function checkDB($stab,$column,$data){
    //Connecting to DB
    $db = @new mysqli(MYSQLADDR, MYSQLUSER, MYSQLPASS, MYSQLDB);
    //If no connection is possible break off with ERROR
    if (mysqli_connect_errno()) {
        die ('No connection to database possible:'.mysqli_connect_error().
            '('.mysqli_connect_errno().')');
    }
    // Generate mysql query from $stab for table, $column for columns and
    $data
    for data
    $sql = 'SELECT `'.$column.`` FROM `'.$stab.`` WHERE
        '.$column.``='".$data.'"' ;
    //Write mysql query to html output for debugging (normally commented

```

```

        out)
        //echo $sql.<br />';
        //Execute mysql query
        $result = $db->query($sql);
        //Return number of rows and close database connection
        return $result->num_rows;
        $db->close();
    }

// Deletes row in table $ tab where Column $column is $data
function DelinDB($stab,$column,$data){
    //Connecting to DB
    $db = @new mysqli(MYSQLADDR, MYSQLUSER, MYSQLPASS, MYSQLDB);
    //If no connection is possible break off with ERROR
    if (mysqli_connect_errno()) {
        die ('No connection to database possible:'.mysqli_connect_error().
            '('.mysqli_connect_errno().')');
    }
    // Generate delete mysql query from $stab for table, $column for columns
    and $data for data
    $sql = 'DELETE FROM `'.$stab.`` WHERE '.$column.'="'.$data.'";';
    // Write mysql query to html output for debugging (normally commented
    out)
    //echo $sql.<br />';
    // Execute mysql query
    $db->query($sql);
    // If error occurs write sql query to html output with error number
    if ($db->errno > 0){
        echo 'ERROR '.$db->errno.': ('.$sql.)<br />';
    }
    // Return error number (no error = 0) and close database connection
    return $db->errno;
    $db->close();
}

// Reads table $stab and returns a query object with columns $column where
$checkexpr is true
function readDB($stab,$column,$checkexpr){
    //Connecting to DB
    $db = @new mysqli(MYSQLADDR, MYSQLUSER, MYSQLPASS, MYSQLDB);
    //If no connection is possible break off with ERROR
    if (mysqli_connect_errno()) {
        die ('No connection to database possible:'.mysqli_connect_error().
            '('.mysqli_connect_errno().')');
    }
    //Generate mysql query from $stab for table and the arrays $column for
    columns and $data for data
    $sql = 'SELECT '.implode(', ', $column).' FROM '.$stab.' WHERE
        '.$checkexpr.';';
    //Write mysql query to html output for debugging (normally commented
    out)
    //echo $sql.<br />';
    //Execute mysql query and return the resulting object
    return $db->query($sql);
}

// Converts LocationID into Location (String)
function getLocationfromLocID($ID){
    switch ($ID){
        case 0:
            return 'Unknown';
            break;
        case 1:

```

```

        return 'CytoplasmicMembrane';
        break;
    case 2:
        return 'Cytoplasmic';
        break;
    case 3:
        return 'OuterMembrane';
        break;
    case 4:
        return 'Periplasmic';
        break;
    case 5:
        return 'Extracellular';
        break;
    }
}

// Gets XML for a protein from NCBI by GI
function getInfoFromGI($GI){
    $xml = simplexml_load_file(
        'http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?
        db=protein&id='.$GI.'&rettype=fasta&retmode=xml');
    if ($xml === false) {
        return 'Error getting GI'.$GI.' from NCBI';
    }else{
        return $xml->TSeq;
    }
}

//Extracts GenbankID from blast-hit result
function getGIFromString($MyString){
    $TempArray = explode("|",$MyString);
    return $TempArray[1];
}

//parses fasta file
function parsefasta($myfile){
    //initiate all important variables
    $fasta[0]='';
    $fasta[1]='';
    $ReturnValue = 0;
    $DataSets=0;
    //Read file
    $lines = file($myfile);
    //For each line of the provided file
    foreach ($lines as $line) {
        //If first character in line is a ">"
        if (strstr($line,'>')) {
            // Test if fasta[1] is not empty (if there was already a fasta
            file read)
            if (!($fasta[1]!='')){
                //Test if ORF_id is already in the table ORF_location.
                if (checkDB('ORF_location', 'ORF_id', $fasta[0])){
                    //If true update entry with sequence
                    $dberror = updateDB('ORF_location',
                        array('ORF_id','sequence'),$fasta);
                }else{
                    //If false write new entry with sequence into table
                    $dberror = writetoDB('ORF_location',
                        array('ORF_id','sequence'),$fasta);
                }
            }
            //Check the returned error number. If 0 increase dataset by

```

```

        one and set returnvalue to 4 but only if no error has
        occurred before otherwise set returnvalue to 3 (with
        indicates an error)
    if ($dberror){
        $ReturnValue=3;
    }else{
        $DataSets++;
        if (!($ReturnValue==3)){
            $ReturnValue=4;
        }
    }
}
// Save ORFname until a space character or a newline character
occurs.
$MyTextArray = explode(" ", $line);
$fasta[0] = ltrim($MyTextArray[0], '>');
$fasta[0] = rtrim($fasta[0], "\n\r");
$fasta[1] = '';
if ($ReturnValue == 0){
    $ReturnValue = 1;
}
}else{
    //Append new line of sequence to the lines before it by
    deleting the newline characters
    if (!($fasta[0]=='')){
        $fasta[1] = $fasta[1].rtrim($line, "\n\r");
    }
}
}
// Save the last sequence in the buffer to the database
if (!($fasta[1]=='')){
    if (checkDB('ORF_location', 'ORF_id', $fasta[0])){
        $dberror = updateDB('ORF_location',
            array('ORF_id', 'sequence'), $fasta);
    }else{
        $dberror = writetoDB('ORF_location',
            array('ORF_id', 'sequence'), $fasta);
    }
    if ($dberror){
        $ReturnValue=3;
    }else{
        $DataSets++;
        if (!($ReturnValue==3)){
            $ReturnValue=4;
        }
    }
}
}
// If no error has occurred return number of datasets written otherwise
the negative number of the returnvalue indicating an error
if ($ReturnValue==4){
    return $DataSets;
}else{
    return $ReturnValue*-1;
}
}

//parses psort file
function parsepsort($myfile){
    //initiate all important variables
    $ReadMode = 0;
    $ReturnValue = 0;
    $DataSets=0;
    //Read file

```

```

$lines = file($myfile);
//Foreach line of the provided file
foreach ($lines as $line) {
    //Do actions according to the current ReadMode
    switch ($ReadMode) {
        case 0:
            // If Readmode is 0 look for "SeqID:" at line start.
            if (strstr($line,'SeqID:')) {
                //If found save ORF_Id behind "Seq:ID" in psort[0]
                and set ReadMode to 1
                $MyTextArray = explode(" ",$line);
                $psort[0] = $MyTextArray[1];
                $ReadMode = 1;
                if ($ReturnValue == 0){
                    $ReturnValue = 1;
                }
            }
            break;
        case 1:
            // If Readmode is 1 look for "Final Prediction: in line
            if (strstr($line,'Final Prediction:')) {
                //If found set Readmode to 2 to save the NEXT line
                $ReadMode = 2;
                if ($ReturnValue == 1){
                    $ReturnValue = 2;
                }
            }
            break;
        case 2:
            $MyText = trim($line);
            // Save to NEXT line after "Final Prediction" and save
            the corresponding Location_ID for the location
            if (!strstr($MyText,'Unknown')){
                $TempText = strstr($MyText," ",true);
                switch ($TempText){
                    case 'CytoplasmicMembrane':
                        $psort[1]=1;
                        break;
                    case 'Cytoplasmic':
                        $psort[1]=2;
                        break;
                    case 'OuterMembrane':
                        $psort[1]=3;
                        break;
                    case 'Periplasmic':
                        $psort[1]=4;
                        break;
                    case 'Extracellular':
                        $psort[1]=5;
                        break;
                }
                //Save the probability
                $psort[2] = (float)substr(strchr($MyText,' '),1);
            }else{
                $psort[1] = 0;
                $psort[2] = 0;
            }
            //Write or update location and probability of ORF_id in
            the data base
            if (checkDB('ORF_location', 'ORF_id', $psort[0])){
                $dberror = updateDB('ORF_location',
                    array('ORF_id','location',
                        'probability'),$psort);
            }
        }
    }
}

```

```

    }else{
        $dberror = writetoDB('ORF_location',
            array('ORF_id', 'location',
                'probability'), $psort);
    }
    //Check the returned error number. If 0 increase
    dataset by one and set returnvalue to 4 but only if
    no error has occurred before otherwise set
    returnvalue to 3 (with indicates an error)
    if ($dberror){
        $ReturnValue=3;
    }else{
        $DataSets++;
        if (!($ReturnValue==3)){
            $ReturnValue=4;
        }
    }
    //Set Readmode to 0 to find the next ORF
    $ReadMode = 0;
    break;
}
}
// If no error has occurred return number of datasets written
otherwise the negative number of the returnvalue indicating an
error
if ($ReturnValue==4){
    return $DataSets;
}else{
    return $ReturnValue*-1;
}
}

//parses pfam file
function parsepfam($myfile){
    //initiate all important variables
    $ReadMode = 0;
    $DataSets=0;
    $ReturnValue = 0;
    $NewORF_ID = "";
    //Read file
    $lines = file($myfile);
    //For each line of the provided file
    foreach ($lines as $line) {
        //Do actions according to the current ReadMode
        switch($ReadMode){
            case 0:
                // If readmode is 0 look for '# <seq id>' in line
                if (strstr($line, '# <seq id>')){
                    // if found set readmode to 1 to read next line
                    $ReadMode = 1;
                    $ReturnValue = 1;
                }
                break;
            case 1:
                // if readmode = 1 set readmode to 2 to skip line (is
                empty)
                $ReadMode = 2;
                break;
            case 2:
                // If readmode = 2 get line and parse it into an array
                where
                the space character separates the values. Delete all
                array elements which are empty

```

```

$pfamresult = array_filter(str_getcsv($line, " "));
// Get array_keys because array number sequence is
  interrupted
  by deleted empty array elements
$pfamresult_arraykeys = array_keys($pfamresult);

switch (count($pfamresult)){
  // Look if E-value is missing because it was 0 and was
  // deleted by array_filter and adds it to array
  case 14:
    $pfamresult[$pfamresult_arraykeys
      [count($pfamresult_arraykeys)-1]-2] = 0;
    ksort($pfamresult);
  case 15:
    // If pfam result is parsed save ORF_id to
    // CurrentORF_id
    $CurrentORF_id = $pfamresult[
      $pfamresult_arraykeys[0]];

    // If CurrentORF_id is not NewORF_id delete all
    // entries in ORF_pfam where ORF_id is
    // CurrentORF_id
    if (!($NewORF_ID == $CurrentORF_id)){
      if (checkDB('ORF_pfam', 'ORF_id',
        $CurrentORF_id)){
        DelinDB('ORF_pfam', 'ORF_id',
          $CurrentORF_id);
      }
      // Save CurrentORF_id to NewORF_ID to protect
      // the written values from deleting by
      // following pfam-results with the same ORF_id
      $NewORF_ID = $CurrentORF_id;
    }
    //Write pfam-results to ORF_pfam. If error is 0
    // increase dataset by one and set returnvalue to 4
    // if it is not 3 or 2 otherwise set it to 3
    if (writetoDB('ORF_pfam', array('ORF_id',
      'alignment_start', 'alignment_end', 'envelope_start',
      'envelope_end', 'hmm_acc', 'hmm_name', 'type',
      'hmm_start', 'hmm_end', 'hmm_length',
      'bit_score', 'E-value', 'significance',
      'clan'), $pfamresult)){
      $ReturnValue = 3;
    }else{
      $DataSets++;
      if (!($ReturnValue==3 OR $ReturnValue==2)){
        $ReturnValue=4;
      }
    }
  }
  break;
default:
  //Skip line if amount to data doesn't match amount
  // of columns and report error is 2 (amount doesn't
  // match)
  $ReturnValue = 2;
  break;
}
break;
}
}
// If no error has occurred return number of datasets written otherwise
// the negative number of the returnvalue indicating an error
if ($ReturnValue==4){

```

```

        return $DataSets;
    }else{
        return $ReturnValue*-1;
    }
}

// parses tabular blast file
function parseblastfile($myfile) {
    //initiate all important variables
    $NewORF_ID="";
    $ReturnValue=0;
    $DataSets=0;
    //Read file
    $lines = file($myfile);
    //For each line of the provided file
    foreach ($lines as $line) {
        //Parse line of blastp result file where values are separated by
        tabs
        $blastresult = str_getcsv($line,"\t");
        //count values if 12 values given size is correct otherwise return
        Error 1
        if (count($blastresult)==12){
            // If $blastresult[0] is not NewORF_id delete all entries in
            ORF_blast where ORF_id is $blastresult[0]
            if (!($NewORF_ID == $blastresult[0])){
                if (checkDB('ORF_blast', 'ORF_id', $blastresult[0])){
                    DelinDB('ORF_blast', 'ORF_id', $blastresult[0]);
                }
                //Save $blastresult[0] to NewORF_Id to protect the written
                values from deleting by following blastp-results with the
                same ORF_id
                $NewORF_ID = $blastresult[0];
            }
            // Write blastp-results to ORF_blast. If error is 0 increase
            dataset by one and set returnvalue to 4 if it is not 3 or 1
            otherwise set it to 3
            if (writetoDB('ORF_blast',
                array('ORF_id','result','Identity','AlignLength','MisMatches',
                    'Gaps','QueryStart','QueryEnd','ResultStart','ResultEnd',
                    'E-value','Score'),$blastresult)){
                $ReturnValue = 3;
            }else{
                $DataSets++;
                if (!($ReturnValue==3 OR $ReturnValue==1)){
                    $ReturnValue=4;
                }
            }
        }else{
            $ReturnValue=1;
            break;
        }
    }
    // If no error has occurred return number of datasets written otherwise
    the negative number of the returnvalue indicating an error
    if ($ReturnValue==4){
        return $DataSets;
    }else{
        return $ReturnValue*-1;
    }
}
?>

```

index.php

```

<!DOCTYPE html>
<!-- Main Frame of the Metagenome DB application-->
<html>
  <head>
    <meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=UTF-8">
    <title>Metagenome Database</title>
  </head>
  <frameset rows="*,350">
    <frame src="search.php" name="Search">
    <frame src="details.php" name="Details">
    <noframes>
      <body>
        <p>Please get a Browser which supports frames.</p>
      </body>
    </noframes>
  </frameset>
</html>

```

search.php

```

<!DOCTYPE html>
<?php
  // including functions and error reporting
  include 'functions.php';
  error_reporting(E_ALL);
  ini_set('display_errors', 1);
?>
<html>
  <head>
    <meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=UTF-8">
    <title>Search.php</title>
    <script type="text/javascript"><!--
      //JavaScript function which sets all checkboxes to the value of the
      mastercheckbox
      function selectCheckboxes(formname) {
        for (var i = 0;i < document.forms[formname].elements.
          length;i++) { if(document.
            forms[formname].elements[i].type == 'checkbox'){
              document.forms[formname].elements[i].checked =
                document.forms[formname].masterCheckBox.checked;
            }
          }
        }
      --></script>
  </head>
  <body>
    <p><a href="upload.php" target="_parent">Upload new ORFs</a></p>
    <h1>Metagenome ORF Database V 0.1</h1>
    <form id="search" method="POST" action="search.php">
      <table>
        <tr>
          <th>ORF_id</th><th>Location</th><th>Domain</th>
          <th>&nbsp;</th><th>&nbsp;</th>
        </tr>
        <tr>
          <td>(ignores others if set; wildcard %)</td><td>(multi
            select)</td><td>(wildcard %)</td><td>&nbsp;</td>
          <td>&nbsp;</td>
        </tr>
        <tr>
          <td>

```

```
<?php
    // If ORF_id is set set standard value of
    inputbox
    to ORF_id
    if (isset($_POST['ORF_id']) AND
        $_POST['ORF_id']){
        echo '<input name="ORF_id" type="text"
        size="30" value="'. $_POST['ORF_id']. '">';
    }else{
        echo '<input name="ORF_id" type="text"
        size="30">';
    }
?>
</td>
<td>
    <select name="Location[]" size="5" multiple>
    <?php
        // If Location is set preselect set
        locations
        if (isset($_POST['Location']) AND
            $_POST['Location']){
            if (in_array(0, $_POST['Location'])){
                echo '<option value="0" selected>
                Unknown</option>';
            }else{
                echo '<option value="0">
                Unknown</option>';
            }
            if (in_array(1, $_POST['Location'])){
                echo '<option value="1" selected>
                CytoplasmicMembrane</option>';
            }else{
                echo '<option value="1">
                CytoplasmicMembrane</option>';
            }
            if (in_array(2, $_POST['Location'])){
                echo '<option value="2" selected>
                Cytoplasmic</option>';
            }else{
                echo '<option value="2">
                Cytoplasmic</option>';
            }
            if (in_array(3, $_POST['Location'])){
                echo '<option value="3" selected>
                OuterMembrane</option>';
            }else{
                echo '<option value="3">
                OuterMembrane</option>';
            }
            if (in_array(4, $_POST['Location'])){
                echo '<option value="4" selected>
                Periplasmic</option>';
            }else{
                echo '<option value="4">
                Periplasmic</option>';
            }
            if (in_array(5, $_POST['Location'])){
                echo '<option value="5" selected>
                Extracellular</option>';
            }else{
                echo '<option value="5">
                Extracellular</option>';
            }
        }
    }
    </td>
```

```

        }else{
            echo '<option value="0">Unknown</option>
                <option value="1">
                CytoplasmicMembrane</option>
                <option value="2">Cytoplasmic</option>
                <option value="3">OuterMembrane</option>
                <option value="4">Periplasmic</option>
                <option value="5">Extracellular</option>';
        }
    ?>
</select>
</td>
<td>
<?php
    //If Domain is set set standard value of
    inputbox
    Domain to value of Domain
    if (isset($_POST['Domain']) AND $_POST['Domain']){
        echo '<input name="Domain" type="text"
            size="30" value="'. $_POST['Domain']. "'>';
    }else{
        echo '<input name="Domain" type="text"
            size="30">';
    }
    ?>
</td>
<td><input type="submit" value="Search"></td><td><a
    href="index.php" target="_parent">Reset</a></td>
</tr>
</table>
</form>
<?php
//Initiate WhereExpr and CurrentORF variable
$WhereExpr = "";
$CurrentORF = "";
//If ORF_id is set Where clause to ORF_id otherwise look if Location
and/or domain are set and set where clause to location and/or
domain
if (isset($_POST['ORF_id']) AND $_POST['ORF_id']){
    $WhereExpr = 'ORF_location.ORF_id LIKE "'. $_POST['ORF_id']. "'";
}else{
    if (isset($_POST['Location']) AND $_POST['Location']){
        $WhereExpr = '(ORF_location.location LIKE '.implode(' OR
            ORF_location.location LIKE ', $_POST['Location']).')';
    }
    if (isset($_POST['Domain']) AND $_POST['Domain']){
        if ($WhereExpr){
            $WhereExpr = $WhereExpr.' AND (ORF_pfam.hmm_name LIKE
                "'. $_POST['Domain']. "'";
        }else{
            $WhereExpr = '(ORF_pfam.hmm_name LIKE
                "'. $_POST['Domain']. "'";
        }
    }
}
// If Where clause is set
if (!( $WhereExpr == "" )){
    //Write caption and header of table to HTML output
    echo '<h2>Results:</h2><form id="compare" action="compare.php"
        method="POST" target="_blank"><table><tr><th><input
        type="checkbox" name="masterCheckBox" id="masterCheckBox"
        onclick="selectCheckboxes(\'compare\');"></th>
        <th>ORF_id</th><th>Length</th><th>Location</th><th>Pfam-
```

```

        result</th></tr>';
// Get all data sets from table ORF_location where WhereExpr is
true
and append all data sets from table ORF_pfam where ORF_ids
match
$result = readDB('ORF_location LEFT JOIN ORF_pfam ON
ORF_location.ORF_id = ORF_pfam.ORF_id',
    array('ORF_location.ORF_id', 'ORF_location.location',
        'ORF_pfam.hmm_name', 'ORF_pfam.alignment_start',
        'ORF_location.sequence'), $WhereExpr.' ORDER BY
        ORF_location.ORF_id ASC,
        ORF_pfam.alignment_start ASC');
// Test if returned object is valid otherwise write ERROR
if ($result){
    // Test if there are results otherwise write Nothing found
    if ($result->num_rows){
        while ($row = $result->fetch_assoc()){
            // Write table row wise with results from ORF_location. If
            there are more than one result for one ORF_id then this
            are multiple pfam-results. Write all pfam results in one
            column
            if ($row['ORF_id'] == $CurrentORF){
                $TempString = $TempString.', '.$row['hmm_name'];
            }else{
                if (!$CurrentORF==""){
                    echo $TempString.</td></tr>';
                }
                $CurrentORF = $row['ORF_id'];
                if (strlen($row['sequence'])>0){
                    $ORFLength = strval(strlen($row['sequence']));
                }else{
                    $ORFLength = "n/a";
                }
                $TempString = '<tr><td><input type="checkbox"
                    name="ORF[]" value="'.$row['ORF_id'].'">
                    </td><td><a href="details.php?
                    ID='.$row['ORF_id'].' target="Details">
                    '.$row['ORF_id'].'</a></td><td>
                    '.$ORFLength.'</td><td>
                    .getLocationFromLocID($row['location']).'
                    </td><td>';
                if ($row['hmm_name']){
                    $TempString = $TempString.$row['hmm_name'];
                }else{
                    $TempString = $TempString.'n/a';
                }
            }
        }
        echo $TempString.</td></tr>';
    }else{
        echo '<tr><td>&nbsp;</td><td>Nothing found!</td><td>&nbsp;</td>
            <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
    }
    $result->close();
}else{
    echo '<tr><td>&nbsp;</td><td>SQL FEHLER</td><td>&nbsp;</td>
        </td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
}
echo '</table><p><input type="submit" value="Compare"><input
    type="reset" value="Reset"></p>';
}
?>

```

```
</body>
</html>
```

details.php

```
<!DOCTYPE html>
<?php
    // including functions and error reporting
    include 'functions.php';
    error_reporting(E_ALL);
    ini_set('display_errors', 1);
?>
<html>
    <head>
        <meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=UTF-8">
        <title>Details.php</title>
    </head>
    <body>
        <?php
            // Test if ORF_id is provided otherwise show nothing
            if (isset($_GET['ID']) AND $_GET['ID']){
                // Get ORF_id, location, probability of location and sequence
                from table ORF_location where ORF_id is the provided ORF_id
                $result = readDB('ORF_location',
                    array('ORF_id', 'location', 'probability', 'sequence'),
                    'ORF_id = "'.$_GET['ID'].'"');
                // Test if returned object is valid otherwise write ERROR
                getting ORF
                if ($result){
                    // Test if there are results for the provided ORF_ids
                    otherwise write NOT FOUND
                    if ($result->num_rows){
                        // Get the first row (there should only be one,
                        because ORF_id is unique in ORF_location) and write
                        results into $row
                        if ($row = $result->fetch_assoc()){
                            // Check if a sequence is provided and if it is,
                            get the length of it. Otherwise write n/a
                            if (strlen($row['sequence'])>0){
                                $ORFSeq = $row['sequence'];
                                $ORFLength = strval(strlen($row['sequence']));
                            }else{
                                $ORFLength = "n/a";
                            }
                            //Write all results to HTML output.
                            echo '<h3>Details for '.$row['ORF_id'].'</h3><p>
                                Location: '.$row['location'].'('.$row['probability'].')
                                </p><p>Length: '.$ORFLength.'</p>';
                        }
                    }else{
                        echo '<h3>'.$_POST['ORF_id'].' NOT FOUND!</h3>';
                    }
                    $result->close();
                }else{
                    echo '<h3>SQL ERROR</h3>';
                }
            }
        ?>
        <h4>PFAM-Results:</h4>
        <table>
            <tr>
```

```

<th>#</th><th>Name</th><th>Acc</th>
<th>Alignment-Start</th><th>Alignment-End</th>
<th>Envelope-Start</th><th>Envelope-End</th>
<th>Type</th><th>hmm-Start</th><th>hmm-End</th>
<th>hmm-length</th><th>Score</th><th>E-Value</th>
</tr>
<?php
// Get ORF_id and Pfamresults from table ORF_pfam where ORF_id
// is the provided ORF_ids and order it by the alignment
// starting point in ascending manner
$result = readDB('ORF_pfam', array('ORF_id','alignment_start',
    'alignment_end','envelope_start','envelope_end',
    'hmm_acc','hmm_name','`type`','hmm_start',
    'hmm_end','hmm_length','bit_score','`E-value`',
    'significance','clan'), 'ORF_id =
    "'.$_GET['ID'].'" ORDER BY alignment_start
    ASC');
// Test if returned object is valid otherwise write ERROR
if ($result){
    // Test if there are results for the provided ORF_ids
    // otherwise write n/a no pfam-results found
    if ($result->num_rows){
        $i=0;
        //Write all pfamresults row wise in a table. Add a
        //counter in front of it ($i).
        while ($row = $result->fetch_assoc()){
            $i++;
            echo '<tr><td>'. $i. '</td><td>'. $row['hmm_name'].
                '</td><td><a href="http://pfam.sanger.ac.uk
                /family/'. $row['hmm_acc']. '" target="_blank">'
                . $row['hmm_acc']. '</a></td><td>
                '. $row['alignment_start']. '</td>
                <td>'. $row['alignment_end']. '</td>
                <td>'. $row['envelope_start']. '</td>
                <td>'. $row['envelope_end']. '</td>
                <td>'. $row['type']. '</td>
                <td>'. $row['hmm_start']. '</td>
                <td>'. $row['hmm_end']. '</td>
                <td>'. $row['hmm_length']. '</td>
                <td>'. $row['bit_score']. '</td>
                <td>'. $row['E-value']. '</td></tr>';
        }
    }else{
        echo '<tr><td>No PFAM-Results found for
        '. $_GET['ID']. '!</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
    }
    $result->close();
}else{
    echo '<tr><td>SQL
    ERROR</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
    <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
    <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
    <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
    <td>&nbsp;</td></tr>';
}
?>
</table>
<h4>Blast-Results:</h4>
<table>

```

```

<tr>
  <th>#</th><th>Result</th><th>Identity [%]</th><th>Length</th>
  <th>Alignment-Length</th><th>Mismatches</th>
  <th>Gaps</th><th>Query-Start</th><th>Query-End</th>
  <th>Result-Start</th><th>Result-End</th><th>E-Value</th>
  <th>Score</th>
</tr>
<?php
  // Get ORF_id and blastp results from the table ORF_blast
  // where ORF_id is one the provided ORF_id and order it by
  // score in descending manner. So best hit first
  $result = readDB('ORF_blast', array('ORF_id','result',
    'Identity','AlignLength','MisMatches',
    'Gaps','QueryStart','QueryEnd',
    'ResultStart','ResultEnd','E-value',
    'Score'), 'ORF_id = "'.$_GET['ID'].'" ORDER
    BY Score DESC');

  // Test if returned object is valid otherwise write ERROR
  if ($result){
    // Test if there are results for the provided ORF_ids
    // otherwise write "No blast hits found" into table column
    if ($result->num_rows){
      $i=0;
      // Write all blast results of ORF_id row wise into
      // table adding a counter in front of them ($i)
      while ($row = $result->fetch_assoc()){
        $i++;
        // Get the blast hit result details from the NCBI
        // homepage of the protein after extracting the
        // gene number out of the blast-result saved in
        // the DB
        $NCBIInfo=getInfofromGI(getGIfromString(
          $row['result']));
        if (is_string($NCBIInfo) AND strstr ($NCBIInfo,
          'error')){
          echo '<tr><td>'.$i.'</td><td><a href="http://
            www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/
            '.getGIfromString($row['result']).'"
            target="_blank">'.$NCBIInfo.'</a></td>
            <td>'.$row['Identity'].'</td>
            <td>n/a</td><td>'.$row['AlignLength'].'</td>
            <td>'.$row['MisMatches'].'</td>
            <td>'.$row['Gaps'].'</td>
            <td>'.$row['QueryStart'].'</td>
            <td>'.$row['QueryEnd'].'</td>
            <td>'.$row['ResultStart'].'</td>
            <td>'.$row['ResultEnd'].'</td>
            <td>'.$row['E-value'].'</td>
            <td>'.$row['Score'].'</td></tr>';
        }else{
          echo '<tr><td>'.$i.'</td>
            <td><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
            protein/'.getGIfromString($row['result'])
            .' " target="_blank">'.$NCBIInfo->TSeq_defline.
            '</a></td><td>'.$row['Identity'].'</td>
            <td>'.$NCBIInfo->TSeq_length.'</td>
            <td>'.$row['AlignLength'].'</td>
            <td>'.$row['MisMatches'].'</td>
            <td>'.$row['Gaps'].'</td>
            <td>'.$row['QueryStart'].'</td>
            <td>'.$row['QueryEnd'].'</td>
            <td>'.$row['ResultStart'].'</td>
            <td>'.$row['ResultEnd'].'</td>
            <td>'.$row['E-value'].'</td>
            <td>'.$row['Score'].'</td></tr>';
        }
      }
    }
  }
}

```

```

        <td>'.$row['E-value'].'</td>
        <td>'.$row['Score'].'</td></tr>;
    }
    }
}else{
    echo '<tr><td>No blast hits found for '.$_GET['ID'].'!
        </td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td></tr>';
    }
    $result->close();
}else{
    echo '<tr><td>SQL ERROR</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
    }
?>
</table>
<p>&copy; Bj&ouml;rn Peters 2012</p>
<?php
    // Closing if clause "Test if ORF_id is provided otherwise show
    nothing"
    }
?>
</body>
</html>

```

compare.php

```

<?php include 'functions.php';
    // including functions and error reporting
    error_reporting(E_ALL);
    ini_set('display_errors', 1);
    date_default_timezone_set ('Europe/Berlin');
?>
<!DOCTYPE html>
<html>
    <head>
        <meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=UTF-8">
        <?php
            // Write current Date and Time into title to distinguish between
            two comparisons
            echo '<title>ORF Comparison '.date("d.m.Y H:i:s").'</title>';
        ?>
    </head>
    <body>
        <?php
            // Write current Date and Time into caption to distinguish between
            two comparisons
            echo '<h2>ORF Comparison '.date("d.m.Y H:i:s").'</h2>';
        ?>
        <form action="compare.php" method="POST">
            <table>
                <tr><th>&nbsp;</th><th>ORF-id</th><th>Length</th>
                <th>Location</th><th>Pfam-Results</th>

```

```

        <th>Best blast-hit</th><th>Length</th>
        <th>Alignment Length</th><th>Alignment Mismatches</th></tr>
<?php
// Test if ORF ID is provided otherwise write that no ORF_id was
provided
if (isset($_POST['ORF']) AND count($_POST['ORF'])>0){
//Write headers of table for CSV output into CSV variable
$CSV = 'ORF-id\tLength\tLocation\tPfam-Results\tBest blast-
hit\tLength\tAlignment Length\tAlignment Mismatches\n';
// For each ORF_ID which is provided
foreach ($_POST['ORF'] as $i => $ORF){
// Get ORF_id, location, probability of location and
sequence from table ORF_location where ORF_id is one of
the provided ORF_ids
$psortresult = readDB('ORF_location',
array('ORF_id','location','probability','sequence'),
'ORF_id = "'.$ORF.'"');
// Test if returned object is valid otherwise write ERROR
getting ORF
if ($psortresult){
// Test if there are results for the provided ORF_ids
otherwise write NOT FOUND
if ($psortresult->num_rows){
// Get the first row (there should only be one,
because ORF_id is unique in ORF_location) and
write results into $row
if ($row = $psortresult->fetch_assoc()){
// Check if a sequence is provided and if it
is, get the length of it. Otherwise write
n/a
if (strlen($row['sequence'])>0){
$ORFLength = strval(strlen(
$row['sequence']));
}else{
$ORFLength = 'n/a';
}
//Write the row of the table with all results.
Also attach the results to the CSV output
variable
echo '<tr><td><input type="checkbox"
name="ORF[]" value="'.$row['ORF_id'].'"
checked></td><td>'.$row['ORF_id'].'</td>
<td>'.$ORFLength.</td>
<td>'.$getLocationfromLocID(
$row['location']).'('.$
$row['probability'].')
</td><td>';
$CSV = CSV.$row['ORF_id'].'\t'.$ORFLength.
'\t'.$getLocationfromLocID(
$row['location']).'
('.$row['probability'].')\t';
}
$psortresult->close();
// Get ORF_id and Pfamresults from table ORF_pfam
where ORF_id is the provided ORF_ids and order
it by the alignment starting point in ascending
manner
$pfamresult = readDB('ORF_pfam',
array('ORF_id','hmm_name',
'alignment_start'),
'ORF_id = "'.$ORF.'"
" ORDER BY alignment_start
ASC');

```

```

// Test if returned object is valid otherwise
write ERROR
if ($pfamresult){
  // Test if there are results for the provided
  ORF_ids otherwise write n/a into table
  column and CSV output variable
  if ($pfamresult->num_rows){
    // For each pfam-result add the result to
    the table column Pfam-Result and to the
    CSV output variable
    while ($row = $pfamresult->fetch_assoc()){
      echo $row['hmm_name'].' ';
      $CSV=$CSV.$row['hmm_name'].' ';
    }
  }else{
    echo 'n/a';
    $CSV=$CSV.'n/a';
  }
  $pfamresult->close();
else{
  echo 'ERROR';
  $CSV=$CSV.'ERROR';
}
// Close Pfam-result column
echo '</td>';
$CSV=$CSV.'\t';
// Get ORF_id and blastp results with results,
Score, Alignment Length and Mismatches from the
table ORF_blast where ORF_id is one the
provided ORF_id and order it by score in
descending manner. So best hit first
$blastresult = readDB('ORF_blast',
  array('ORF_id','result',
    'Score','AlignLength','MisMatches'),
  'ORF_id = "'.$ORF.'" ORDER BY Score
  DESC');
// Test if returned object is valid otherwise
write ERROR
if ($blastresult){
  // Test if there are results for the provided
  ORF_ids otherwise write n/a into table
  column and CSV output variable
  if ($blastresult->num_rows){
    // Get best blast hit
    if ($row = $blastresult->fetch_assoc()){
      // Get the blast hit result details
      from the NCBI homepage of the
      protein after extracting the gene
      number out of the blast-result
      saved in the DB
      $NCBIInfo=getInfofromGI
      (getGIfromString($row['result']));
// Write protein details, Alignment Length and
Mismatches to table and CSV output variable
      if (is_string($NCBIInfo) AND
        strpos($NCBIInfo,'error')){
echo '<td><a ref="http://www.ncbi.nlm.nih.gov
  /protein/'.getGIfromString($row
  ['result']).'" target="_blank">
  '.$NCBIInfo.'</a></td><td>
  n/a</td><td>'.$row['AlignLength'].'
  </td><td>'.$row['MisMatches'].'</td>';
      $CSV=$CSV.$row['result'].' '.$NCBIInfo.

```

```

        '\t\n/a\t'.$row['AlignLength'].
        '\t'.$row['MisMatches'];
    }else{
    echo '<td><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov
        /protein/'.getGIFfromString($row['result'])
        .' " target="_blank">'.$NCBIInfo-
        >TSeq_defline.'</a></td><td>'.$NCBIInfo-
        >TSeq_length.'</td><td>'
        .$row['AlignLength'].'</td>
        <td>'.$row['MisMatches'].'</td>';
    $CSV=$CSV.$row['result'].' '.$NCBIInfo-
        >TSeq_defline.'\t'.$NCBIInfo-
        >TSeq_length.'\t'.$row['AlignLength'].
        '\t'.$row['MisMatches'];
    }
    }
    }else{
        echo '<td>n/a</td><td>&nbsp;</td>
            <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>';
        $CSV=$CSV.'n/a\t\t\t';
    }
    $blastresult->close();
}else{
    echo '<td>ERROR</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>';
    $CSV=$CSV.'ERROR\t\t\t';
}
// Close row
echo '</tr>';
$CSV=$CSV.'\n';
}else{
    echo '<tr><td>'.$ORF.' not found!</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
    $psortresult->close();
}
}
}else{
    echo '<tr><td>ERROR getting '.$ORF.'!</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
}
}
}else{
    echo '<tr><td>&nbsp;</td><td>No ORFs selected</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td>
        <td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td><td>&nbsp;</td></tr>';
}
//Show compare button
echo '</table><p><input type="submit" value="Compare">
    <input type="reset" value="Reset"></p></form>';
// $CSV is set and not empty show button to Save content of $CSV to a
CSV-file. Title of page and content of $CSV are stored into a hidden
input element and are send to download.php if "Save to CSV" is
pressed
if (isset($CSV) AND $CSV){
    echo '<form action="download.php" method="POST">
        <input type="hidden" name="CSV" value="'.$CSV.'">
        <input type="hidden" name="CSVTitle" value="'
        .date("YmdHis").'">
        <p><input type="submit" value="Save to CSV"></p>
    </form>';
}

```

```

    }
    ?>
    <p>&copy; Bj&ouml;rn Peters 2012</p>
  </body>
</html>

```

download.php

```

<?php
// If Content and Title for CSV are provided and not empty generate
CSV.file
and fill it with content
if (isset($_POST['CSV']) AND $_POST['CSV'] AND isset($_POST['CSVTitle'])
AND
$_POST['CSVTitle']){
header("content-type: application/csv-tab-delimited-table");
header("content-length: ".strlen($_POST['CSV']));
header("content-disposition: attachment;
filename=\"comparison".$_POST['CSVTitle'].".csv\");
/ Interpret \t for tab and \n for new line not as strings but as control
characters
echo str_replace(array('\t','\n'), array("\t","\n"), $_POST['CSV']);
}else{
echo 'ERROR';
}
?>

```

upload.php

```

<!DOCTYPE html>
<?php
// including functions and error reporting
include 'functions.php';
error_reporting(E_ALL);
ini_set('display_errors', 1);
//Set Password for Upload-Form
$userpass = 'userpass';
?>
<html>
<head>
<meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=UTF-8">
<title>Upload-Page for ORF-Files</title>
</head>
<body>
<p><a href="index.php">Back to Metagenome Database</a></p>
<h1>Upload-Form for new ORFs from Metagenomes</h1>
<form enctype="multipart/form-data" action="upload.php" method="POST">
<h2>fasta-File</h2>
<p>Choose a file to upload: <input name="uploadfasta"
type="file"></p>
<h2>psort-File</h2>
<p>Choose a file to upload: <input name="uploadpsort"
type="file"></p>
<h2>pfam-File</h2>
<p>Choose a file to upload: <input name="uploadpfam"
type="file"></p>
<h2>blastp-File</h2>
<p>Please provide a tabular blastp result file</p>
<p>Choose a file to upload: <input name="uploadblast"
type="file"></p>
<h3>Password</h3>

```

```

    <p>Enter the Upload-Form password: <input name="password"
      type="password"></p>
    <input type="submit" value="Upload File(s)"><input type="reset"
      value="Reset">
  </form>
  <?php
    //If Upload-Form Password is correct and files are uploaded to
    server parse them and write content into database
    if (isset($_POST['password']) AND $_POST['password']==$userpass){
      if (isset($_FILES['uploadfasta']['tmp_name']) AND
        $_FILES['uploadfasta']['tmp_name']){
        echo'<p>Uploaded fasta-File (.parsefasta(
          $_FILES['uploadfasta']['tmp_name']).' data sets)';
        }
      if (isset($_FILES['uploadpsort']['tmp_name']) AND
        $_FILES['uploadpsort']['tmp_name']){
        echo'<p>Uploaded pSort-File
          (.parsepsort($_FILES['uploadpsort']['tmp_name']).'
          data sets)';
        }
      if (isset($_FILES['uploadpfam']['tmp_name']) AND
        $_FILES['uploadpfam']['tmp_name']){
        echo'<p>Uploaded pfam-File
          (.parsepfam($_FILES['uploadpfam']['tmp_name']).'
          data sets)';
        }
      if (isset($_FILES['uploadblast']['tmp_name']) AND
        $_FILES['uploadblast']['tmp_name']){
        echo'<p>Uploaded blast-File
          (.parseblastfile($_FILES['uploadblast']
            ['tmp_name']).' data sets)';
        }
    }else{
      echo'<p>To upload files please enter the correct
        password!</p>';
    }
  ?>
  <p>&copy; Bj&ouml;rn Peters 2012</p>
</body>
</html>

```

8. Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Möglichkeit meine Promotion an seinem Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München durchführen zu können und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Kögel-Knabner, Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz und Herrn Prof. Dr. Vogel möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes bzw. Zweit- und Drittprüfers in meiner Promotion danken.

Dr. Armin Ehrenreich möchte ich für die Bereitstellung des Themas und die gute wissenschaftliche Betreuung in vielen Besprechungen und weiteren Diskussionen, sowie für die Durchsicht der Manuskripte dieser Dissertation und meiner Veröffentlichungen danken.

Natürlich gilt mein Dank auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Studenten des Lehrstuhls. Besonders bedanke ich mich dabei bei meinen Laborkollegen der AG Ehrenreich Anja, Bernadette, Claudia, Daniel, David, Desiree, Justyna, Katharina, Liu, Marco, Markus, Melanie, Michael und Xu, die mit Diskussionen, Tipps, Tricks und guter Stimmung eine sehr große Hilfestellung bei der Durchführung meiner Arbeit waren. Der AG Ludwig danke ich für die Hilfe bei Problemen mit ARB. Besonders bedanken möchte ich auch bei unserer Bioinformatikerin Hedwig für die anregenden Diskussionen im Bereich der (Bio-)Informatik.

Dirk und Tine möchte ich für die detaillierte Durchsicht meines Manuskripts danken.

Meiner Familie danke ich für die jahrelange Unterstützung und dafür dass sie mir in meinem Leben so vieles ermöglicht haben.

And last but not least möchte ich mich bei der wichtigsten Person meines Lebens bedanken, meiner Verlobten Tine, dass sie mich seit meinem Abitur mit viel Liebe unterstützt und begleitet.

9. Lebenslauf

- 11/2009 – 09/2012 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion) am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München**
Thema: Entwicklung eines Systems zur Expression von membranständigen Dehydrogenasen aus einem Metagenom von Essigsäurebakterien in *Gluconobacter oxydans*
(Prof. Dr. Wolfgang Liebl, AG Dr. Armin Ehrenreich)
- 10/2007 – 09/2009 **Masterstudium der Molekularen Biotechnologie an der Technischen Universität München**
Masterarbeit: Reaktionstechnische Charakterisierung und Metabolomanalyse von rekombinanten Hefen zur Produktion von Bernsteinsäure
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik
(Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz)
Schwerpunkte:
 - Molekulare Mikrobiologie
 - Bioverfahrenstechnik
 - Lebensmittelbiotechnologie
 - Protein Engineering
- 08/2008 – 01/2009 **Auslandssemester an der Uppsala Universitet in Schweden**
Schwerpunkte:
 - Microbial and Chemical Genetics
 - Protein Engineering
 - Schwedisch
- 10/2004 – 09/2007 **Bachelorstudium der Molekularen Biotechnologie an der Technischen Universität München**
Bachelorarbeit: Das *Arabidopsis thaliana*-Gen ENHANCER OF PINOID, Expressionsanalysen und Etablierung von Reporter-gen-Konstrukten,
Lehrstuhl für Genetik (Prof. Dr. Alfons Gierl)
- 10/2003 – 07/2004 Zivildienst in der Rehabilitationsklinik Wendelstein, Bad Aibling
- 09/1994 – 07/2003 **Karolinen-Gymnasium Rosenheim**
Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse: Biologie, Mathematik
- 09/1990 – 07/1994 **Grundschule Aising, Rosenheim**
- 16.06.1983 **Geburt in Rosenheim**