

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

## **Entwicklung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems für Acetobacteraceae**

David Kostner

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.

Vorsitzender:

Univ. -Prof. Dr. Ralph Hückelhoven

Prüfer der Dissertation

1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 16.12.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.02.2014 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung .....	1
1. Die Familie der Acetobacteraceae.....	1
2. <i>Gluconobacter oxydans</i> - Physiologie, Anwendungen und Perspektiven.....	3
3. <i>G. oxydans</i> DSM 3504 und ATCC 621H im Vergleich.....	5
4. Molekularbiologische Werkzeuge - Deletionssysteme .....	5
5. Restriktionssysteme - Schutzmechanismen gegen Fremd-DNA .....	8
6. Zielsetzung der Arbeit .....	11
II. Material und Methoden.....	12
1. Bakterienstämme und Plasmide .....	12
2. Chemikalien und Enzyme .....	17
3. Medien, Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung der Organismen .....	17
3.1 Stammspezifische Medien.....	17
3.2 Medienzusätze.....	20
3.3 Kultivierungsbedingungen .....	20
3.4 Stammhaltung.....	21
3.5 Bestimmung der optischen Dichte.....	21
3.6 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate .....	21
3.7 Kontaminationskontrollen .....	22
4. Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	22
4.1 Isolierung genomischer DNA.....	22
4.2 Fällung von Nukleinsäuren mit Isopropanol/Ethanol.....	23
4.3 Isolierung genomischer DNA mit „Master Pure“ Kit.....	23
4.4 Plasmidisolierung durch Axyprep Plasmid Miniprep Kit .....	23
4.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsüberprüfung der DNA .....	24
4.6 Agarose Gelelektrophorese .....	24
4.7 Präparative Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	25
4.8 Analytische PCR zur Fragment- und Klonüberprüfung .....	26
4.9 PCR zur Fusionierung von Fragmenten .....	27
4.10 Klonierung von PCR Produkten (enzymatisch) .....	31
4.11 Ligase-freie Klonierung über Hybridisierung .....	32
4.12 Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
4.13 Überprüfung von Plasmiden mittels Restriktionsverdau.....	35
4.14 Konjugation von <i>Gluconobacter</i> .....	35
4.15 Transformation von <i>Gluconobacter</i> durch Elektroporation .....	36

4.16 Bestimmung der Transformationseffizienz / -frequenz von <i>G. oxydans</i> .....	37
4.17 Insertion von Deletionen in <i>G. oxydans</i> .....	38
4.18 Überprüfung von DNA Sequenzen über Sequenzanalyse .....	40
4.19 Überprüfung von Deletionen mittels <i>Southern Blot</i> .....	40
5. RNA Arbeitstechniken und RLM - Race .....	43
5.1 Vorbereitung von Arbeitsgeräten und Lösungen.....	43
5.2 Isolierung von RNA aus <i>G. oxydans</i> .....	43
5.3 DNA Hydrolyse und Kontroll-PCR .....	44
5.4 Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung von RNA.....	45
5.5 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	45
5.6 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR) .....	45
5.7 Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten mit RLM Race.....	46
6. Nachweis von Enzymaktivität.....	49
7. Analytische Verfahren zur Wachstumscharakterisierung .....	51
7.1 Klassische Wachstumsdokumentation im Erlenmeyerkolben.....	51
7.2 Wachstumsdokumentation mittels RAMOS .....	51
7.3 Detektion von Substratumsätzen mittels HPLC .....	52
7.4 Wachstumsanalysen mittels BioLector .....	53
III. Ergebnisse .....	55
1. Etablierung eines markerfreien <i>in frame</i> Deletionssystems .....	55
1.1 Auswahl eines geeigneten Gegenselektionsmarkers .....	55
1.2 Konstruktion der Basisvektoren für ein <i>codA</i> basiertes Deletionssystem .....	56
1.3 Anwendung des <i>cod</i> -Deletionssystems in <i>G. oxydans</i> DSM 3504.....	58
1.4 Etablierung des <i>cod</i> -Deletionssystems in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H.....	61
1.5 Untersuchung des Einflusses von <i>codB</i> auf das <i>cod</i> -Deletionssystem.....	64
1.6 Studie zur Verwendung eines replizierenden Vektors für das <i>cod</i> -Deletionssystem .....	66
1.7 Etablierungsmöglichkeiten des <i>cod</i> -Deletionssystems in weiteren Acetobacteraceae .....	70
2. Untersuchung der Wachstumscharakteristiken von <i>G. oxydans</i> DSM 3504 .....	73
2.1 Genomische Unterschiede zwischen <i>G. oxydans</i> DSM 3504 und ATCC 621H.....	73
2.2 Deletion der <i>ndh</i> in <i>G. oxydans</i> DSM 3504.....	74
2.3 Deletion der <i>tpiA</i> in <i>G. oxydans</i> DSM 3504.....	76
2.4 Erzeugung einer <i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta ndh \Delta tpiA$ Doppelmutante.....	78
2.5 Deletion der <i>g2dh</i> in <i>G. oxydans</i> DSM 3504.....	79
2.6 Überexpression von <i>ndh</i> in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H .....	80
2.7 Wachstumsanalyse der $\Delta ndh$ , $\Delta tpiA$ , $\Delta ndh/\Delta tpiA$ Mutanten im klassischen Verfahren .....	80
2.8 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta ndh$ mit BioLector und RAMOS.....	83
2.9 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta tpiA$ mit BioLector und RAMOS .....	86
2.10 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta tpiA \Delta ndh$ mit BioLector und RAMOS.....	88

2.11	Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta g2dh$ mit BioLector und RAMOS.....	89
2.12	Wachstumsdokumentation des ATCC 621H pAJ78 mit BioLector und RAMOS.....	90
3.	Untersuchung von Restriktionssystemen in Essigsäurebakterien .....	94
3.1	Suche nach potentiellen Restriktionssystemen mittels ReBase Datenbank .....	94
3.2	Deletion des Typ II Restriktionssystems in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H $\Delta upp$ .....	96
3.3	Deletion des Typ I Restriktionssystems in ATCC 621H $\Delta upp$ .....	97
3.4	Deletion des Typ I Restriktionssystems in DSM 3504.....	100
3.5	Experimentelle Bestimmung der Transformationseffizienzen / -frequenzen.....	101
4.	Etablierung eines vektorbasierten Expressionssystems in <i>G. oxydans</i> .....	104
4.1	Konstruktion eines neuartigen <i>E. coli</i> – <i>G. oxydans</i> Shuttlevektors (pKOS4beta) .....	104
4.2	Erprobung der Replikationsfähigkeit und Persistenz von pKOS4beta in <i>G. oxydans</i> .....	105
4.3	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts der Alkohol Dehydrogenase.....	108
4.4	Konstruktion eines Expressionsvektors mit ADH Promotor.....	110
4.5	Überprüfung des Expressionssystems mittels $\beta$ -Galaktosidase Assay.....	111
IV.	Diskussion .....	114
1.	Etablierung eines markerfreien <i>in frame</i> Deletionssystems .....	114
1.1	Auswahl des <i>cod</i> Operons als Gegenselektionsmarker .....	114
1.2	Etablierung des <i>cod</i> Deletionssystems in <i>G. oxydans</i> .....	116
1.3	Einfluss von <i>codB</i> auf das <i>cod</i> Deletionssystem .....	118
1.4	Einfluss des Suizidvektors auf die Funktionalität des Deletionssystems .....	118
1.5	Etablierungsmöglichkeiten in weiteren Essigsäurebakterien.....	119
2.	Untersuchung der Wachstumscharakteristiken von <i>G. oxydans</i> DSM 3504 .....	121
2.1	Einfluss der <i>ndh</i> Deletion auf das Wachstum von <i>G. oxydans</i> .....	121
2.2	Einfluss der <i>tpiA</i> Deletion auf das Wachstum von DSM 3504 .....	126
3.	Untersuchung von Restriktionssystemen in <i>G. oxydans</i> .....	129
3.3	Auswirkungen der Inaktivierung des Typ II Restriktionssystems in ATCC 621H.....	129
3.4	Auswirkungen der Inaktivierung des Typ I Restriktionssystems in <i>G. oxydans</i> .....	130
4.	Etablierung eines Vektorbasierten Expressionssystems in <i>G. oxydans</i> .....	133
4.5	Konstruktion und Auswahl des Shuttlevektors .....	133
4.6	Erprobung des Expressionssystems.....	135
V.	Zusammenfassung.....	136
VI.	Literaturverzeichnis .....	138
Anhang	.....	148

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
AdoMet	S-Adenosyl Methionin
Amp	Ampicilin
a. u.	willkürliche Einheit
ATCC	American Type Culture Collection
B	Nukleobase, steht für C, G oder T
bp	Basenpaar
C	Pyrimidinbase Cytosin
Cef	Cefoxitin
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
dest	destilliert
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikrobiologie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDP	Entner-Duodoroff-Weg
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
EP	Elektroporationsmedium
<i>et al.</i>	und weitere
FC	5-Fluorocytosin
FU	5-Fluorouracil
F-UMP	5-Fluorouridinmonosphat
G	Purinbase Guanin
g	Gramm
<i>g2dh-a / -b</i>	Abkürzungen für die Gene der beiden Gluconat 2 Dehydrogenase UE (keine definierte Genbe- zeichnung)

GV	Glucose-Vollmedium
h	Zeiteinheit Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	Reinstwasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
L	Liter
<i>lacZ</i>	Gen der $\beta$ -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>
LB	Luria-Bertani-Medium
LKZ	Lebendkeimzahl
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
$\mu$	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
M	Nukleobase, steht für Base A oder C
M	molar (mol/L)
mb	Megabasenpaare
MCS	Multiklonierungsstelle
min	Minute(n)
mRNA	Messenger RNA
MV	Mannitol Vollmedium
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
NAD(H)	Nikotin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
<i>ndh</i>	In der vorliegenden Arbeit als Abkürzung für das NDH-2 codierende Gen verwendet (keine definierte Genbezeichnung)
NDH	NADH Dehydrogenase
OD <sub><math>\lambda</math></sub>	Optische Dichte bei $\lambda$ nm
ORF	Offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPP	Pentosephosphatweg

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (ca. 22°C)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sldAB	Untereinheiten der Polyol-DH
SSC	Saline Sodium Citrat
T	Desoxythymidin
Tab.	Tabelle
TAP	Nikotinsäure Pyrophosphatase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TM	Schmelztemperatur des Primers
TPI	Triosephosphat Isomerase
Trafo	Transformation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	Transfer RNA
U	Unit (Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
<i>upp</i>	Gen für Uracil Phosphoribosyl Transferase
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett Strahlung
V	Volt, elektrische Spannung
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## I. Einleitung

### 1. Die Familie der Acetobacteraceae

Essigsäurebakterien sind seit Jahrtausenden eng mit der Kulturgeschichte des Menschen verknüpft. Die konservierenden und gleichzeitig aromatisierenden Eigenschaften von Essig werden bis heute in den meisten Kulturkreisen hoch geschätzt. Der Speiseessig stellt das bekannteste Erzeugnis der Acetobacteraceae dar, ist aber nur eines von vielen unvollständig oxidierten Produkten, die aus Zuckern, Alkoholen oder Polyolen entstehen (De Ley *et al.* 1984). Diese Eigenschaft, den verfügbaren Kohlenstoff nur partiell zu oxidieren und die unvollständig oxidierten Produkte direkt auszuscheiden, hat einige Organismen dieser Familie zu industriell sehr häufig genutzten Mikroorganismen gemacht (Raspor & Goranovic 2008).

Die Familie der Acetobacteraceae gehört zur Ordnung der Rhodospirillales in der Klasse der Alphaproteobacteria und umfasst aktuell etwa 30 Gattungen, die zwar systematisch zusammengehören, sich allerdings in Ihrer Physiologie und in Bezug auf ihre Habitate zum Teil unterscheiden (Sievers & Swings 2005). Alle Vertreter sind aerob und ihrem Zuckermetabolismus fehlt ein glycolytisches Schlüsselenzym: die Phosphofruktokinase (Attwood *et al.* 1991, Leisinger 1965). Zucker werden daher vor allem über den Pentosephosphatweg (PPP) verstoffwechselt (Sievers & Swings 2005). Der Zentralstoffwechsel unterscheidet sich bei den einzelnen Gattungen aufgrund verschiedener genotypischer Voraussetzungen bzw. Habitat bezogener Anpassungen. Bislang konnte vor allem in Zellulose-synthetisierenden Vertretern die wichtige Rolle des Entner-Doudoroffwegs (EDP) nachgewiesen werden, die genetische Ausstattung für diesen Stoffwechselweg konnte aber auch in anderen Gattungen der Familie gefunden werden (Prust *et al.* 2005). Einige Arten besitzen zudem einen Glyoxylatzyklus, der es ihnen ermöglicht auf Substraten zu wachsen, die nur C2 Verbindungen wie Ethanol enthalten (De Ley *et al.* 1984, Leisinger 1965). Die Kerngruppe, d.h. Essigsäurebakterien im engeren Sinne, umfasst 7 Gattungen, darunter *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia* und *Granulibacter* (Greenberg *et al.* 2006, Sievers & Swings 2005). Die Oxidation von Ethanol zu Acetat ist ein typisches Merkmal (Ruiz *et al.* 2000) und erfolgt bei den meisten Gattungen, wenngleich mit unterschiedlicher Effizienz (Greenberg *et al.* 2006). Die Gattung *Asaia* bildet dabei eine Ausnahme, eine Umsetzung von Ethanol zu Acetat konnte nicht dokumentiert werden (Deppenmeier & Ehrenreich 2009, Katsura *et al.* 2001). Man unterscheidet außerdem zwischen peroxidierenden Essigsäurebakterien, das sind Gattungen die Acetat weiter zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidieren (*Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Kozakia*),



sowie suboxidierenden Essigsäurebakterien (*Gluconobacter*), die Acetat nicht weiter oxidieren können (De Ley *et al.* 1984, Leisinger 1965). Essigsäurebakterien produzieren eine große Vielfalt an Exopolysacchariden wie Zellulose, Acetan und Laevan, die für die Biofilmbildung ausschlaggebend sind (Deppenmeier & Ehrenreich 2009). Die natürlichen Habitate sind Blüten, reife Früchte sowie alkoholhaltige Fermentationsprodukte (Sievers & Swings 2005). Essigsäurebakterien sind an sehr zuckerreiche Umgebungen angepasst, dies hat zur Folge, dass eine besonders effiziente Nutzung der Nährstoffe von zweitrangiger Bedeutung ist. Das erklärt auch das Charakteristikum der zahlreichen unvollständig oxidierten Stoffwechselprodukte in Essigsäurebakterien. Es kann als eine Anpassung an besonders substratreiche Umgebungen angesehen werden. Essentiell für einen Mikroorganismus in diesem Milieu ist nicht die erzeugte Energie pro Substratmolekül, sondern die Energie pro Zeiteinheit (Ehrenreich *et al.* 2005). Der pH Abfall im Medium aufgrund der Anhäufung unvollständig oxidierter Produkte verschafft den Essigsäurebakterien einen weiteren Selektionsvorteil durch die hervorragende Anpassung an saure Umgebungsbedingungen. Primäre Alkohole werden in der Regel zu Säuren umgesetzt und sekundäre Alkohole zu Ketonen. Verantwortlich für diese Oxidationen sind zahlreiche membranständige bzw. cytosolische Dehydrogenasen (Adachi *et al.* 2003) mit breiten Substratspektren, die direkt mit der Atmungskette verbunden sind. Die Elektronentransportketten von Essigsäurebakterien enthalten Cytochrom *c*, Ubiquinol und eine terminale Ubiquinoloxidase vom Cytochrom *o* - oder Cytochrom *d* - Typ (Matsushita *et al.* 1994). Ausnahmen bilden hier *Acetobacter* mit einer Cytochrom *a<sub>1</sub>* Ubiquinoloxidase und *Acidomonas methanolica* der bei Wachstum in Methanol eine terminale Cytochrom-*c*-Oxydase nutzt. Als Elektronenträger wird bei den meisten Gattungen Ubichinon des Typs Q-10 genutzt, *Acetobacter* hingegen besitzt vor allem den Q-9 Typ (Sievers & Swings 2005).

Die Industrie hat das Potential von Essigsäurebakterien als Produktionsstämme schon seit einiger Zeit erkannt. Die Umsetzungen bei oxidativen Fermentationen erfolgen mit hohen Geschwindigkeiten sowie auf regio- und stereospezifische Weise. Dadurch wird es ermöglicht das Problem der Racemisierung bei chemischen Synthesen zu vermeiden. Die Charakterisierung und Nutzung vor allem der membranständigen Dehydrogenasen ist daher von großem Interesse. Dies eröffnet verschiedenste Einsatzgebiete in biotechnologischen Verfahren, für Oxidationsschritte, die durch klassische chemische Synthesen gar nicht möglich, oder nur mit großem technischen, energetischen und finanziellen Aufwand umsetzbar sind (Deppenmeier *et al.* 2002). Ebenso ergeben sich interessante Möglichkeiten im Bereich der Exopolysaccharide. Die Zellulose, die von manchen Arten gebildet wird, ist hochkristallin sowie von größter Reinheit (Hornung *et al.* 2006, Sunagawa *et al.* 2013). Aus biotechnologischer Sicht steht der Einsatz

von Essigsäurebakterien als Produzenten und Biokatalysatoren erst am Anfang. Die steigende Anzahl an verfügbaren Gensequenzen und das wachsende Verständnis der Physiologie lassen die Vielfalt an Optimierungsmöglichkeiten erahnen, die in naher Zukunft möglich sein werden.

## 2. *Gluconobacter oxydans* - Physiologie, Anwendungen und Perspektiven

Die Gattung *Gluconobacter* besteht aus suboxidierenden Essigsäurebakterien: Acetat bzw. Lactat kann nicht zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> umgewandelt werden. Die Gattung kommt bevorzugt in zuckerreichen Habitaten vor und besitzt im Gegensatz zu *Acetobacter* und *Gluconacetobacter* eine deutlich geringere Affinität zu alkoholreichen Umgebungen. Die optimalen Wachstumsbedingungen sind Temperaturen von 25–30° bei pH Werten von 5–6. Die besten Kohlenstoffquellen für die Anzucht sind Mannitol und Glucose (Sievers & Swings 2005).

Das Genom von *G. oxydans* Stamm ATCC 621H wurde von Prust *et al.* (2005) vollständig sequenziert und ermöglichte detaillierte Einblicke in die Physiologie von *Gluconobacter*. Der Stamm verfügt über einen unvollständigen Tricarbonsäurezyklus (TCA), der durch das Fehlen der Succinat-Dehydrogenase unterbrochen ist. Der Glyoxylatzyklus, eine wichtige Möglichkeit um C<sub>4</sub>-Verbindungen auf Basis von Acetyl-CoA und Glyoxylat zu synthetisieren, fehlt zur Gänze. Damit erklärt sich sowohl der suboxidierende Charakter der Gattung, wie auch das Unvermögen auf C<sub>2</sub>-Substraten wachsen zu können (Deppenmeier & Ehrenreich 2009, Prust *et al.* 2005). Außerdem konnte die Abwesenheit der Phosphofruktokinase bestätigt werden, ein Schlüsselenzym für die Funktionalität der Glykolyse. Sämtliche für den PPP notwendigen Enzyme konnten nachgewiesen und die Bedeutung des PPP für den Zentralstoffwechsel untermauert werden. Ebenso verfügt *G. oxydans* über die komplette Enzymausstattung für den EDP. Die Gluconeogenese ist nicht funktionell, Phosphoenolpyruvat (PEP) kann aufgrund der fehlenden PEP Synthetase bzw. analoger Enzyme nicht aus Oxaloacetat gebildet werden, ein weiterer Grund für das fehlende Wachstum auf C<sub>2</sub>-Substraten (Prust *et al.* 2005).

Die hohen Oxidationsraten zeichnen die Gattung aus und machen sie zu interessanten Biokatalysatoren. *G. oxydans* teilt mit vielen seiner Verwandten die Eigenschaft eine große Auswahl an Zuckern, Zuckeralkoholen und Polyolen unvollständig zu oxidieren (Deppenmeier *et al.* 2002). Das enorme oxidative Potential von *G. oxydans* hängt mit den zahlreichen Oxidoreduktasen im Genom zusammen, welche in zwei Hauptkategorien unterteilt werden können: Auf der einen Seite die löslichen, cytosolisch lokalisierten Dehydrogenasen und auf der anderen Seite die membranständigen Dehydrogenasen (Matsushita *et al.* 1994). Vor allem letztere sind

von hoher biotechnologischer Bedeutung, da ihre katalytischen Zentren in den periplasmatischen Raum gerichtet sind. Zum einen müssen Substanzen, die als Energiequelle dienen somit nur in den periplasmatischen Raum gelangen und zum anderen werden die zahlreichen unvollständig oxidierten Produkte, die während des Wachstums entstehen über die Porine direkt ins Medium abgegeben und müssen nicht aufwändig exportiert werden (Deppenmeier *et al.* 2002). Die bei diesen Oxidationsreaktionen gewonnenen Elektronen werden auf Ubichinon übertragen und dadurch in die Atmungskette geschleust (Matsushita *et al.* 1987). Durch den Elektronentransport entsteht ein elektrochemischer Gradient, die Kopplungseffizienz ist allerdings nicht groß, sodass die meiste Energie wieder in Form von Wärme entweicht (Matsushita *et al.* 1994). Dieser Umstand, kombiniert mit der unvollständigen Oxidation der Stoffwechselprodukte, der kurzen Atmungskette, dem generellen Fehlen entscheidender Komponenten der Atmungskette (Komplex I, Cytochrom-*c*-Oxydase) trägt vermutlich zur geringen Biomassebildung von *Gluconobacter* bei (Deppenmeier *et al.* 2002, Prust *et al.* 2005). Die vorhandene Atmungskette ist offensichtlich auf hohen Durchsatz und nicht auf maximale Energieausbeute pro Elektron ausgelegt, dies stellt eine sinnvolle Anpassung bei einer Lebensweise in substratreichen Habitaten dar.

*G. oxydans* wird bereits in verschiedenen biotechnologischen Produktionsprozessen genutzt z.B. für die Herstellung von L-Sorbose, D-Gluconsäure, Dihydroxyaceton und Vitamin C (Gupta *et al.* 2001). Die niedrigen Biomasseproduktionsraten stellen aber generell ein Problem beim industriellen Einsatz von Essigsäurebakterien dar (Krajewski 2008, Luttik *et al.* 1997). *G. oxydans* besitzt zwar biotechnologisch interessante und äußerst vielversprechende Eigenschaften, liegt aber bei der Produktion von Biomasse, im Vergleich zu anderen Gattungen der Familie, im hinteren Bereich (Wei *et al.* 2009). Eine Steigerung der Biomasseproduktion unter Beibehaltung der hoch oxidativen Eigenschaften von *G. oxydans* wäre eine interessante Möglichkeit die Produktivität für eine Vielzahl an Produktionsprozessen zu erhöhen. Einen möglichen Schlüssel dazu könnte der Stamm *G. oxydans* DSM 3504 liefern, ein naher Verwandter von ATCC 621H, der wesentlich höhere Biomasseproduktionsraten erreicht.

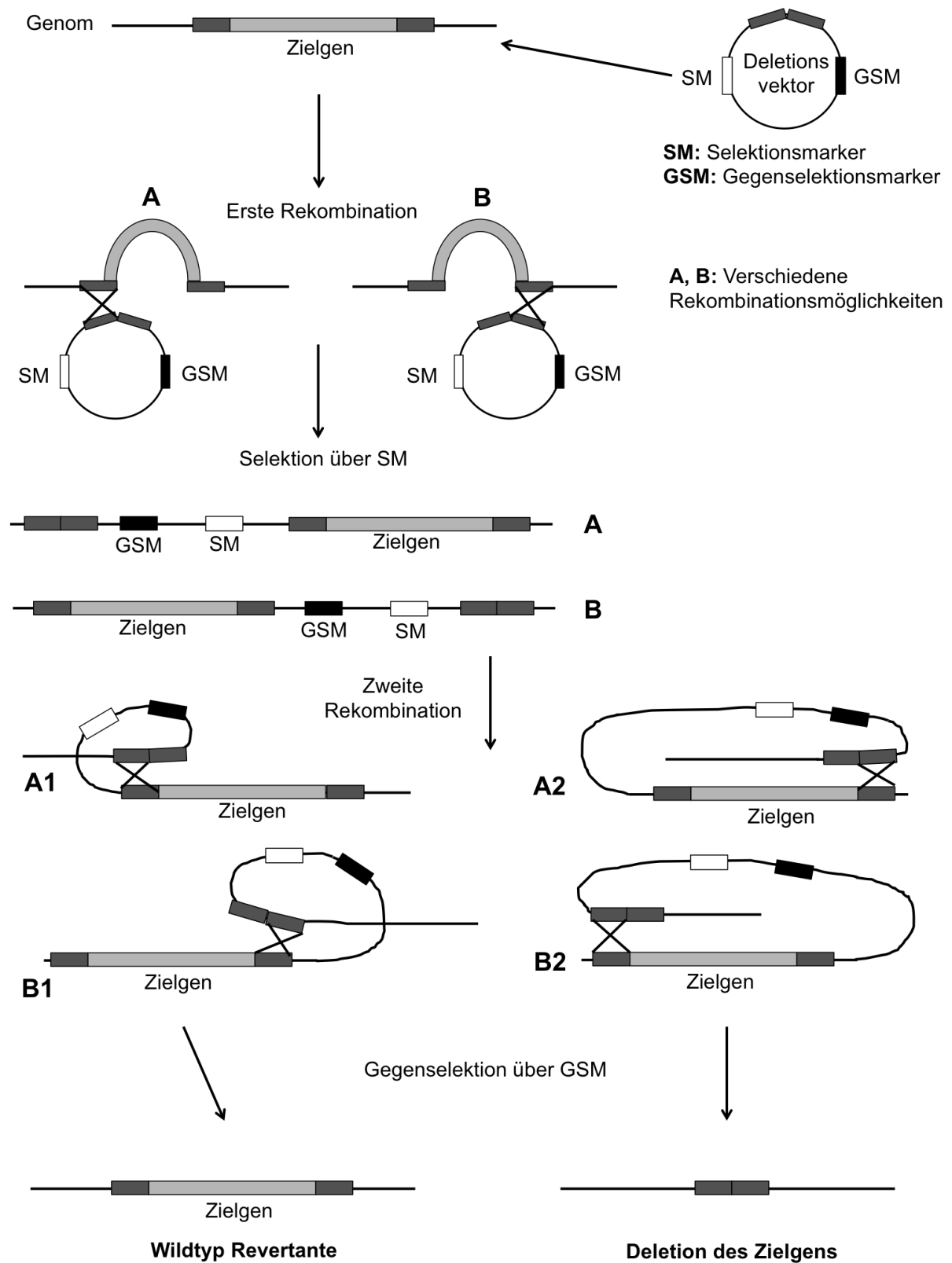
### 3. *G. oxydans* DSM 3504 und ATCC 621H im Vergleich

Der Stamm DSM 3504 wurde ursprünglich für die Produktion von 2-keto-L-Gluconsäure selektiert (Motizuki *et al.* 1966), die Menge an erzeugter Biomasse ist signifikant höher als im Vergleichsstamm ATCC 621H (Elfari *et al.* 2005). Um eine umfassende Untersuchung der stark divergierenden Wachstumscharakteristiken dieser zwei verwandten Stämme zu ermöglichen wurde auch das Genom von DSM 3504 vollständig sequenziert (Kostner in Reviewphase), (Junker 2009). Der Vergleich der beiden Stämme auf Basis der Sequenzdaten zeigte eine sehr hohe Ähnlichkeit auf Aminosäurebasis (98 %) zwischen den beiden Stämmen. Der GC-Gehalt beträgt bei beiden Stämmen etwa 61 %. Im Stamm DSM 3504 kommen keine Plasmide vor, Stamm ATCC 621H enthält hingegen fünf Plasmide mit Größen von 2,6 KB bis 163 KB. Daraus ergibt sich auch eine etwas geringere Anzahl an offenen Leserahmen (ORF) in DSM 3504 (2465 im Vergleich zu den 2668 ORF's in DSM 3504). Bei den Genen des Zentralmetabolismus gibt es kaum Unterschiede zwischen den Stämmen. Die Glykolyse wird bei beiden Stämmen von der fehlenden Phosphofruktokinase unterbrochen. Der PPP ist in einem Gencluster organisiert wie in ATCC 621H, alle Enzyme konnten nachgewiesen werden. Ebenso konnten alle Gene für den EDP gefunden werden mit einer Ähnlichkeit auf Aminosäurebasis von 97 % zwischen den Stämmen, sowie für den unvollständigen TCA mit einer Ähnlichkeit von 98 %. Insgesamt konnten allerdings 345 ORF's in DSM 3504 gefunden werden, die in ATCC 621H vollkommen fehlen (Junker 2009, Prust *et al.* 2005). Diese Daten bilden eine wichtige Grundlage für eine detaillierte molekularbiologische Untersuchung der unterschiedlichen Wachstumscharakteristiken der beiden Stämme.

### 4. Molekularbiologische Werkzeuge - Deletionssysteme

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, beinhaltet die Familie der Acetobacteraceae eine große Anzahl an Vertretern mit erheblichem biotechnologischen Potential für zukünftige Anwendungen. Die zurzeit rasch anwachsende Anzahl an vollständig sequenzierten Genomen von Essigsäurebakterien bietet tiefe Einblicke in die Physiologie der entsprechenden Mikroorganismen. Um endgültige Aussagen treffen zu können ist allerdings eine ausführliche molekularbiologische Untersuchung unumgänglich. Molekularbiologische Werkzeuge ermöglichen dabei die Deletion und Komplementierung von Zielgenen mit nachfolgender Charakterisierung der mutierten Stämme. Der Einfluss einzelner Gene auf verschiedenste metabolische Vorgänge kann auf diese Weise untersucht werden und entsprechende Schlussfolgerungen können daraus

gezogen werden. Das Schlüsselwerkzeug, um molekularbiologische Untersuchungen an Bakterien durchführen zu können, ist ein effizientes und leicht anwendbares Deletionssystem. Bisher wurden die meisten Mutantenstämme von *Acetobacteraceae* durch das Einfügen von Antibiotikakassetten im Zielgen erzeugt (Hölscher & Görisch 2006, Hölscher *et al.* 2007). Ein solches *Knock-out* System bietet zwar eine einfache Möglichkeit Gene auszuschalten, allerdings können Polareffekte auf die Expression von strangabwärts gelegenen Genen dabei nie ausgeschlossen werden. Eine weitere Schwierigkeit bei der Anwendung solcher *Knock-out* Systeme ist der Verbleib der Antibiotikakassette im Genom. Die Erzeugung von Stämmen mit mehrfachen *Knock-outs* ist zudem aufgrund der limitierten Menge an einsetzbaren Resistenzkassetten schwer möglich. Daraus ergibt sich ein starker Bedarf nach Methoden zur Erzeugung von markerfreien, Leseraster-neutralen Deletionen. Derartige Deletionssysteme basieren üblicherweise auf einem zweistufigen Prozess. In einem ersten Schritt integriert sich der Deletionsvektor über homologe Flanken, welche vor oder hinter dem Zielgen liegen, ins Genom. Um die erfolgreiche Integration oder auch erste Rekombination sichtbarzumachen ist hierbei ein Selektionsmarker (in der Regel eine Antibiotikaresistenzkassette) auf dem Deletionsvektor erforderlich. Im zweiten Schritt erfolgt eine erneute Rekombination, bei welcher der Deletionsvektor wieder aus dem Genom entfernt wird. Hierfür ist ein Gegenselektionsmarker von Nöten. Dieser auf dem Vektor lokalisierte Gegenselektionsmarker erzeugt dabei eine Sensibilität auf ein entsprechendes Gegenselektionsmittel. Das Gegenselektionsmittel darf dabei keine toxische Wirkung auf Wildtypzellen haben. Nach der Entfernung des Deletionsvektors kommt es entweder zur Wiederherstellung des Ursprungszustands oder zur erfolgreichen Deletion des Zielgens. Die Marker verbleiben nicht im Genom sondern werden mit dem Vektor entfernt (Abbildung 1). Eine entscheidende Voraussetzung für ein solches Deletionssystem ist demnach die Verfügbarkeit eines geeigneten Gegenselektionsmarkers. Das bisher bei *Gluconobacter* eingesetzte *sacB* basierte System erfüllte bedauerlicherweise nicht die gestellten Anforderungen (Gay *et al.* 1985, Hölscher *et al.* 2007). Die üblichen Ansätze für Deletionssysteme, die auf Gegenselektion basieren, bauen häufig auf Genen des Purin oder Pyrimidin Metabolismus auf. Beispiele für häufig genutzte Gene sind: *upp*, codierend für eine Phosphoribosyl Transferase, *pyrE/ura5* codierend für eine Oratat Phosphoribosyl Transferase oder *hpt* codierend für eine Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase (Boeke *et al.* 1984, Boeke *et al.* 1987, Fabret *et al.* 2002, Keller *et al.* 2009, Pritchett *et al.* 2004, Wagner *et al.* 2012). Die besagten Systeme basieren alle auf demselben Grundsatz, Purin- bzw. Pyrimidin-analoga werden zu toxischen Verbindungen konvertiert. Den Selektionsprozess überleben nur jene Zellen, denen das Enzym für diese spezifische Umwandlung fehlt.



**Abbildung 1: Darstellung der allgemeinen Funktionsweise eines markfreien Deletionssystems.** In A und B sind die verschiedenen Integrationsmöglichkeiten des Deletionsvektors ins Genom dargestellt. A1, A2, B1 und B2 zeigen die Rekombinationsmöglichkeiten auf durch die der Vektor das Genom wieder verlassen kann.

In einer vorhergehenden Arbeit wurde das *upp* Gen als Gegenselektionsmarker für ein Deletionssystem in *G. oxydans* ATCC 621H verwendet (Junker 2009, Peters *et al.* 2013). Das von diesem Gen codierte Enzym Uracil Phosphoribosyl Transferase ermöglicht unter normalen Umständen die Konversion von Uracil zu Uridinmonophosphat (Martinussen & Hammer 1994) und katalysiert bei der Zugabe des toxischen Analogons 5-Fluorouracil (FU) die Umwandlung zu 5-Fluorouridinmonophosphat (F-UMP). In den darauffolgenden Schritten wird aus F-UMP 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat gebildet, diese Verbindung wirkt als direkter Inhibitor der Thymidylat Synthase und behindert dadurch die DNA Reparatur- und Replikationsmaschinerie (Neuhard 1982). Für das Deletionssystem (siehe auch Abbildung 4, S. 39) wurde ein *G. oxydans* ATCC 621H Stamm mit deletiertem *upp* Gen erstellt. Zum Durchführen einer Deletion wurden die Zellen in Vollmedium mit FU angezogen. Ein am Zielgen integrierter Deletionsvektor mit dem *upp* Gen hatte dabei die Funktion den selektiven Druck zu erzeugen, um Mutanten mit einem Verlust des Vektors zu selektieren (Peters *et al.* 2013). Das System arbeitet zwar mit hoher Effizienz, ein entscheidender Nachteil daran ist aber, dass die Methode ausschließlich in Stämmen mit einer *upp* Mutation funktioniert. Daraus ergibt sich eine Auxotrophie für Thymidin in allen *upp* Deletions- und Folgestämmen. Diese Voraussetzung verhindert den breiten Einsatz des Systems und schränkt die Anwendungsmöglichkeiten in den zahlreichen biotechnologisch interessanten Stämmen aus der Familie der Acetobacteraceae stark ein. Das Fehlen einer generellen Deletionsmethode stellt einen der Gründe dar, weshalb bisher nur wenige Stämme dieser Familie auf molekularbiologischer Ebene untersucht und manipuliert werden konnte.

Der kürzlich sequenzierte Stamm *G. oxydans* DSM3504 hat sich als schwer manipulierbar erwiesen (Junker, unveröffentlicht), der Bedarf nach einem funktionierenden Deletionssystem ist gerade deshalb besonders groß.

## **5. Restriktionssysteme - Schutzmechanismen gegen Fremd-DNA**

Restriktionssysteme dienen vorwiegend dem Schutz der Mikroorganismen vor extrazellulärer Fremd-DNA. Aktive Systeme erschweren daher das Einführen von Fremd-DNA mittels Vektoren in manchen Organismen erheblich. Besagte Systeme kommen in einer großen Anzahl von Bakterienarten vor. Weitere Funktionen neben dem Schutz vor nicht zellulärer DNA werden gegenwärtig noch diskutiert, darunter die Beteiligung an Rekombinations- und Transpositionseignissen (Pingoud & Jeltsch 2001). Restriktionssysteme bestehen mindestens aus einer

Restriktionsendonuklease und einer DNA modifizierenden Methyltransferase, welche die zelluläre DNA kennzeichnet, um sie vor dem Angriff und Verdau durch das zelleigene Restriktionssystem zu schützen (Wilson 1991). Eine Ausnahme bilden Systeme, die nur methylierte DNA angreifen, in diesem Fall ist die Endonuklease mit keinem Modifikationsenzym assoziiert (Murray 2000). Neben einigen einzeln vorkommenden Restriktionsendonukleasen lassen sich die meisten Restriktionssysteme in drei Klassen einteilen. Die Einteilung ist zwar nach wie vor sinnvoll, allerdings sind inzwischen auch eine Vielzahl an Zwischenformen bekannt, die sich der klassischen Einteilung entziehen (Pingoud & Jeltsch 2001).

Die Typ I Systeme gehören zu den komplexesten. Sie bestehen aus den drei Proteinen R (Restriktionsendonuklease), M (Modifikationsenzym - Methyltransferase) und S (Spezifitätsfaktor) die schließlich das modifizierende und verdauende Restriktionsenzym in seiner Gesamtheit bilden. Die Erkennungssequenz ist asymmetrisch und zweiteilig, sie umfasst zwei Subsequenzen mit einer Länge von je drei bzw. vier bp, die von einem unspezifischen 6 - 8 bp langen Abstandshalter getrennt sind. Die Spaltung der DNA erfolgt in beträchtlicher, äußerst variabler Entfernung von der Erkennungssequenz. Die S-Untereinheit fungiert als Spezifitätsfaktor sowohl für die ATP und AdoMet abhängige Endonuklease wie auch für die AdoMet abhängige Methyltransferase (Wilson 1991). Die M- und S-Untereinheiten werden vom selben Promotor reguliert, die R-Untereinheit besitzt in der Regel einen eigenen Promotor (Murray 2000).

Die Typ II Restriktionssysteme gehören zu den einfachsten und meist verbreitetsten Systemen. Die Endonuklease und Methyltransferase sind voneinander getrennte Proteine. ATP ist für die Endonukleaseaktivität nicht erforderlich,  $Mg^{2+}$  ist der essentielle Cofaktor für die meisten Enzyme dieses Typs. Die Erkennungssequenz ist stets symmetrisch und umfasst vier bis acht spezifische Nukleotide, kann aber auch durch zusätzliche unspezifische Nukleotide unterbrochen werden. Die Spaltung der DNA erfolgt symmetrisch innerhalb der Erkennungssequenz. Die M- und R-Gene kommen oft hintereinander in variabler Reihenfolge, sowohl konvergierend wie divergierend vor. Der Typ II wird zusätzlich in mehrere Subkategorien unterteilt, zu denen u. a. die Typ IIs Restriktionssysteme gehören, die eine asymmetrische, ununterbrochene Erkennungssequenz mit vier bis sieben Nukleotiden besitzen. Für die Modifikation sind z. T. zwei Methyltransferasen zuständig (Wilson 1991). Die Endonukleasen der Typ II Systeme werden aufgrund ihrer Eigenschaften in Methoden für die Analyse und Klonierung von DNA eingesetzt (Pingoud & Jeltsch 2001).

Bei den Typ III Restriktionssystemen formen R- und M-Protein einen Komplex, der für Restriktion und Modifikation zuständig ist. Die Erkennungssequenzen sind asymmetrisch und ununterbrochen mit einer Länge von fünf bis sechs Nukleotiden. Die Spaltung erfolgt in einem



Abstand von etwa 25 Nukleotiden, also in relativer Nähe zur Erkennungssequenz. Die Methylierung erfolgt nur auf einem Strang der Erkennungssequenz, was anscheinend der Regel der doppelten Methylierung widerspricht, die den Erhalt der Methylierung auch nach der Replikation gewährleistet. Allerdings erfolgt der Verdau der DNA nur, wenn zwei unmodifizierte Sequenzen mit unterschiedlichen Orientierungen vorhanden sind. Da sowohl R- wie M-Protein miteinander konkurrieren, kann der Komplex gleichzeitig in einer Reaktion die DNA methylieren bzw. beschneiden, was zu einem unvollständigen Verdau der DNA führt (Wilson 1991). Da in dieser Arbeit die Entwicklung einer effizienten Methode zur Einführung von Gendelektionen in Essigsäurebakterien das zentrale Thema ist, kommt der Verbesserung der Transformationseigenschaften der Stämme eine wichtige Rolle zu. Vor allem ist daher die Aufklärung des Einflusses eventuell vorhandener Restriktionssysteme auf die Transformationseffizienz der Stämme von großem Interesse.

## 6. Zielsetzung der Arbeit

### Entwicklung und Anwendung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems

Die Entwicklung und Etablierung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems für *G. oxydans* Stämme mit Anwendungsmöglichkeiten in weiteren Essigsäurebakterien sollte das Hauptziel der vorliegenden Arbeit darstellen. Im Vergleich zu den bisherigen Methoden sollten keine Mutationen mehr Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines solchen Systems sein. Das Deletionssystem war die Grundlage für sämtliche nachfolgenden Untersuchungen im Stamm *G. oxydans* DSM3504, in welchem bisher keine gezielten Gendeletionen durchgeführt werden konnten. Mit der Verfügbarkeit eines Deletionssystems sollte eine ausgiebige Untersuchung der Wachstumscharakteristiken des Stammes *G. oxydans* DSM 3504 erfolgen. Die Aufklärung der wesentlich stärkeren Biomassenproduktion des Stammes DSM 3504 im Vergleich zu ATCC 621H sollte dabei im Vordergrund stehen. Nach der Betrachtung genomischer Unterschiede sollten gezielte Deletionen im Stamm DSM 3504 erfolgen und die Auswirkungen charakterisiert und analysiert werden.

Die Transformation mancher Stämme von Essigsäurebakterien kann sich u.a. aufgrund besonders aktiver Restriktionssysteme als schwierig erweisen. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit eventuelle Restriktionssysteme in *G. oxydans* aufgefunden gemacht und mittels Deletionstämmen auf ihre veränderten Transformationseigenschaften hin untersucht werden. Im Zentrum sollten dabei die *G. oxydans* Stämme ATCC 621H sowie DSM 3504 stehen.

Nachdem die Grundlage für die Manipulation von verschiedenen Stämmen der Essigsäurebakterien durch ein allgemein anwendbares Deletionssystem geschaffen wurde, sollte auch der Versuch unternommen werden ein weiteres wichtiges molekularbiologisches Werkzeug zu entwickeln: Ein leicht anwendbares vektorbasiertes Expressionssystem. Das System sollte dabei speziell auf die Expression membranständiger Dehydrogenasen zugeschnitten werden, die aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften biotechnologisch von größtem Interesse sind. Da die Expression membranständiger Proteine oft durch zu starke Promotoren erschwert wird, sollte das System nur native Promotoren enthalten. Dafür sollte der Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenasen experimentell bestimmt, in einen *E. coli* – *Gluconobacter* Shuttlevektor integriert und getestet werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Bakterienstämme und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Im Anhang finden sich zusätzlich alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit den dazugehörigen Sequenzen.

Tabelle 1: Übersicht der in der Arbeit verwendeten Organismen sowie der konstruierten Stämme

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk-), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal <sup>r</sup> ), <i>relA1</i> , D ( <i>lacZYAargF</i> ), U169, F80/ <i>lacZDM15</i>	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80/ <i>lacZDM15</i> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup>	Invitrogen (Carlsbad (CA), USA)
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>-</sup> , <i>hdsS20</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-Tra</i> <sup>+</sup> , <i>mH-1</i> carrying plasmid pRK2013	Boyer & Roulland-Dussoix (1969), Figurski & Helinski (1979)
<i>E. coli</i> K12 MG1655	F <sup>-</sup> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i>	Fu <i>et al.</i> (1991) Castellani & Chalmers 1919
<b>Acetobacteraceae</b>		
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H (DSM2343)	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	De Ley <i>et al.</i> (1984), Gillis (1980)
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>upp</i>	<i>upp</i> Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , FU <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Peters <i>et al.</i> (2013)
<i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ 0854 $\Delta$ 0855	Polyol Dehydrogenase ( <i>sldAB</i> ) Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>G. oxydans</i> 621H pKOS6a2567flank	Stamm mit integriertem pKOS6a in der GOX2567 flankierenden Region, FC <sup>S</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> 621H pKOS6b2567flank	Stamm mit integriertem pKOS6b in der GOX2567 flankierenden Region, FC <sup>S</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> 621H $\Delta upp \Delta 2567$	Deletionsstamm des Type I Restriktionssystems (GOX 2567-2569), FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> 621H $\Delta upp \Delta 1507$	Deletionsstamm des Type II Restriktionssystems (GOX 1507), FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> 621H $\Delta upp \Delta 1507 \Delta 2567$	Deletionsstamm des Typ I und Type II Restriktionssystems, , FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> 621H pAJ78	NADH Dehydrogenase ( <i>ndhI</i> ) Überexpressionsstamm	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> DSM 7145	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	De Ley (1961), Gosselé <i>et al.</i> (1983), Mason & Claus (1989)
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Motizuki <i>et al.</i> (1966)
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta 922$	Levansucrase (GLS_c09570) Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta 0541$	NADH Dehydrogenase ( <i>ndhI</i> ) Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta 0548$	Triosephosphate Isomerase ( <i>tpiA</i> ) Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta 0541 \Delta 0548$	NADH Dehydrogenase ( <i>ndhI</i> ) und Triosephosphate Isomerase ( <i>tpiA</i> ) Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta$ 0478	Gluconat 2 Dehydrogenase (GLS_c05030 ) Deletionsstamm, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta$ <i>hsdR</i>	Deletionsstamm des Type I Restriktionssystems (GLS_c02360), FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> DSM 5601	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Yamada <i>et al.</i> (1997)
<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1513	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Gosselé <i>et al.</i> (1983)
<i>Acidomonas methanolica</i> DSM 5432	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Urakami <i>et al.</i> (1989), Yamashita <i>et al.</i> (2004)
<i>Acidiphilium multivorum</i> DSM 11245	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Wakao <i>et al.</i> (1994)
<i>Granulibacter bethesdensis</i> DSM 17861	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	Greenberg <i>et al.</i> (2006)

Tabelle 2: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pAJ63a	Derivat von pK18mobGII, integrierender Deletionsvektor <i>gusA</i> entfernt, <i>upp</i> integriert, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , FU <sup>S</sup>	Peters <i>et al.</i> (2013)
pBBR1MCS-2	Expressionsvektor für <i>G. oxydans</i> , <i>lacZα</i> ; <i>mob</i> , <i>rep</i> , Km <sup>R</sup>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pJV17	pEXGOX-K Derivat zur Expression von <i>sldAB</i> in <i>G. oxydans</i> , <i>mob</i> , <i>rep</i> , Km <sup>R</sup> , P <sub>tufB</sub>	Voss (nicht publiziert), Schleyer <i>et al.</i> (2008)
pKOS4	<i>E. coli</i> – Gluconobacter Shuttlevektor (low copy), Derivat von pK18mobGII, ori aus <i>par-rep</i> von pGOX3, <i>lacZα</i> , Amp <sup>R</sup> ,	Diese Arbeit
pKOS4beta	<i>E. coli</i> – Gluconobacter Shuttlevektor (low copy), Derivat von pK18mobGII, ori aus <i>par-rep</i> von pGOX3, <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> ,	Diese Arbeit
pKOS6a	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pAJ63a, <i>upp</i> entfernt, <i>codA</i> integriert, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6b	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pAJ63a, <i>upp</i> entfernt, <i>codBA</i> integriert, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS7b	Replizierender Deletionsvektor, Derivat von pJV17 (pEXGOX Derivat), <i>sldAB</i> durch <i>codBA</i> ersetzt, Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pAJ63aΔ1507	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pAJ63a zur Deletion von GOX 1507 (Typ II Restriktionssystem) in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , FU <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pAJ63aΔ2567	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pAJ63a zur Deletion von GOX 2567-2569 (Typ I Restriktionssystem) in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , FU <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pK18mobGII	Mobilisierbarer Klonierungsvektor für Gram <sup>-</sup> Bakterien, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , <i>gusA</i> ,	Katzen <i>et al.</i> (1999)
pK18mobSacB	Mobilisierbarer Klonierungsvektor für Gram <sup>-</sup> und Gram <sup>+</sup> Bakterien, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , <i>sacB</i>	Hanahan <i>et al.</i> (1991)
pKOS6bΔ9570	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b zur Deletion von GLS_c09570 (Levansucrase) in <i>G. oxydans</i> DSM 3504, <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pKOS6b $\Delta$ 854 $\Delta$ 855	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b zur Deletion von GOX854-855 ( <i>sldAB</i> ) in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6a2567flank	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6a, enthält Flanken von GOX2567, zur Überprüfung der Rolle von <i>codB</i> für das <i>cod</i> basierte Deletionssystem in <i>G. oxydans</i> 621H, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6b2567flank	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b, enthält Flanken von GOX2567, zur Überprüfung der Rolle von <i>codB</i> für das <i>cod</i> basierte Deletionssystem in <i>G. oxydans</i> 621H, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6b $\Delta$ <i>g2dh</i>	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b zur Deletion von GLS_c05030 GLS_c05040 (Gluconat 2 Dehydrogenase in 2 UE, <i>g2dh-a</i> / <i>gd2dh-b</i> ) in <i>G. oxydans</i> DSM 3504, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6b $\Delta$ <i>ndh</i>	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b zur Deletion von GLS_c05650 (NADH Dehydrogenase <i>ndh</i> ) in <i>G. oxydans</i> DSM 3504, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6b $\Delta$ <i>tpiA</i>	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b zur Deletion von GLS_c05720 (Triosephosphatisomerase <i>tpiA</i> ) in <i>G. oxydans</i> DSM 3504, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS6b $\Delta$ <i>hsdR</i>	Integrierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS6b zur Deletion von GLS_c02360 (putatives Typ I Restriktionssystem - <i>hsdR</i> ) in <i>G. oxydans</i> DSM 3504, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pKOS7b $\Delta$ <i>ndh</i>	Replizierender Deletionsvektor, Derivat von pKOS7b, Versuchsvektor zur Deletion von GLS_c05650 (NADH Dehydrogenase <i>ndh</i> ) in <i>G. oxydans</i> DSM 3504, Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Diese Arbeit
pAJ78	Expressionsvektor, Derivat von pBBR-1 MCS2 für Überexpression von <i>ndh11</i> in <i>G. oxydans</i> ATCC 621H, L <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup>	Junker (2009)
pMM3b	Expressionsvektor für <i>G. oxydans</i> , Derivat von pJV17, <i>sldAB</i> entfernt, <i>lacZ</i> eingefügt unter Kontrolle von Promotor pADH (Alkohol Dehydrogenase)	Mientus (in Review-phase)

## 2. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysis“, abweichende Reinheitsgrade werden explizit angeführt.

Die Chemikalien wurden von nachfolgenden Firmen bezogen:

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Hefeextrakt, Pepton und Agar	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
5-Fluorocytosin (FC)	TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgien),
Kanamycin (Km)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland),
Loading-Dye, DNA-Ladder, T4 Ligase, Restriktionsenzyme, Alkaline Phosphatase Polymerasen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Finnzyme (Vantaa, Finnland).
Zucker, Cefoxitin (Cef), Fluorouracil (FU) und sämtliche weiteren Chemikalien Deutschland).	Sigma-Aldrich-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

## 3. Medien, Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung der Organismen

### 3.1 Stammspezifische Medien

#### **Mannitol Vollmedium (MV) (Merfort *et al.* 2006)**

Die in der Arbeit verwendeten *G. oxydans* Stämme wurden in MV angezogen.

Hefeextrakt	5	% (w/v);
Trypton	3	% (w/v)
D-Mannitol	50	mM
pH 6,0 (2 M HCl)		
autoklaviert		

Bei festen Nährböden wurden dem Medium 1,5 % Agar (w/v) beigemischt. Sämtliche Zusätze wurden soweit möglich mitautoklaviert, hitzesensitive Verbindungen wie Antibiotika wurden sterilfiltriert und dem Medium nach Abkühlung zugegeben.



**Mannitol Vollmedium plus (MV+) (Verändert nach Merfort *et al.* (2006))**

Für die Anzucht von *Gluconacetobacter diazotrophicus* und *Acetobacter pasteurianus* wurde die Mannitolkonzentration des zuvor beschriebenen Mediums auf 250 mM erhöht. Für das Einstellen des pH Werts, sowie für die Herstellung von festen Nährböden und Zugabe von Zusätzen wurde wie bei MV verfahren.

**Acidomonas Medium (AM) (Verändert nach DSMZ)**

*Acidomonas methanolica* wurde in folgendem Glucose Medium kultiviert:

Hefeextrakt	5,0	% (w/v)
Trypton	3,0	% (w/v)
D-Glucose	110	mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	mM
NaCl	8,5	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0	mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3,0	mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	2	mM
pH 6,0 (2 M HCl)		
autoklaviert		

Die Herstellung von festen Nährböden sowie Zugabe von Zusätzen erfolgte wie bei MV.

**Acidiphilium Medium (APM) (DSMZ)**

*Acidiphilium multivorum* wurde in spezifisch auf diesen Organismus zusammengestelltem Medium angezogen. Zusammensetzung pro 1 L:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	mM
Glucose	5,5	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0	mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,0	mM
KCl	1,5	mM
Hefeextrakt	0,3	% (w/v)
pH 3,0 (2 M HCl)		
autoklaviert		

Bei der Herstellung von festen Nährböden sowie Zugabe von Zusätzen wurde wie bei MV verfahren.

#### **Elektroporationsmedium (EP) (Krajewski 2008)**

Zur Herstellung von elektrokompententen *G. oxydans* Zellen wurde ein besonders reiches Medium zur Anzucht verwendet.

D-Mannitol	450	mM
Hefeextrakt	15	% (w/v);
CaCl <sub>2</sub>	15	mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10	mM
Glycerin	6	mM

pH 6,0 (2 M HCl)

autoklaviert

Die Herstellung von festen Nährböden sowie Zugabe von Zusätzen erfolgte wie bei MV.

#### **Luria-Bertani Medium (LB) (Sambrook *et al.* 1989)**

Sämtliche *E. coli* Stämme wurden in LB Medium angezogen.

Pepton	10	% (w/v)
Hefeextrakt	5,0	% (w/v);
NaCl	170	mM

autoklaviert

Bei der Herstellung von festen Nährböden sowie Zugabe von Zusätzen wurde wie bei MV verfahren.

#### **Super Optimal Broth (SOB) (Sambrook *et al.* 1989)**

Zur Anzucht von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen wurde das dafür optimierte SOB Medium verwendet.

Pepton	20	% (w/v)
Hefeextrakt	5,0	% (w/v);
NaCl	10	mM
MgCl <sub>2</sub>	10	mM
MgSO <sub>4</sub>	10	mM
KCl	2,5	mM

autoklaviert

Die Herstellung von festen Nährböden sowie Zugabe von Zusätzen erfolgte wie bei MV.

### 3.2 Medienzusätze

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zusätze sind in Tabelle 3 aufgeführt

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Medienzusätze mit jeweiligen Stammkonzentrationen und Konzentrationen im Arbeitsmedium**

Zusatz	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in Medium
Kanamycin	50 mg/ml (85 mM) in H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	50 µg/ml (85 µM)
Cefoxitin	60 mg/ml (130 mM) in H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	60 µg/ml (130 µM)
5-Fluorouracil	60 mg/ml (460 mM) in DMSO	60 µg/ml (460 µM)
5-Fluorocytosin	15 mg/ml (115 mM) in H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	60 µg/ml (460 µM)
Thymidin	24 mg/ml (100 mM) in H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	2,4 µg/ml (10 µM)

### 3.3 Kultivierungsbedingungen

#### Acetobacteraceae

Die Stämme aus der Familie der *Acetobacteraceae* wurden bei 30°C und 180 rpm auf einem Rundschtüttler von Infors HT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz) unter aeroben Bedingungen angezogen. Die einzige Ausnahme bildet *Granulibacter bethesdensis*, der bei 37°C angezogen wurde. Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern mit einem Füllvolumen von 5 ml des entsprechenden Mediums kultiviert. Angeimpft wurde aus einer Kryostammkultur. Vorkulturen wurden je nach Wachstumsfortschritt von 20 h bis 48 h inkubiert. Hauptkulturen wurden je nach benötigter Kulturmenge entweder in Reagenzgläsern mit 5 ml Füllvolumen, oder in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen der Firma Ochs (Bovenden - Lengler, Deutschland) mit

einer Füllmenge von 25 ml angezogen. Die Start  $OD_{600}$  wurde bei Hauptkulturen auf 0,1 – 0,2 eingestellt. Feste Nährmedien wurden je nach Stamm und Anwendung von 48 h bis 120 h inkubiert. Bei Inkubationszeiten von mehr als 48 h wurden Petrischalen mit Parafilm abgeklebt, um eine Austrocknung zu verhindern.

### ***E. coli***

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37°C, aerob in einem Rundschüttler von Infors HT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz) bei 180 rpm. Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern mit einem Füllvolumen von 5 ml LB max. 24 h kultiviert. Das Animpfen erfolgte aus Kryokulturen bzw. von Einzelkolonien. Hauptkulturen wurden je nach benötigter Kulturmenge entweder in Reagenzgläsern mit 5 ml Füllvolumen oder in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane der Firma Ochs (Bovenden - Lengler, Deutschland) mit einer Füllmenge von 25 ml angezogen. Hauptkulturen wurden auf eine Start  $OD_{600}$  von 0,05 – 0,1 angeimpft. Feste Nährböden wurden max. 24 h inkubiert.

### **3.4 Stammhaltung**

Zur Langzeitsicherung der Stämme wurden Kryostammkulturen angelegt und bei -80°C gelagert. Dazu wurden die Stämme im entsprechenden Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa 1,5 angezogen. In einem verschraubbaren Mikroreaktionsgefäß wurde 1 ml der Kultur mit 0,5 ml 87 %igem (w/v) Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

### **3.5 Bestimmung der optischen Dichte**

Um den Wachstumsverlauf der Flüssigkulturen zu verfolgen wurde deren Zelldichte an definierten Zeitpunkten durch die Messung der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurde das Spektralphotometer UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro von GE Healthcare (Chalfont St Giles, United Kingdom) verwendet. Als Nullwert für die jeweilige Messung wurde unbeimpftes Medium verwendet. Ab einem  $OD_{600}$  Wert von 0,4 erfolgte eine Verdünnung der Kulturproben, um die Messgenauigkeit des Geräts weiter zu gewährleisten.

### **3.6 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate**

Um die maximale Wachstumsrate zu bestimmen wurde der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen über 30 h verfolgt. Die gemessenen  $OD_{600}$  Werte an verschiedenen Zeitpunkten wurden in einem Diagramm graphisch dargestellt. Die maximale Wachstumsrate wurde in der logarithmischen Wachstumsphase (schnellste Zellteilungsphase) nach folgender Formel berechnet:

$$\mu = \frac{\log(x_1) - \log(x_0)}{t_1 - t_0}$$

Dabei entspricht  $x_1$  der  $OD_{600}$  am Zeitpunkt  $t_1$ ,  $x_0$  der  $OD_{600}$  am Zeitpunkt  $t_0$ . Die Einheit der maximalen Wachstumsrate ist 1/h.

### 3.7 Kontaminationskontrollen

Um Kontaminationen zu erkennen wurde die Reinheit regelmäßig überprüft. Zum einen wurden Verdünnungsausstriche auf Festmedien durchgeführt und zum anderen wurden die Flüssigkulturen mikroskopisch begutachtet. Das eingesetzte Mikroskop war ein Phasenkontrastmikroskop von Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland). Bei Auffälligkeiten bzw. bei Stämmen mit sehr ähnlicher Morphologie wurde außerdem über PCR ein Teil der 16S RNA amplifiziert (Primer 616v\_alt und 100K (Singh *et al.* 2011)) und im Anschluss sequenziert, um den Stamm zweifelsfrei zu bestimmen.

## 4. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden hitzestabile Gegenstände und Lösungen bei 121°C für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Geräte wurden vor der Benutzung mit 80 % Ethanol behandelt. Thermosensitive Lösungen wurden sterilfiltriert.

### 4.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA wurde nach einer modifizierten Methode nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. 2 ml der Zellsuspension wurden bei 18.000 x g zentrifugiert, das Pellet im Anschluss in TE-Puffer resuspendiert und mit 15 µl SDS und 3 µl Proteinase K (50 mg/ml) von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) versetzt und nach Durchmischung 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der enthaltenen RNA wurde 5 µl RNaseA (10 mg/ml) von Applichem (Darmstadt, Deutschland) zugegeben und mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer 5 M NaCl Lösung und 80 µl CTAB Lysispuffer (2%) von Applichem (Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und gut durchmischt. Nach diesem Schritt erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 18.000 x g. Anschließend folgte eine Phenol/Chloroformfällung. Dazu wurde der Überstand mit 1 Vol. Roti-Phenol von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die Phasentrennung folgte durch Zentrifugation bei 18.000 x g. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und für die Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Dieser Schritt

wurde wiederholt bis keine Interphase mehr feststellbar war. Die DNA wurde mittels Isopropanol/Ethanol fällung gewonnen.

#### **4.2 Fällung von Nukleinsäuren mit Isopropanol/Ethanol**

Diese Methode dient der Trennung der DNA von anderen hydrophoben Komponenten. Die DNA-haltige Probe wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,6) sowie 0,8 Vol. Isopropanol versetzt und 5 min bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend bei 18.000 x g, 4°C für 20 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Die Resuspension erfolgte in 70 % (v/v) Ethanol. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 18.000 x g, 4°C), wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet, um jegliche Ethanolreste zu entfernen. Das DNA Pellet wurde im Anschluss in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub> aufgenommen.

#### **4.3 Isolierung genomischer DNA mit „Master Pure“ Kit**

Die zuvor beschriebene Methode für die Extraktion von genomischer DNA wurde im Laufe der Arbeit aus Zeitgründen zunehmend durch die Isolationsmethode nach Miller *et al.* (1988) mittels „Master Pure DNA Purification Kit“ von Epicentre (Madison, USA) ersetzt. Die notwendigen Lösungen waren dem Kit beigelegt, die Durchführung erfolgte mit einigen Abweichungen zum Herstellerprotokoll: Nachdem 2 ml Zellsuspension bei 18.000 x g zentrifugiert und im Rückstand resuspendiert wurden, erfolgte die Zugabe von 5 µl Proteinase K (10 mg/ml), welche zusammen mit der „Tissue and Cell Lysis Solution“ bei 65°C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde 10 µl RNaseA (10 mg/ml) hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Vor der Proteinfällung wurden die Proben 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe des „Protein Precipitation Reagent“ erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 18.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 330 µl kaltem Isopropanol gefällt. Die Probe wurde erneut 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und es erfolgte die Aufnahme in 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub>.

#### **4.4 Plasmidisolierung durch Axyprep Plasmid Miniprep Kit**

Für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurde das Axyprep Plasmid Miniprep Kit von Axygen (Union City, USA) benutzt. Das Funktionsprinzip ist folgendes: Die Zellen werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid DNA selektiv an eine Säule gebunden. Nach zwei Waschschritten wird die DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub> eluiert. Die Durchführung erfolgte nach

der im Kit enthaltenen Anleitung. Für die Isolation wurden 2 ml gut angewachsene Kultur verwendet. Der zusätzliche Waschschrift wurde stets durchgeführt. Beim zweiten Waschschrift wurde allerdings nur 1 min zentrifugiert, im darauffolgenden Trocknungsschritt dann 5 min. Die Elution erfolgte mit auf 55°C erhitztem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ultrapure}}$ .

#### 4.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsüberprüfung der DNA

Die DNA Konzentration wurde mithilfe eines Nanodrop 1000 von Peqlab (Erlangen, Deutschland) bestimmt. Es handelt sich hierbei um ein Spektralphotometer, welches über die Absorption von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration bestimmt. Für den Nullabgleich wurde dasselbe  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ultrapure}}$  Aliquot wie für die Elution verwendet. Zusätzlich konnte über verschiedene OD Verhältnisse Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA gezogen werden. Das ideale Verhältnis von  $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280}$  ist 1,8 (Sambrook *et al.* 1989). Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol zeichnen sich durch eine erhöhte Absorption bei 280 nm ab. Das ideale Verhältnis  $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{230}$  beträgt 2,0 – 2,2, eine erhöhte Absorption bei 230 nm lässt eine Verunreinigung durch Polysaccharide vermuten.

#### 4.6 Agarose Gelelektrophorese

##### Analytische Gele

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wurde mit horizontalen Elektrophoresekammern mit einem Gelvolumen von etwa 20 ml durchgeführt. Das Funktionsprinzip beruht darauf, dass negativ geladene Nukleinsäuren vom Pluspol angezogen werden. Die verschiedenen Größen der Fragmente führen zu unterschiedliche Durchlaufzeiten, dadurch erfolgt schließlich die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente. Für die Gele wurde 0,8 % (v/v) Agarose in 1xTAE Puffer verwendet. Der Laufpuffer war ebenso 1xTAE, gekühlt auf 4°C. Zur Erhöhung der Dichte der Proben diente 6x Loading Dye von Thermo Scientific (Waltham, USA), 0,5 µl Puffer wurden mit 2 – 5 µl der Probe vermischt und aufgetragen. Für die Größenbestimmung wurde 5 µl „GeneRuler 1 kB ladder“ von Thermo Scientific (Waltham, USA) aufgetragen. Für kleinere Fragmente wurde der GeneRuler 100 bp ladder desselben Herstellers eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 120 – 150 V und einer Laufdauer von 35 bzw. 25 min. Das Gel wurde nach dem Lauf in wässriger Ethidiumbromidlösung (2,5 µM) für 10 – 15 min gefärbt und anschließend schwenkend in Wasser kurz entfärbt. Die Dokumentation erfolgte in einer Gel-Dokumentationsanlage des Modells GelDoc 1000 von BioRad (München, Deutschland).

### Präparative Gele

Die Auftrennung erfolgte in Kammern vom Modell HE33 Mini Horizontal Submarine Unit von Hoefer (Holliston MA, USA). 1-2 µl Auftragspuffer wurden zu 50 µl Probenvolumen pipettiert und aufgetragen. Für die Größenbestimmung wurden die zuvor genannten DNA *ladder* verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 V für 1 h. Die Färbung und Dokumentation erfolgten wie zuvor beschrieben. Die UV Exposition des Gels wurde allerdings auf ein Minimum reduziert, um UV-induzierte Schäden zu verringern. Die Intensität der UV Lampe wurde reduziert, Schnittbereiche wurden kurz markiert und die Schnitte mit sauberem Skalpell erst bei ausgeschalteter UV Lampe durchgeführt. Die Gelextraktion erfolgte mit dem PCR Clean-up System von Promega (Madison, USA), wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben. Das Prinzip beruht dabei auf der Lösung der Agarose durch eine hochkonzentrierte Salzlösung und der spezifischen Bindung der DNA an eine Säulenmatrix

### 50x TAE-Puffer

Tris		2,0	M
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O		0,1	M
Eisessig		1	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1000	ml
pH 8,5			

### Ethidiumbromid Färbebad

500 µl einer 5 mM Ethidiumbromidlösung in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

## 4.7 Präparative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR (Mullis & Faloona 1987) dient der *in vitro* Vervielfältigung eines DNA Moleküls. Wenn es die Klonierung erfordert, werden die Amplifikate mit neuen Restriktionsschnittstellen ausgestattet, dazu weisen die Primer entsprechende Fehlpaarungen zum Matrizenstrang auf. Die Hybridisierungstemperatur wird dabei von der Länge und Zusammensetzung der Primer bestimmt. Dabei spielt der G-C Gehalt der Primer eine entscheidende Rolle, je höher dieser ist, desto höher ist die Hybridisierungstemperatur. Hier gilt die Näherung:

$$T_M(^{\circ}\text{C}) = (2 \times [A + T] + 4 \times [C + G])$$

A, T, C, G entspricht der Anzahl der jeweiligen Basen.



Die PCR wurde in einem Twinblock Flexcycler der Marke Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt. Für präparative Amplifikate wurde die *Phusion* Polymerase von Thermo Scientific (Waltham, USA) mit *proofreading* Funktion eingesetzt. Das Amplifikat wurde, falls aus Reinheitsgründen erforderlich, nach der PCR einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen und daraus isoliert, wie unter II.4.6 beschrieben. Der standartmäßig verwendete Reaktionsansatz ist nachfolgend aufgeführt.

#### Reaktionsansatz (50 µl)

Chromosomale DNA (100 – 200 ng/µl)	1	µl
5 x Phusion Reaktionspuffer	10	µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5	µl
Vorwärts Primer (5 pM)	5	µl
Rückwärts Primer (5 pM)	5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	28,25	µl
Phusion Polymerase (2 U /µl)	0,25	µl

#### PCR Programm

Denaturierung	98°C	3	min
Denaturierung (Zyklus)	98°C	30	s
Annealing (Zyklus)	TM*	30	s
Elongation (Zyklus)	72°C	20	s/kb
Finale Elongation	72°C	5	min

30 Zyklen

\*Bei Primern mit Hybridisierungslängen über 20 bp wurde die Annealingtemperatur aus TM + 3°C berechnet, wie in der Herstellerangabe angegeben.

#### 4.8 Analytische PCR zur Fragment- und Klonüberprüfung

Die analytischen PCRs zur Überprüfung von Deletionsstämmen und Plasmiden wurden wie im vorherigen Kapitel beschrieben durchgeführt. Der Ansatz wurde allerdings auf 20 µl beschränkt und es wurde lediglich eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Technik wurde zur Überprüfung einer größeren Anzahl an rekombinanten Klonen von *E. coli* bzw. *G. oxydans* verwendet. Hierzu wurden in PCR-Tubes 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub> vorgelegt. Mit sterilen Zahnstochern wurden die zu überprüfenden Kolonien vom Festnährboden abgenommen, auf einem Sicherungsnährboden ausgestrichen und durch kurzes Eintauchen in die

PCR-Tubes überführt. Diesem Ansatz wurde folgender PCR Reaktionsmix zugegeben (Endvolumen 20 µl).

#### Reaktionsmix für Kolonie-PCR (10 µl)

5 x Phire Reaktionspuffer	4	µl
dNTP Mix (10 mM)	0,4	µl
Vorwärts Primer (5 pM)	1	µl
Rückwärts Primer (5 pM)	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	3,4	µl
Phusion Polymerase (2 U / µl)	0,2	µl

#### Programm für Kolonie-PCR

Denaturierung	98°C	8	min
Denaturierung (Zyklus)	98°C	1,5	min
Annealing (Zyklus)	TM*	30	s
Elongation (Zyklus)	72°C	20	s/kb
Finale Elongation	72°C	5	min
30 Zyklen			

\*Bei Primern mit Hybridisierungslängen über 20 bp wurde die Annealingtemperatur aus TM + 3°C berechnet, wie in der Anleitung der Polymerase angegeben.

#### 4.9 PCR zur Fusionierung von Fragmenten

Die Methode wurde eingesetzt um PCR Amplifikate über angefügte Homologieregionen zu fusionieren. Dieser Schritt war essentiell für die Erstellung der Deletionsflanken, die im Anschluss in den Deletionsvektor kloniert wurden. Die Methode wurde von Peters *et al.* (2013) angewandt und basiert auf der Long Flanking Homology (LFH) Methode von Wach (1996).

Wie in Abbildung 2 (S. 30) dargestellt wurden in einem ersten Schritt vier Primer (P1-P4) abgeleitet, zwei für die flankierende Region *upstream* (P1, P2) des zu deletierenden Gens und zwei für die *downstream* (P3, P4) liegende Region. Die Entfernung zwischen den Vorwärts- und Rückwärts-Primern betrug sowohl *upstream* (P1:P2) wie *downstream* (P3:P4) etwa 900 bp. P1 sowie P4 wurden mit Restriktionsschnittstelle für die spätere Insertion in den Klonierungsvektor ausgestattet. P2 wurde so abgeleitet, dass ausgehend vom 5'-Ende des Primers, die ersten 20 bp komplementär zu den 20 ersten Basen der *Downstream*-Region waren. P3 wurde

so abgeleitet, dass ausgehend vom 5'-Ende die ersten 20 bp komplementär zu den 20 letzten Basen der *Upstream*-Region waren. Die *upstream* (P1 und P2) und *downstream* (P3 und P4) gelegenen Fragmente wurden in separaten PCR Reaktionen amplifiziert, chromosomale DNA diente als Matrize. Die Produkte wurden wie unter II.4.6 beschrieben gereinigt. Zur Fusion der Flanken wurden je 50 ng der Produkte mit folgendem Reaktionsansatz gemischt:

<i>Upstream</i> Fragment	50	ng (x)
<i>Downstream</i> Fragment	50	ng (y)
5 x Phusion Puffer	6	µl
dNTP mix (10 mM)	0,6	µl
Phusion Polymerase (2 U / µl)	0,3	µl
DMSO	0,6	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	22,5 - x - y	µl

Es folgte das erste PCR Programm, zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA und zur Anlagerung der einzelsträngigen Fragmente an die Homologieregionen. Die Polymerase hatte dabei die Funktion die Einzelstrangbereiche wieder zu Doppelstrangbereichen zu komplettieren.

Denaturierung	98°C	1	min
Denaturierung (Zyklus)	98°C	10	s
Annealing (Zyklus)	63°C	30	s
Elongation (Zyklus)	72°C	20	s/kb
Zyklen: 10			

Nach Ablauf dieses Programms wurden dem Ansatz folgende Komponenten hinzugegeben.

P1 (5 pM)	5	µl
P4 (5 pM)	5	µl
5 x Phusion Puffer	4	µl
dNTP mix	0,4	µl
Phusion Polymerase	0,2	µl
DMSO	0,6	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	4,8	µl

Das anschließende PCR Programm diente der Amplifikation der fusionierten Homologieregionen:

Denaturierung (Zyklus)	98°C	10	s
Annealing (Zyklus)	TM*	30	s
Elongation (Zyklus)	72°C	20	s/kb
Elongation	72°C	10	min

Zyklen: 20

\*Bei Primer-Hybridisierungslängen > 20 bp, TM + 3°C, wie in Herstellerangaben

Es folgte eine präparative Gelelektrophorese, das fusionierte Fragment der gewünschten Größe wurde ausgeschnitten und gereinigt.

## LFH-PCR

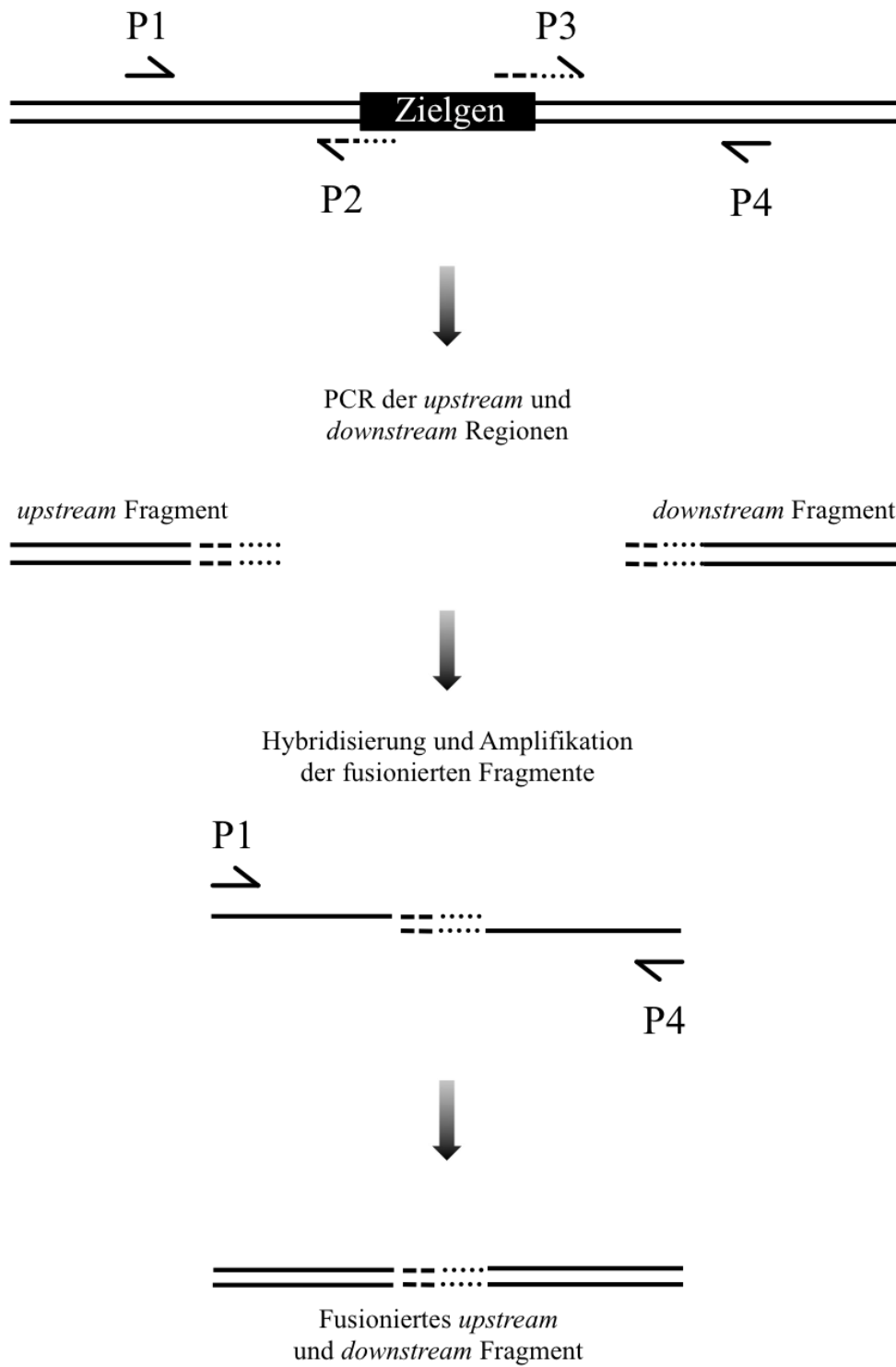


Abbildung 2: Übersicht der LFH-PCR Methode zur Fusionierung von PCR Produkten

#### 4.10 Klonierung von PCR Produkten (enzymatisch)

Die über PCR generierten Fragmente sowie die Vektoren wurden in einem Restriktionsverdau für die nachfolgende Klonierung vorbereitet. Der Restriktionsverdau beruht auf einer DNA Hydrolyse mit hochspezifischen Typ II Restriktionsendonukleasen. Die Erkennungssequenz ist eine palindromische Abfolge von Basen im DNA-Doppelstrang, das Enzym spaltet spezifisch die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basen in beiden Strängen. Diese Spaltung kann auf dem Leit- und Folgestrang an derselben Position erfolgen, dadurch wird ein glattes Ende (*blunt end*) generiert. Die ideale Variante für Klonierungen ist allerdings die von manchen Enzymen erzeugte versetzte Spaltung der Phosphodiesterbindungen und die Entstehung von überhängenden Enden (*sticky ends*). Die DNA-Lösungen wurden, soweit möglich, mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen des Typs FastDigest von Thermo Scientific (Waltham, USA) angesetzt, dies ermöglicht die Insertionsrichtung besser zu kontrollieren und erschwert eine Religation der geschnittenen Vektoren. Die DNA Inserts wurden für 30 min und die Vektoren für 15 min bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

#### Präparativer Restriktionsansatz (50 µl)

DNA (0,5 µg)	x	µl
FastDigest Puffer	5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	42-x	µl
FastDigest Restriktionsenzym 1	1,5	µl
FastDigest Restriktionsenzym 2	1,5	µl

#### Dephosphorylierung des Vektors

Ein häufig auftretendes Problem bei enzymatischen Klonierungen ist die Religation des geschnittenen Vektors ohne Insert-Element. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen für die Präparierung der Enden kann dieses Problem zwar etwas verringern, eine Dephosphorylierung verhindert allerdings auch die Religation von unvollständig verdauten Vektoren. Das Funktionsprinzip basiert auf der enzymatischen Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an den DNA-Enden und verhindert bei der anschließenden Ligation die erneute Verknüpfung der offenen Vektorenden. Zur Dephosphorylierung wurde FastAP (Alkaline Phosphatase) von Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet. Aufgrund der Kompatibilität des FastDigest-Puffers wurden dem Vektor-Restriktionsansatz direkt 3 µl Enzym zugegeben und

für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reinigung des Ansatzes erfolgte im Anschluss mit dem „PCR Clean-Up System“ von Promega (Mannheim, Deutschland).

### Ligation von DNA

Für die Ligation der Fragmente in den präparierten Vektor wurde T4 Ligase von Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet. Das ATP-abhängige Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden der DNA. Der standardisierte Ligationsansatz ist nachfolgenden aufgeführt. Außer dem angegebenen Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:4 wurden auch Verhältnisse von 1:6 und 1:8 angesetzt.

Vektor DNA	50	ng
Insert DNA	200	ng
T4 Ligase Puffer 10 x	2	µl
T4 Ligase 5 u/µl	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	ad	20 µl

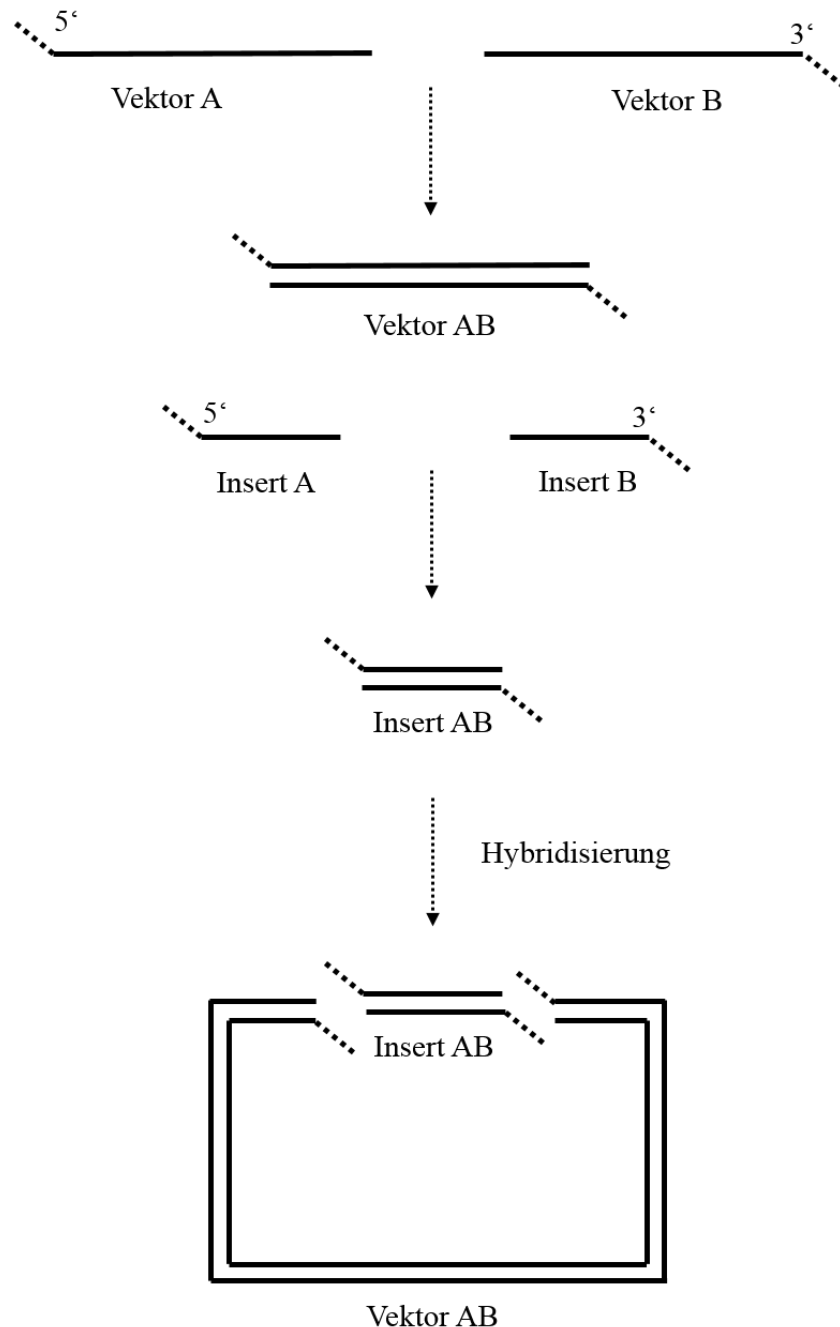
Der Ansatz wurde bei 4°C für mindestens 12 h inkubiert. Im Anschluss folgte die Hitzeinaktivierung bei 65°C für 10 min und die Transformation in *E. coli*.

#### 4.11 Ligase-freie Klonierung über Hybridisierung

Aufgrund von Schwierigkeiten bei manchen Klonierungen passende Restriktionsenzyme zu finden bzw. bei Problemen mit dem Ligationsschritt, wurde eine alternative Klonierungsmethode verwendet. Die Methode wurde von Tillett & Neilan (1999) entwickelt und kommt ohne die Verwendung von Enzymen zur Restriktion oder Ligation aus. Das Funktionsprinzip basiert auf der Hybridisierung von zuvor erzeugten Insert-Überhängen mit entsprechenden Vektorüberhängen (übliche Überhanglänge 12 bp). Die Überhänge werden durch ein Set von vier Primern für das Insert (PI 1-4) sowie vier Primern für den Vektor (PV 1-4) erzeugt. Das Set besteht immer aus zwei Primern (*vorwärts* und *rückwärts*), die komplementäre, ca. 20 bp große Überhänge besitzen und zwei Primern (*vorwärts* und *rückwärts*) ohne Überhänge. Kombiniert wird immer ein Primer mit Überhang mit einem ohne Überhang, dabei entstehen zwei unterschiedliche Fragmente mit Überhang am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende. Insgesamt entstehen dadurch zwei Fragmente des Inserts und zwei Fragmente des Vektors für die Hybridisierung. Die PCR Produkte werden in ein Reaktionsgefäß gegeben und in einem Thermocycler denaturiert. Im darauffolgenden Schritt entstehen durch Hybridisierung der komplementären Überhänge zuerst

verschiedene lineare und schließlich zirkuläre Produkte. Diese Produkte wurden, wie ein Ligationsansatz, direkt in *E. coli* transformiert. Die stabilen Phosphodiester-Bindungen im Rückgrat der DNA werden erst in *E. coli* ausgebildet und erfolgen durch die zelleigene Ligase.

### Ligase-freie Klonierung



**Abbildung 3:** Schematisch vereinfachte Darstellung der Ligase-freien Klonierungstechnik mittels PCR Produkten mit 5' bzw. 3' Überhängen. Im Hybridisierungsschritt entstehen aus den Vektor- bzw. Insertelementen mit Überhang die transformierbaren zirkulären Vektor-Insert Elemente in *nicked*-Form. Die stabilen Phosphodiester-Bindungen im Rückgrat der Vektor DNA werden erst in *E. coli* ausgebildet und erfolgen durch die zelleigene Ligase.



**Ansatz für Hybridisierung**

PCR Produkt Insert Überhang 5'	500	ng
PCR Produkt Insert Überhang 3'	500	ng
PCR Produkt Vektor Überhang 5'	500	ng
PCR Produkt Vektor Überhang 3'	500	ng
EDTA (50 mM)	1	µl
NaCl (1 M)	5	µl
Tris HCl pH 8,5 (0,5 M)	1	µl

**Programm für Hybridisierung**

95°C	3	min
65°C (Zyklus)	2	min
35°C (Zyklus)	15	min
Zyklus: 3 x		

**4.12 Transformation von *E. coli***

Für die Transformation von *E. coli* wurde das Hitzeschockverfahren von Sambrook *et al.* (1989) in abgeänderter Form angewandt. Dazu wurde eine Hauptkultur (250 ml SOB in 1 L Kolben mit Schikane) auf eine Start OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgt bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Zellen 10 min bei 2.700 x g und 4°C zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit TB Puffer. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem TB resuspendiert, 500 µl Glycerin hinzugegeben und in 100 µl Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

**TB Puffer**

PIPES	10	mM
MnCl <sub>2</sub>	55	mM
CaCl <sub>2</sub>	15	mM
KCl	250	mM
pH 6,7		

Für die Transformation der DNA in *E. coli* wurde das Aliquot fünf min auf Eis aufgetaut, der inaktivierten Ligationsansatz (bzw. Hybridisierungsansatz) hinzugegeben und für 30 min auf

Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte in einem Thermoblock bei 42°C für eine Zeit von 1,5 min. Die Zellen wurden nach diesem Schritt erneut fünf min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB Medium wurden die Zellen für 1 h in einen Reaktionsgefäßinkubator Mixing Block MB-102 von BIOER (Binjiang, Volksrepublik China) gegeben. Im Anschluss wurden 100 µl und die Restmenge auf Selektivnährböden ausplattiert, bei 37°C über Nacht inkubiert und am Tag darauf mittels Kolonie PCR (II.4.8) überprüft.

#### 4.13 Überprüfung von Plasmiden mittels Restriktionsverdau

Sowohl neu konstruierte wie auch Plasmide aus der Stammsicherung wurden nach der Isolation stets mittels Restriktionsverdau überprüft. Dafür wurden Enzyme ausgewählt, die mehrmals in der Plasmid-DNA schneiden. Der Vergleich der daraus resultierenden Restriktionskarte mit der *in silico* vorhergesagten Karte gab Aufschluss über die Identität des getesteten Plasmids.

##### Analytischer Restriktionsansatz

DNA (0,2 µg)	x	µl
FastDigest Puffer	2	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	17-x	µl
FastDigest Restriktionsenzym	1	µl

Inkubationszeit: 15 min bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur.

#### 4.14 Konjugation von *Gluconobacter*

Die Übertragung von Plasmiden mit *mob* Region ist in *G. oxydans* durch Konjugation möglich. Diese Technik wurde aufgrund positiver Erfahrungen in vorherigen Arbeiten bevorzugt im Stamm ATCC 621H eingesetzt. Ein Donorstamm wie *E. coli* S17 (Hanahan *et al.* 1991) mit der Fähigkeit den RP4 Apparat auszubilden überträgt dabei das Plasmid auf den Rezipientenstamm. Aufgrund der häufigen Schwierigkeiten bei Subklonierungen im *E. coli* Stamm S17 wurde mit *triparentalem Mating* gearbeitet. Bei dieser Technik kann ein beliebiger *E. coli* Klonierungsstamm als Donor verwendet werden, ein zusätzlich verwendeter Helferstamm besitzt die Fähigkeit den RP4 Apparat auszubilden. In dieser Arbeit wurde der Stamm *E. coli* HB101 als Helferstamm eingesetzt.

Die 5 ml Vorkulturen der zwei *E. coli* Stämme sowie des *G. oxydans* Rezipientenstammes wurden über Nacht in LB<sub>Km</sub> bzw. MV angezogen und wurden zum Animpfen der Hauptkulturen auf eine initiale OD<sub>600</sub> von 0,1 – 0,2 verwendet. Es wurden dieselben Medien verwendet wie in den Vorkulturen, *E. coli* wurde ebenfalls in 5 ml Kultur und *G. oxydans* in 20 ml angezogen.

Die Hauptkultur von *G. oxydans* wurde bei 30° und 180 rpm inkubiert, *E. coli* bei 37°C und 180 rpm. Es wurde darauf geachtet, dass alle Kulturen in etwa zum gleichen Zeitpunkt die finale OD<sub>600</sub> von 0,9 erreichen, dazu wurde *E. coli* zu einem späteren Zeitpunkt angeimpft und inkubiert als *G. oxydans*. Nach dem Erreichen der finalen OD wurden 1 ml Helferstamm und 1 ml Donorstamm bei 1.700 x g, 10°C für 5 min zentrifugiert und zweimal in frischem LB gewaschen, um Antibiotikarestes zu entfernen. Im Anschluss wurden 6 ml *G. oxydans* Kultur dazugegeben und das Pellet damit resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet aus den drei Kulturen in 700 µl MV Medium resuspendiert und zur Konjugation auf eine MV Agarplatte gegeben. Dabei wurde darauf geachtet die Ausbreitung der Suspension auf der Platte sehr gering zu halten. Die Zelldichte innerhalb der Konjugationsfläche wird dadurch erhöht und die Konjugation allgemein erleichtert. Nach dem Eintrocknen der Suspension wurde der Festnährboden für 24 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die bis dahin gewachsenen Zellen mit frischem MV Medium vorsichtig von der Platte gespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und dann auf einer MV Agarplatte mit 50 µg/ml Km und 60 µg/ml Cef ausplattiert. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für mindestens 48 h. Die darauf wachsenden Kolonien sind aufgrund des selektiven Drucks *G. oxydans* Zellen mit dem entsprechenden Plasmid.

Parallel zu dem zuvor angeführten Mischverhältnis von 1:1:6 zwischen Donor-, Helfer- und Rezipientenstamm wurde bei den Konjugationen auch Verhältnisse von 1:1:4 bzw. 0,5:0,5:4 verwendet, das ideale Verhältnis variierte bei verschiedenen Konjugationen.

#### **4.15 Transformation von *Gluconobacter* durch Elektroporation**

Diese Technik ermöglicht die Übertragung von Plasmiden auch ohne *mob* Region. Es war in dieser Arbeit nicht möglich *G. oxydans* DSM 3504 zu konjugieren, deshalb war die Elektroporation die Methode der Wahl für die Transformation des Stammes. Diese Technik wurde in Acetobacteracea erstmals von Hall *et al.* (1992) angewandt und wurde später in abgewandelter Form auch in *G. oxydans* eingesetzt (Kallnik *et al.* 2010, Mostafa *et al.* 2002).

Für die Herstellung der elektrokompenten Zellen wurde eine 5 ml *G. oxydans* Vorkultur in EP Medium angezogen. Mit diesem Inokulum wurden zweimal 30 ml Hauptkultur (in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane) angeimpft. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,9 durch Zentrifugation (1.700 x g, 4°C, 10 min). Die Zellen wurden anschließend dreimalig mit 1 mM HEPES Puffer (pH 7) gewaschen, schließlich in 2 ml gleichen Puffers resuspendiert und mit 500 µl Glycerin versehen. Es folgte eine Aufteilung der Zellsuspension in vorgekühlte Reaktionsgefäße (50µl Aliquots), die in flüssigem Stickstoff schockgefrostet wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Elektroporation wurde in Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2mm von Peqlab (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Das Aliquot mit den kompetenten Zellen wurde kurz auf Eis aufgetaut und in die Küvette übertragen. Der Ligationsansatz wurde wie unter II.4.10 beschrieben vorbereitet und komplett in die Zellsuspension in der Küvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gen Pulser Gerät von Bio-Rad (München, Deutschland) mit den Einstellungen: 2,5 kV, 25  $\mu$ F, 400  $\Omega$ . Unmittelbar nach dem Elektroimpuls wurden 700  $\mu$ l frisches EP Medium zum Ansatz pipettiert. Die Suspension wurde in ein steriles Reagenzglas übertragen und 12-16 h bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Dieser Schritt diente der Regeneration der Zellen und erwies sich als essentiell für die Effizienz der Methode. Nachfolgend wurden die Zellen auf MV Nährböden mit 50  $\mu$ g/ml Km ausplattiert (100  $\mu$ l und Restmenge).

#### 4.16 Bestimmung der Transformationseffizienz / -frequenz von *G. oxydans*

Die Effizienz und Frequenz von transformierbaren *G. oxydans* Zellen wurde in leicht abgewandelter Form nach der von Hanahan *et al.* (1991) für *E. coli* beschriebenen Methode bestimmt. Dafür wurde DNA (100 – 300 ng) des *E. coli* - *G. oxydans* Shuttlevektors pMM3b mit 100  $\mu$ l an transformierbaren *G. oxydans* Zellen in einer Elektroporationsküvette vermischt. Die Präparation der Zellen, Elektroporation und Regeneration der Zellen erfolgte wie unter II.4.15 beschrieben. Nach der Regeneration wurden 10  $\mu$ l Zellen entnommen und damit eine Verdünnung bis  $10^7$  durchgeführt. Die Verdünnungsschritte  $10^6$  und  $10^7$  wurden auf MV für die Bestimmung der LKZ (Lebendkeimzahl) ausplattiert. Die restlichen 990  $\mu$ l aus der Elektroporation wurden zur Bestimmung der Anzahl an Transformanten pur auf MV mit 50  $\mu$ g / ml Km ausplattiert. Nach der exakten Auszählung der LKZ und der Transformanten pro Festnährboden wurden Transformationseffizienzen und -frequenzen wie folgt berechnet:

$$\text{Frequenz der Transformation} = \frac{\text{Anzahl Transformanten}}{\text{LKZ}}$$

$$\text{Effizienz der Transformation} = \frac{\text{Anzahl Transformanten}}{\text{ng eingesetzter DNA}}$$

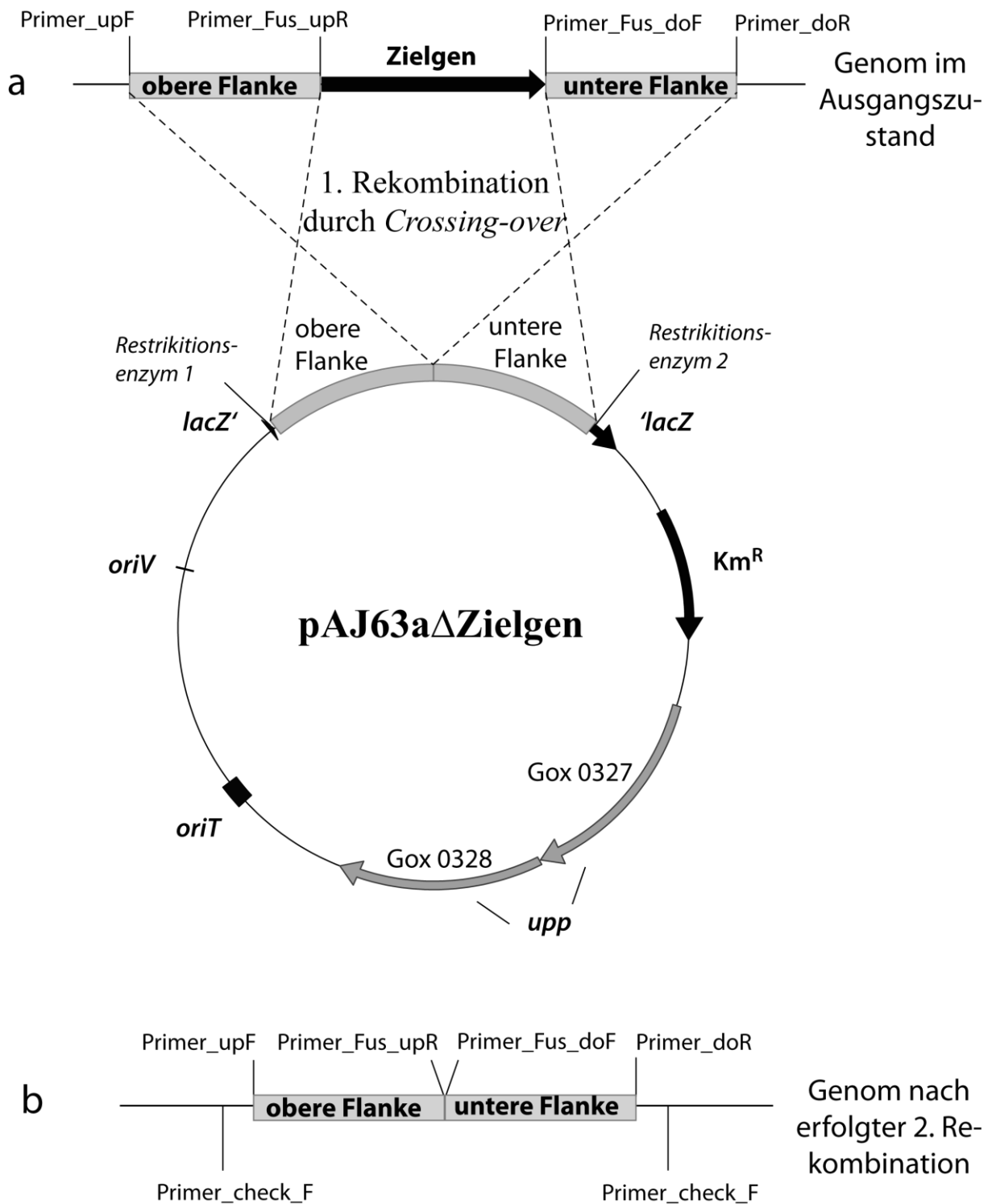
Die Frequenz der Transformation drückt dabei die Transformanten pro vitaler Zelle, die Effizienz die Transformanten pro ng eingesetzter DNA aus. Die Versuche wurden mit 2-3 Parallelproben durchgeführt, jeder Versuch wurde außerdem reproduziert und die Ergebnisse durch ein zweites unabhängiges Experiment bestätigt.

#### 4.17 Insertion von Deletionen in *G. oxydans*

Für die Deletionen in *G. oxydans* ATCC 621H wurde vor der Etablierung des *cod* Deletionssystems das von Junker (2009) entwickelte markerfreie Deletionssystem verwendet. Das System nutzt das *upp* Gen als Gegenselektionsmarker. Die darin codierte Phosphoribosyltransferase wandelt das toxische FU um und blockiert letztendlich die DNA Reparatur- und Replikationsmaschinerie wie schon unter I.4. beschrieben. Das System basiert darauf, dass durch eine Integration bzw. eine nachfolgende Exzision des Deletionsvektors über zur Zielsequenz homologe DNA Abschnitte, eine Mutante erzeugt werden kann. Die Verwendung des Systems beschränkt sich auf  $\Delta upp$ -Stämmen, dies ließ in dieser Arbeit nur den Einsatz in ATCC 621H  $\Delta upp$  zu. Sämtliche Deletionen im Stamm DSM 3504 sowie ATCC 621H wurden mit dem auch in Wildtypen einsetzbaren in dieser Arbeit entwickelten Deletionssystem erstellt (III.1).

In einem ersten Schritt wurden die *upstream* und *downstream* vom Zielgen gelegenen Flanken mit einer Länge von etwa 900 bp amplifiziert und wie unter II.4.9 beschrieben fusioniert. Diese Flanken dienen der späteren Integration des Deletionsvektors in die homologe Region *up-* bzw. *downstream* des Zielgens. Nach der Ligation der fusionierten Flanken in den Deletionsvektor pAJ63a (II.4.10) wurde das Plasmid in *E. coli* DH5 $\alpha$  subkloniert (II.4.12) und schließlich in den Stamm ATCC 621H  $\Delta upp$  konjugiert (II.4.14). Die auf dem Km/Cef Selektionsmedium angewachsenen Klone wurden abgenommen und gesichert. Die Integration des Vektors wurde über eine Kolonie-PCR nachgewiesen, dazu dienten ein genomspezifischer Primer sowie ein entgegenlaufender plasmidspezifischer Primer. Die positiven Integrierten wurden in einem nachfolgenden Schritt auf FU Selektionsplatten ausplattiert (200  $\mu$ l, 1:10 Verdünnung) und 48 h bei 30°C inkubiert. Auf diesem Medium können ausschließlich Klone wachsen, die den Vektor verloren haben. Die auf diesem Selektionsmedium angewachsenen Klone können nun durch die Exzision des Vektors über die homologen Flanken auf der genomischen DNA und der Vektor DNA, entweder wieder zum Wildtyp reversiert sein bzw. die gewünschte Deletion tragen. Klarheit darüber lieferte eine Kolonie-PCR mit Primern, die vor der *upstream*-Flanke und hinter der *downstream*-Flanke binden. Die positiv getesteten Klone wurden wie nachfolgend beschrieben über Sequenzierung bzw. mittels *Southern Blot* überprüft. Es folgte die Sicherung in einer Kryokultur und die Lagerung bei -80°C. In Abbildung 4 auf der folgenden Seite wird die Funktionsweise des *upp* Deletionssystems in schematischer Art dargestellt.

Das in dieser Arbeit entwickelte und erfolgreich etablierte *cod* basierte Deletionssystem (Anwendungsbeschreibung im Ergebnisteil unter III.1.3) ersetzte schließlich das *upp* Deletionssystem in allen Anwendungsbereichen.



**Abbildung 4:** Schema der Deletion eines Gens in *G. oxydans* ATCC 621H mittels *upp*-System und FU Selektion. Der Integrationsprozess ist unter (a) dargestellt, in (b) wird die resultierende markerfreie Deletion gezeigt, das Gen zwischen den zwei flankierenden Regionen wurde vollständig entfernt

#### **4.18 Überprüfung von DNA Sequenzen über Sequenzanalyse**

Alle in dieser Arbeit erzeugten Deletionsvektoren wurden über Ansequenzierung der Insertbereiche überprüft, um späteren Problemen bei der Erzeugung von Deletionsstämmen vorzubeugen. Ebenso wurden die veränderten Bereiche in Deletionsstämmen über PCR amplifiziert und ansequenziert, um die Deletion auch basenspezifisch überprüfen zu können. Besonders wurde dabei auf die intakten Übergänge zwischen zwei fusionierten Flanken eines Zielgens geachtet. Mit derselben Technik wurde auch der in dieser Arbeit erzeugte integrierende Klonierungsvektor pKOS6b sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

#### **4.19 Überprüfung von Deletionen mittels *Southern Blot***

Diese Technik nach Southern (1975) mod. wurde zur endgültigen Überprüfung von erstellten Deletionsstämmen verwendet. Sie erlaubt einen hocheffizienten Nachweis bestimmter DNA-Fragmente in der gesamten, in einem Organismus enthaltenen DNA. Die Methode basiert auf dem Verdau der Gesamt-DNA mit einem ausgewählten Restriktionsenzym und der nachfolgenden Detektion eines speziellen DNA-Abschnitts durch die Hybridisierung mit einer Biotin-markierten Sonde. Die durch eine Farbreaktion sichtbar gemachten Längenunterschiede des Fragments im Vergleich zum wildtypischen Fragment bestätigt letztendlich die korrekte Deletion.

#### **Sondenmarkierung**

Die Markierung der für den *Southern Blot* verwendeten Sonden erfolgte mit dem Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit von Thermo Scientific (Waltham, USA). Die Sonde wurde über PCR amplifiziert, als Matrize diente chromosomale DNA des Wildtyps. Die Sondenlänge betrug zwischen 500 und 700 bp. Die Markierungsprozedur wurde nach Herstelleranleitung durchgeführt.

#### **Verdau, Gelelektrophorese und Blotting**

Die genomische DNA vom Wildtyp und der Deletionsmutante wurden zunächst mit einem Restriktionsenzym verdaut. Dieses Enzym wurde speziell ausgewählt, um später eine gute Unterscheidung der unterschiedlichen Längen zwischen Wildtyp und Mutanten zu ermöglichen. Der Verdau erfolgte mit 1-2 µg DNA für 30 - 40 min mit FastDigest Restriktionsenzymen von Thermo Scientific (Waltham, USA) bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur.

**Restriktionsansatz**

DNA (1-2 µg)	x	µl
FastDigest Puffer	5	µl
FastDigest Restriktionsenzym	2	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	ad	50 µl

Nach der Hydrolyse wurde die Vollständigkeit des Verdaus durch eine analytische Gelelektrophorese (II.4.6) überprüft. Es folgte die Auftrennung des gesamten restlichen Ansatzes in der Mini Horizontal Submarine Unit HE33 von Hoefer (Holliston MA, USA) mittels 0,8 %igem Agarosegel. Die angelegte Spannung betrug 80V für ca. 90 min.

Für das Blotting wurde der Vakuumblotter Model 785 von Biorad (München) verwendet. Die Nylonmembran von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) wurde so zugeschnitten, dass die Aussparung der darübergerlegten Maske etwas kleiner war. Die Ansaugfläche des Blotters wurde gründlich befeuchtet und Membran sowie Maske daraufgelegt. Im nächsten Schritt wurde das Gel auf die Aussparung, mit der darunterliegenden Membran positioniert. Es wurde darauf geachtet, dass der ganze Aufbau vollkommen luftblasenfrei ist. Der Transfer erfolgte mit den unten angegebenen Lösungen und Zeiten. Der Wechsel der einzelnen Lösungen erfolgte über seitliches Abkippen der Kammer. Das angelegte Vakuum betrug 7 mmHg.

**Depurinierung**

HCl (250 mM)	1 x 10	min
	(bzw. bis zum Gelbumschlag des blauen Farbindikators im Loading Dye)	

**Waschschritt**

H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	2 x 1	min
---------------------------------------	-------	-----

**Denaturierung**

NaOH (0,5 M), NaCl (1,5 M)	2 x 15	min
----------------------------	--------	-----

**Waschschritt**

H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	2 x 1	min
---------------------------------------	-------	-----



**Neutralisierung**

Tris-HCl (0,5 M, pH 7,5), NaCl (3 M)	2 x 15	min
--------------------------------------	--------	-----

**Transfer**

20 x SSC, Na-Citrat (0,3 M, pH 7), NaCl (3 M)	2	h
---	---	---

Im Anschluss wurde die Nylonmembran kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub> gespült und zur DNA Fixierung für 1 min mit UV Licht ( $\lambda = 302$  nm) bestrahlt. Es folgte die Trocknung mit Whatman Papier von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland).

**Hybridisierung**

Für die Hybridisierung wurde die Membran in ein verschraubbares Glasröhrchen und in den Hybridisierungssofen Hybridiser HB-1 von Techne (Duxford, UK) gegeben. Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte eine Prähybridisierung um das unspezifische Binden der Sonde an die Membran zu verhindern. Dazu wurde die Membran mit 25 ml Prähybridisierungslösung (= sondenfreie Hybridisierungslösung) für 2 h bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurde die gelabelte Sonde hitzedenaturiert in die Prähybridisierungslösung gegeben und für 16 h bei 60°C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in Puffer 1 (2 x 15 min, RT) und Puffer 2 (2 x 15 min, 60°C).

**Hybridisierungslösung**

20 x SSC	25	% (v/v)
Blocking Stammlösung (10%)	10	% (v/v)
N-Laurylsarcosin (10%)	1	% (v/v)
SDS (10%)	0,2	% (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	ad 50	ml

**Blocking Stammlösung**

Blocking Reagent (Roche, Mannheim)	10	g
Maleinsäurepuffer	ad 100	ml

**Maleinsäurepuffer pH 7,5**

Maleinsäure	1	M
NaCl	1,5	M

**Puffer 1**

20 x SSC	10	% (v/v)
SDS (10%)	0,1	% (v/v)

**Puffer 2**

20 x SSC	0,5	% (v/v)
SDS (10%)	0,1	% (v/v)

**Detektion**

Die Detektion der Sonde erfolgte mit dem Biotin Chromogenic Detection Kit von Thermo Scientific (Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht auf der Verwendung von Streptavidin, ein Protein mit hoher Bindungsaffinität zu Biotin. An Streptavidin ist eine alkalische Phosphatase ligiert, die das im Kit verwendete Substrat BCIP-T (5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat, *p*-Toluidin Salz) spaltet. Dadurch entsteht ein dunkles, unlösliches Präzipitat auf der Membran. Die Fragmente, an die die Sonde gebunden hat, werden sichtbar. Die Membran wurde nach dem Sichtbarwerden der Banden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen, um die Reaktion abzustoppen. Nach Trocknung mit Whatman-Papier wurde die Membran eingescannt und lichtgeschützt aufbewahrt.

**5. RNA Arbeitstechniken und RLM - Race****5.1 Vorbereitung von Arbeitsgeräten und Lösungen**

Aufgrund der Gefahr im Laufe der RNA Isolation die Probe mit RNasen zu verunreinigen wurden alle verwendeten Geräte und Lösungen (soweit thermostabil) zweifach bei 120°C für 30 min autoklaviert. Der zweite Autoklavierschritt wurde unmittelbar nach dem ersten gestartet. Arbeitsflächen, Handschuhe und Pipetten wurden vor und während des Arbeitens regelmäßig mit RNase-Exitus von AppliChem (Darmstadt, Deutschland) behandelt.

**5.2 Isolierung von RNA aus *G. oxydans***

Die Isolation wurde mit dem RNeasy Midi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Eine 40 ml Hauptkultur wurde in der späten exponentiellen Phase mit 10 ml Methanol versetzt bei 8.700 x g, -20°C und 15 min geerntet. Die Pellets wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss

wurden das Pellet in 2 ml TE auf Eis resuspendiert und bei  $8.700 \times g$ ,  $0^\circ\text{C}$  für 15 min zentrifugiert. Der mechanische Aufschluss erfolgte mit der Laborschwingmühle Mikro-Dismembrator U von Sartorius Stedim (Aubagne, Frankreich). Der Polytetrafluorethen-Zylinder des Dismembrators wurde in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Zellen wurden auf Eis in 200  $\mu\text{l}$  TE resuspendiert und in die geöffneten Zylinderhälfte pipettiert, in der sich auch die Chromstahlkugel befand. Nachdem das Behältnis fest verschraubt wurde, erfolgte die Desintegration der Zellen im Dismembrator bei 1600 rpm für 3 min. Das daraus resultierende Pulver wurde in 4 ml RLT Puffer und 40  $\mu\text{l}$  Merkaptoethanol gelöst. Der Puffer hat eine stark proteindenaturierende Wirkung und inhibiert dadurch auch RNasen. Die weitere Isolierung sowie die Reinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit nach Herstellerangaben. Die Elution wurde mit 2 x 150  $\mu\text{l}$  RNase freiem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ultrapure}}$  durchgeführt. Die Lagerung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **TE Puffer**

Tris-HCl (pH 8)	10	mM
EDTA (pH 8)	1	mM
2 x autoklaviert		

#### **5.3 DNA Hydrolyse und Kontroll-PCR**

Die durch den Isolierungsprozess erhaltene RNA ist nicht frei von DNA, ein Abbau ist daher unbedingt erforderlich. Zu den etwa 300  $\mu\text{l}$  RNA Lösung (II.5.2) wurden 65  $\mu\text{l}$  5 x DNase Puffer und 10  $\mu\text{l}$  DNase von Thermo Scientific (Waltham, USA) gegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei RT inkubiert, im Anschluss erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei  $70^\circ\text{C}$  für 10 min. Der vollständig erfolgte Abbau der DNA wurde mittels PCR überprüft (II.4.8). Als Matrize dienten 3  $\mu\text{l}$  der RNA Präparation. Die verwendeten Primer waren genomspezifisch mit einem Abstand zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer von nicht mehr als 2 kb. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Organismus mitgeführt. Die DNA Hydrolyse wurde wiederholt, wenn noch DNA in der RNA Probe nachweisbar war.

#### **5x DNase-Puffer (pH 5)**

$\text{MgSO}_4$	25	mM
Na-Acetat (pH 5)	500	mM
2 x autoklaviert		

#### 5.4 Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung von RNA

Die Phenol/Chloroform Extraktion diente der Entfernung aller in der RNA-Extraktion vorhandenen Proteinverunreinigungen (z.B. DNase). Der RNA wurden 1 Vol. saures Phenol (TE-gesättigt) hinzugegeben. Es folgte nach gründlicher Durchmischung auf dem Laborschüttler eine Zentrifugation der Probe bei 18.000 x g für 10 min zur Phasentrennung. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen ohne dabei Teile der proteinhaltigen Interphase zu entnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, wieder gut durchmischt und bei 18.000 x g für 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung wurde die in der wasserhaltigen Phase gelöste RNA mit 1/10 Vol. Na-Acetat (3,3 M, pH 5,0) und 2,5 Vol. -20°C kaltem, Ethanol absolut (99 %) vermischt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C bzw. 1 h bei -70°C. Zur Entfernung des Ethanols aus der Probe folgte ein 30 min Zentrifugationsschritt bei 18.000 x g. Das Ethanol wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das offene Reaktionsgefäß in einem abgedeckten, sterilen Becherglas für 15 min bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 30 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub> 1 h auf Eis gelöst und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 5.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Nanodrop 1000 von Peqlab (Erlangen, Deutschland) wie unter II.4.5 für die Bestimmung der DNA-Konzentrationen beschrieben.

#### 5.6 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Diese Methode wurde zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA eingesetzt. Sie basiert darauf, dass die RNA durch in einem ersten Schritt von der eingesetzten reversen Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben wird und im Anschluss über eine PCR nachgewiesen werden kann. Das hierfür eingesetzte OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) ermöglicht dies in einem Schritt. Als Primer werden Oligonukleotide eingesetzt, die innerhalb eines Haushaltsgens binden, für *G. oxydans* ATCC 621H wurde das Gen GOX1263 (DNA-Topoisomerase I) ausgewählt. Die RT-PCR wurde mit folgendem Ansatz und Programm durchgeführt:

**RT-PCR Ansatz**

RNA		500	ng
Primer 1263_F (5 pM)		3	µl
Primer 1263_R (5 pM)		3	µl
dNTP mix (10 mM)		1	µl
OneStep Enzyme Mix		1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	ad	25	µl

**RT-PCR Programm**

Reverse Transkription	50°C	30	min
Denaturierung	95°C	15	min
Denaturierung (Zyklus)	94°C	1	min
Annealing (Zyklus)	63°C	1	min
Elongation (Zyklus)	72°C	2	min
Finale Elongation	72°C	10	min
30 Zyklen			

**5.7 Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten mit RLM Race**

In dieser Arbeit sollten die Promotorregionen von membranständigen Dehydrogenasen bestimmt werden. Die *in silico* Bestimmung bzw. Prognostizierung von Promotorregionen bzw. Transkriptionsstartpunkten liefert nur sehr unzuverlässige Ergebnisse. Dies liegt u.a. an den äußerst variablen Längenbereichen zwischen Transkriptionsstart und ORF's. Aus diesen Gründen wurde die Transkriptionsstartpunktbestimmung experimentell durchgeführt. Dazu wurde die RACE (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) Technik verwendet. Diese Methode wurde von Frohman (1993) publiziert und dient der Untersuchung der 3'- bzw. 5'-untranslatierten Bereiche (*untranslated regions* - UTR) an den Endbereichen von Genen. Eine Abwandlung davon ist die in dieser Arbeit eingesetzte RLM (*RNA ligase mediated RACE*)-RACE Technik (Liu & Gorovsky 1993) bzw. *capfinder*-Strategie, bei der das 5'-Ende der cDNA vollständig bestimmt wird.

Die Durchführung erfolgte mithilfe des FirstChoice RLM-RACE Kit von Ambion Life Technologies (Carlsbad, USA). In einem ersten Schritt wurden sämtliche RNA-Sequenzen mit freien 5'-Phosphatenden durch eine Alkalische Phosphatase (CIP) abgebaut. Die durch *capping* geschützten mRNAs blieben dabei erhalten. Anschließend wurden die *caps* mit einer Nikotinsäure-Pyrophosphatase (TAP) abgespalten. Mithilfe einer T4-Ligase wurde in einem nächsten Schritt ein RNA-Adapter Oligonukleotid mit bekannter Sequenz an das 5'-Ende der mRNA ligiert. Es folgte eine reverse Transkription der RNA und anschließend eine *nested*-PCR mit adapterspezifischen Primern sowie genspezifischen Primern. Bei dieser Technik werden vier Primer verwendet, die im *vorwärts*- wie im *reverse*-Bereich etwa 30 bp voneinander versetzt binden. In einem ersten Schritt wurde eine PCR mit den zwei äußeren Primern durchgeführt, das Produkt aus dieser *outer*-PCR diente dann im zweiten Schritt als Matrize für die *inner*-PCR mit den zwei inneren Primern. Zusätzlich wurde auch eine *inner*-PCR mit der cDNA direkt durchgeführt ohne das *outer*-Produkt als Matrize zu verwenden. Die daraus resultierenden PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die sichtbaren DNA Banden wurden ausgeschnitten, gereinigt (II.4.6) und bei MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) mit den im Kit enthaltenen adapterspezifischen Primern bzw. mit dem inneren genspezifischen Primer sequenziert. Eine Auswertung der Sequenz mithilfe der Clone Manager Software (Version 9.0) von Sci-Ed (Cary, USA) ermöglichte eine basengenaue Bestimmung des Startpunktes der Transkription.

Ein Übersichtsschema der Durchführung und Funktionsweise dieser Methode ist in Abbildung 5 auf der nachfolgenden Seite dargestellt. Die Darstellung wurde in Anlehnung an das im Protokoll des RLM-RACE Kits enthaltene Schema angefertigt.

## 5' RLM-RACE

Behandlung mit CIP um 5' PO<sub>4</sub>-Enden von degradiertem mRNA, tRNA, rRNA und DNA zu entfernen

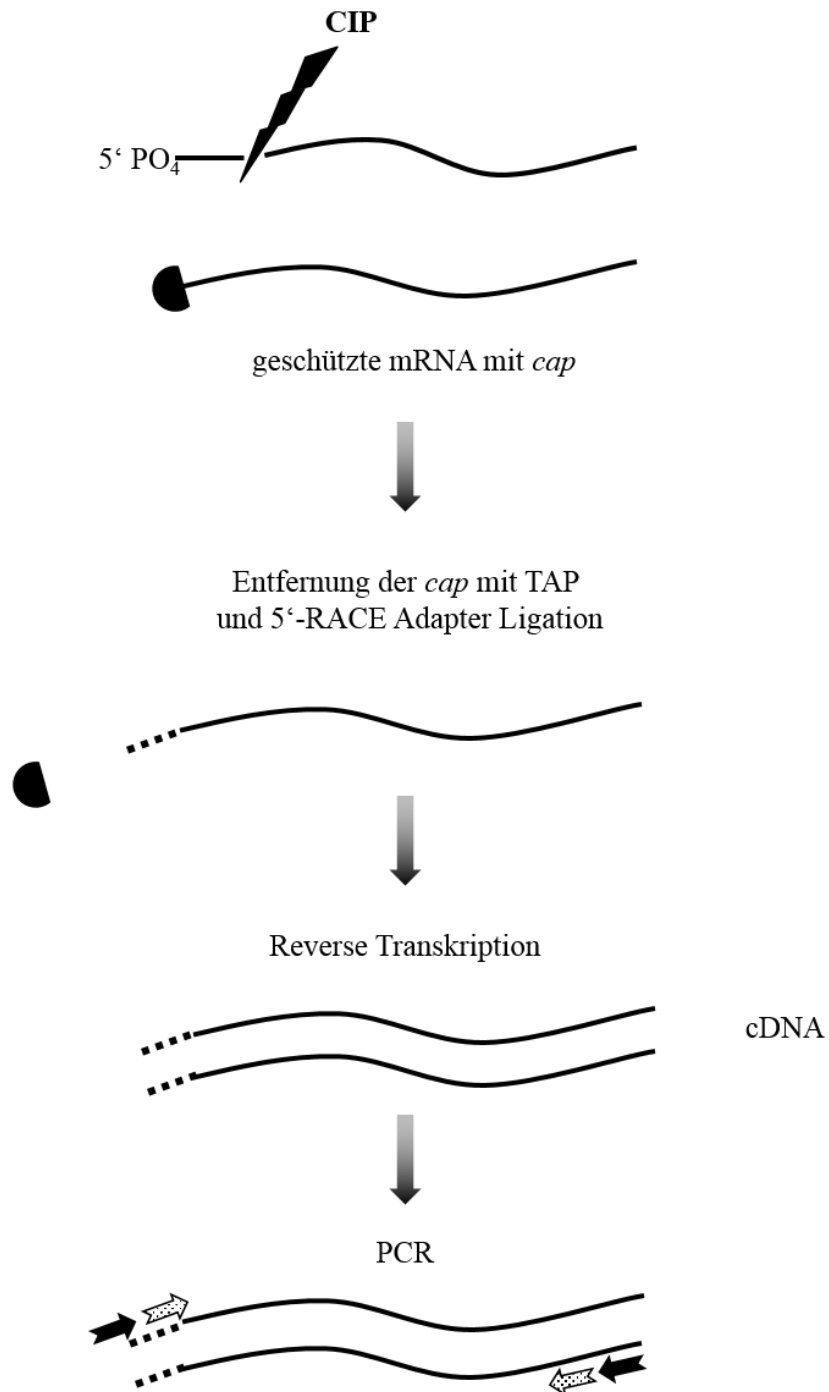


Abbildung 5: Übersichtsschema der RLM-RACE Methode zur Transkriptionsstartpunktbestimmung.  
(Nach FirstChoice RLM-RACE Kit)

## 6. Nachweis von Enzymaktivität

### **β-Galaktosidase Aktivitäts-Assays**

Die Methode nach Miller (1972) wurde angewandt, um die Stärke verschiedener Promotoren zu bestimmen, die in späteren Anwendungen für die Expression membranständiger Dehydrogenasen eingesetzt werden sollen. β-Galaktosidasen katalysieren die Hydrolyse der glycosidischen Bindung von β-D-Galaktosiden. Eine der bestuntersuchteten und am häufigsten verwendeten β-Galaktosidasen ist ein als *lacZ* codiertes Lactose-spaltendes Enzym aus *E. coli*. Für Expressionsanalysen macht man sich die Eigenschaft zunutze, dass durch *lacZ* (oder andere β-Galaktosidasen) auch die glycosidischen Bindungen von β-Galactopyranosiden wie dem künstlichen chromogenen Substrat ONPG (*ortho*-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) gespalten werden, dies macht *lacZ* zu einem wertvollen, vielfach verwendeten Reporter gen. Durch die Spaltung des farblosen ONPG entsteht gelbes *ortho*-Nitrophenol, welches bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ detektiert werden kann.

Zur Messung der unterschiedlichen Aktivitäten wurde das *lacZ* Gen aus *E. coli* direkt hinter den zu testenden Promotor auf einen Expressionsvektor gesetzt. Die Aktivitätsmessungen wurden sowohl in *E. coli* wie auch *G. oxydans* 621H durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen von Ochs (Bovenden/Lenglern, Deutschland) mit einem Füllvolumen von 10 ml. Beide Kulturen wurden mit einer ÜN-Vorkultur auf eine Start OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C (*G. oxydans*) bzw. 37°C (*E. coli*) bei 180 rpm bis zur exponentiellen Phase, dies entsprach einer OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1,2 (*G. oxydans*) bzw. 0,7 – 0,9 (*E. coli*). Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert, um das Wachstum zu stoppen. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation von 10 ml Kultur bei 3.900 x g und 4°C für 10 min. Die Zellen wurden in 10 ml Assay-Puffer gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet wieder in 10 ml Assay-Puffer resuspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Der Waschschrift wurde durchgeführt, um Wechselwirkungen von verschiedenen Medienbestandteilen mit dem Assay zu verhindern. Nachfolgend wurden 0,5 ml Zellsuspension mit 0,5 ml Assaypuffer verdünnt und durch Zugabe von 100 µl Chloroform und 50 µl 0,1 % SDS durch halbminütiges vortexen eine Zelllyse verursacht (Dieser Schritt wurde wiederholt, wenn die Farbreaktion nach ONPG Zugabe zu schwach ausfiel; die Verdünnung erfolgte im 1:10 Verhältnis). Es folgte die Äquilibration der Zellen bei 28°C für fünf min in einem Wasserbad. Die Reaktion wurde im Anschluss durch die Zugabe von 200µl ONPG (4 mg/ml in Phosphatpuffer) gestartet, die Inkubation bei 28°C wurde fortgesetzt. Sobald eine Gelbfärbung deutlich erkennbar war, wurde die Reaktion mit 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M) gestoppt. Dadurch



kommt es zu einer starken Erhöhung des pH Werts, die das Enzym nicht inaktiviert. Die Zeitspanne zwischen dem Start und dem Abstoppen der Reaktion wurde für die spätere Aktivitätsberechnung notiert. Die Probe wurde bei 12.700 x g für 5 min zentrifugiert, in eine Küvette übertragen und die OD bei einer Wellenlänge von 420 nm und 550 nm bestimmt. Für die Aktivitätsberechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Aktivität in Miller Units} = 1000 \times \frac{OD(420) - [1,75 \times OD(550)]}{T \times V \times OD(600)}$$

T = Zeitspanne zwischen Start und Abstoppen der Reaktion

V = Eingesetztes Kulturvolumen

Eine  $\beta$ -Galaktosidase Einheit (oder auch Miller Unit) wird definiert als die Menge Enzym, die pro Minute 1  $\mu$ mol des Substrates ONPG in o-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysiert (Miller 1972).

#### Assay-Puffer (Z-Puffer)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		0,06	M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		0,04	M
KCl		0,01	M
MgSO <sub>4</sub>		0,001	M
$\beta$ -Merkaptoethanol		0,05	M
H <sub>2</sub> O <sub>ultrapure</sub>	ad	50	ml
pH 7			

#### Phosphatpuffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		0,06	M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		0,04	M
pH 7			

## 7. Analytische Verfahren zur Wachstumscharakterisierung

### 7.1 Klassische Wachstumsdokumentation im Erlenmeyerkolben

Zur Charakterisierung von Wachstumsunterschieden in verschiedenen *G. oxydans* Wildtyp- und Deletionsstämmen wurde, vorwiegend in der ersten Phase der vorliegenden Arbeit, der Wachstumsverlauf über die OD<sub>600</sub> dokumentiert. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft, die von einem Festnährboden abgenommen wurde. Die Vorkultur wurde nie direkt aus einer Kryokultur angeimpft, um eventuelle Beeinträchtigungen durch die Frostlagerung zu vermeiden. Für die Hauptkultur wurden 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen von Ochs (Bovendenden/Lenglern, Deutschland) mit einem Füllvolumen von 25 ml verwendet. Die Kultur wurde auf eine Start OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30°C inkubiert. Die OD<sub>600</sub> wurde in stündlichen Abständen in einem Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro von GE Healthcare (Chalfont St Giles, United Kingdom) gemessen.

### 7.2 Wachstumsdokumentation mittels RAMOS

Eine genauere Charakterisierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in Zusammenarbeit mit Bettina Luchterhand am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (Prof. J. Büchs) der RWTH Aachen mit Hilfe von RAMOS.

Das RAMOS (respiration activity monitoring system) wurde von Anderlei *et al.* (2004) entwickelt und ermöglicht eine Echtzeitbestimmung der Sauerstofftransferrate – OTR (Geschwindigkeit, in der Zellen O<sub>2</sub> verbrauchen), Kohlendioxidtransferrate – CTR (Geschwindigkeit der CO<sub>2</sub> Bildung) und des respiratorischen Quotienten (RQ). Das System bietet die Möglichkeit durch die Messung dieser Parameter bereits im Labormaßstab Einblicke in den Metabolismus von Mikroorganismen zu gewinnen. Vor der Entwicklung von RAMOS waren derartige Messungen nur über Abgasanalyse in rührbaren Bioreaktoren möglich, was mit erheblich größerem Aufwand und Kosten verbunden war.

Pro Versuchsansatz können maximal acht speziell angefertigte Erlenmeyerkolben (50 mm Schütteldurchmesser) mit 250 ml Volumen von Kuhner (Birsfelden, Schweiz) bzw. Hitech Zang (Herzogenrath, Deutschland) eingesetzt werden. Jeder Kolben ist mit einem Lufteinlass- und einem Luftauslassventil ausgestattet und trägt einen Sensor am oberen Verschlussmechanismus. Die Messung erfolgt in kontinuierlichen Zyklen während der gesamten Inkubationsphase ohne Beeinträchtigung von Seiten der Schüttelmechanik. Das Luftvolumen in den Kolben wird in definierten Abständen mit frischer steriler Luft ausgetauscht. Nach dem Verschluss der Ein- und Auslassventile beginnt die Messphase. Dabei wird der fallende O<sub>2</sub> Partialdruck

sowie der steigende CO<sub>2</sub> Partialdruck von einem Rechner, der mit der Sensorik der Kolben verbunden ist, aufgezeichnet. Zusätzlich können im RAMOS noch sechs normale Erlenmeyerkolben mitgeführt werden, die nicht mit der Sensorik des Systems verbunden sind. Sie erlauben die Entnahme von Kulturproben an beliebigen Zeitpunkten ohne die RAMOS-Messung zu beeinträchtigen. Dadurch ist es möglich eine Vielzahl an weiteren, sogenannten Offline-Daten über die Kultur zu sammeln. Beispielsweise kann die OD<sub>600</sub> an verschiedenen Messpunkten bestimmt werden oder Stoffwechselprodukte bzw. Substratverbrauch im Medium können über HPLC definiert und analysiert werden

Die Vorkultur wurde in einem reichhaltigeren Medium angezogen. Zusammensetzung pro 1 L: Mannitol 440 mM; Hefeextrakt 4,0 g/L; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 2,5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 g/L; pH 6. Zur Kontaminationsvermeidung wurde das Medium der Vorkultur mit Cef versetzt (Endkonzentration: 60 µg/ml). Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 300 rpm in einem Rundschtüttler von Kuhner (Birsfelden, Schweiz). Die Hauptkultur wurden bei einem Füllvolumen von 10 ml MV pro Kolben durchgeführt und auf eine Start OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei denselben Bedingungen wie die Vorkultur. Die Daten wurden vom zum RAMOS gehörenden Dokumentationssystem aufgezeichnet und später manuell ausgewertet. Aus jedem Kolben wurde nur einmalig eine Offline-Probe entnommen, um den Fehler durch die Abnahme des Füllvolumens möglichst gering zu halten. Die OD<sub>600</sub> sowie der pH Wert der Offline-Proben wurde bestimmt, außerdem erfolgte eine Analyse des Substratverbrauchs mittels HPLC (II.7.3).

### **7.3 Detektion von Substratumsätzen mittels HPLC**

Die Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) ist eine Form der Verteilungschromatographie zwischen einer stationären Phase (Trennsäule) und einer mobilen Phase (Laufmittel). Dieses Verfahren erlaubt nicht nur die Auftrennung von Substanzgemischen sondern auch eine Identifikation und Quantifizierung der Bestandteile. Der Einsatz von Hochleistungs-Trennsäulen ermöglicht die detaillierte Analyse von Stoffgemischen mit sehr ähnlichen Komponenten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung der Substratkonzentrationen in den Offline-Proben aus den RAMOS-Versuchen mittels HPLC dokumentiert. Die Ausführung erfolgte durch Bettina Luchterhand am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (Prof. J. Büchs) an der RWTH Aachen. Es erfolgte eine Quantifizierung der D-Mannitol- und D-Fruktose Konzentration im Medium an verschiedenen Wachstumszeitpunkten. Die Analysen wurden im HPLC System 10A Series von Shimadzu (Kyoto, Japan) ausgeführt. In einem ersten Schritt wurde

1 ml der Offline-Probe bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mithilfe eines PVDF-Filters (0,2 µm Porendurchmesser) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) sterilfiltriert. Es wurde eine Ionenaustausch- Carbohydrate Pb<sup>2+</sup> Säule (Länge x ID: 300 x 8) inklusive Vorsäule (Länge x ID: 40 x 8) von CS-Chromatographie Service (Langerwehe, Deutschland) für die Auftrennung verwendet. Die Elution erfolgte bei 80°C mit H<sub>2</sub>O<sub>ultrapure</sub> als Eluent bei einer Flussrate von 0,6 ml / min. Die beiden Substanzen hatten auf der Säule folgende Retentionszeiten:

<b>D-Mannitol</b>	30	min
<b>D-Fruktose</b>	20	min

Die Detektion der Substanzen wurde durch den zum HPLC-System gehörenden Detektor RID-10A Refractometer von Shimadzu (Kyoto, Japan) bewerkstelligt. Die Auswertung wurde mithilfe der Software LC Solution (Version 1.25) vom selben Anbieter durchgeführt.

#### **7.4 Wachstumsanalysen mittels BioLector**

Die Messungen mit dem BioLector-System wurden von Bettina Luchterhand am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (Prof. J. Büchs) an der RWTH Aachen durchgeführt. Das System erlaubt die Online-Messung von Biomasseveränderungen mittels Streulicht (620 nm) über den gesamten Wachstumsverlauf hinweg ohne Unterbrechungen der Inkubation für die Probenentnahme bzw. ohne Mediumsverlust durch Verdünnungen. Die Streulichtmessung lässt neben der Bestimmung der Biomassenzunahme auch Rückschlüsse auf Veränderungen der Zellmorphologie zu, dies stellt einen klaren Vorteil im Vergleich zur klassischen photometrischen Bestimmung der OD<sub>600</sub>. Außerdem können NADH-, FAD-Konzentrationen, fluoreszierende Metaboliten, pH Wert und gelöster Sauerstoff mittels nicht invasiven optischen Sensoren (Optoden) online bestimmt werden. Das BioLector System wurde von Kensy *et al.* (2009) etabliert und von Huber *et al.* (2010) weiterentwickelt. Es ermöglicht die Kultivierung und Analyse von bakteriellen Kulturen im Mikrotiterplatten-Format. Dadurch bietet der BioLector Charakterisierungsmöglichkeiten einer Vielzahl an Teststämmen unter geschüttelten Bedingungen im Hochdurchsatzverfahren.

Die Vorkulturen wurden wie unter II.7.2 beschrieben in einem reichhaltigen Mannitol-Medium angezogen. Die Inkubation erfolgte in 48 Well-Mikrotiterplatten, Modell Flower Plate von

m2p-Labs (Aachen, Deutschland), mit einem Schütteldurchmesser von 3 mm und einem Füllvolumen von 1 ml MV Medium pro Kavität. Die Inkubation erfolgte bei 995 rpm bei 30°C in einem BioLector von m2p-Labs (Aachen, Deutschland). Die Dokumentation der Messwerte erfolgte automatisiert und die Auswertung wurde mit der BioLecture Software (Version 1.3.2) des zuvor genannten Herstellers durchgeführt.

### III. Ergebnisse

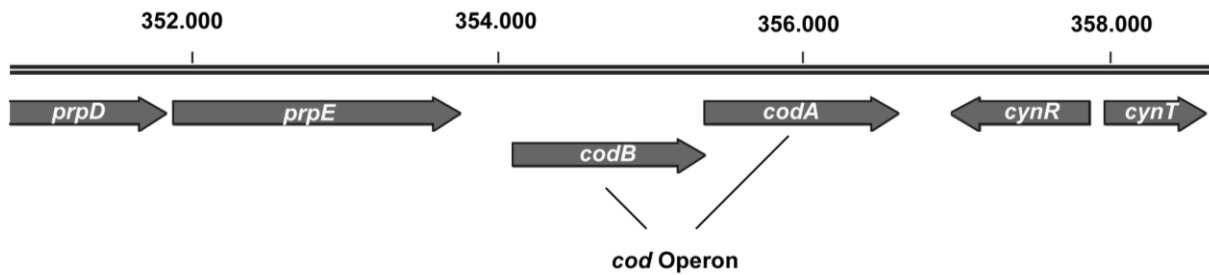
#### 1. Etablierung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems

Durch die Verfügbarkeit des Deletionssystems von Peters *et al.* (2013) wurde eine wichtige Basis für die Untersuchung des *G. oxydans* Stammes ATCC 621H gelegt. Die mehrfach versuchte Etablierung des Systems im Stamm DSM 3504 blieb erfolglos. Die für dieses System entscheidende Deletion des *upp* Gens konnte nicht ausgeführt werden. Der erste Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich daher mit der Suche nach alternativen Möglichkeiten zur Deletion, mit dem Ziel ein System zu schaffen, welches ohne vorherige Mutationen direkt in Wildtypen anwendbar ist.

##### 1.1 Auswahl eines geeigneten Gegenselektionsmarkers

Die Kriterien, die für die Auswahl eines Gegenselektions-Markergens angelegt wurden, waren vor allem das Fehlen dieses Gens im Genom von *G. oxydans* sowie die Verfügbarkeit eines preisgünstigen, leicht im Medium zusetzbaren Gegenselektionsmittels. Die Wahl fiel schließlich auf das *codA* Gen aus *E. coli* K12 (Abbildung 6). Es codiert für eine Cytosin-Deaminase, welche die Umwandlung von Cytosin und H<sub>2</sub>O zu Uracil und Ammoniak katalysiert. Es handelt sich um das Enzym, welches im Ablauf des Pyrimidinstoffwechsels direkt vor der Uracil Phosphoribosyl Transferase liegt, die für das *upp*-System verwendet wurde. Als Gegenselektionsmittel kann hierbei das allgemein als Antimykotikum eingesetzte Cytosinanalogen 5-Fluorocytosin (FC) verwendet werden. FC wird durch *codA* zu toxischem FU umgewandelt.

Das Genom von DSM 3504 wurde *in silico* auf das Vorhandensein eines *codA*-ähnlichen Gens untersucht. Es konnte eine potentielle Cytosin/Adenosin-Deaminase (GLS\_c08830) gefunden werden, ein Datenabgleich mittels BLASTP-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) zeigte eine sehr geringe Ähnlichkeit zum *codA* aus *E. coli*, mit einer max. Identität von 8/27 AS (30%). Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch das Testen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von FC bei *G. oxydans* DSM3504 abgesichert. In einem Konzentrationsbereich von 30 µg/ml (0,25 mM) bis 500 µg/ml (4 mM) konnte keinerlei Einfluss auf das Wachstum des Stammes dokumentiert werden. Ebenso wurde die MHK von 5-Fluorouracil (FU) bestimmt, um auch für diesen Stamm die für ein Deletionssystem essentielle toxische Wirkung zu gewährleisten. Bereits bei einer Konzentration von 30 µg/ml (0,25 mM) konnte kein Wachstum von DSM 3504 mehr festgestellt werden (Tabelle 5 und Tabelle 6).



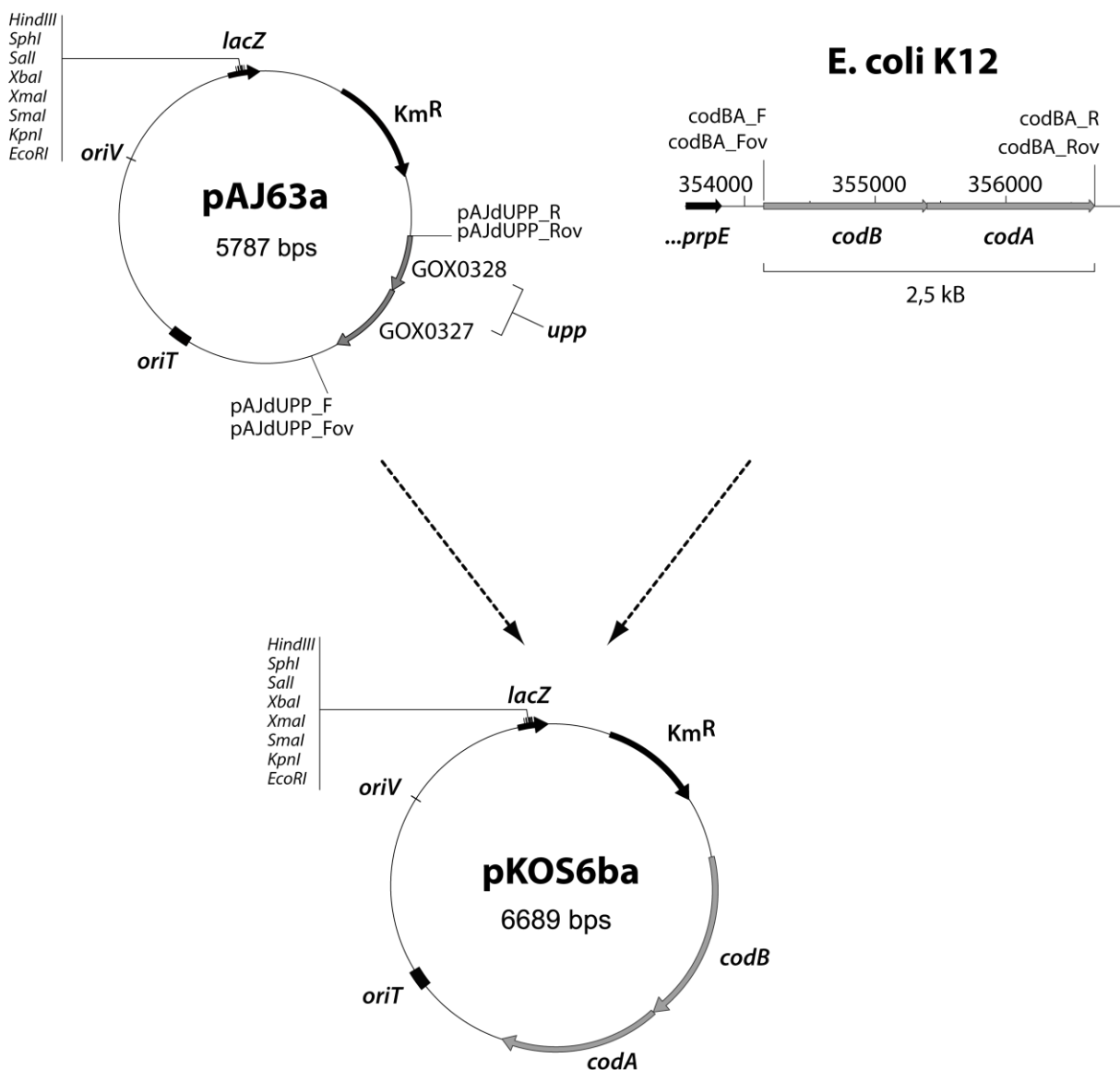
**Abbildung 6: Genomische Region des *cod* Operons aus *E. coli* K12.** Das Operon besteht aus den Genen *codA* (codierend für eine Cytosin Deaminase) und *codB* (codierend für eine Cytosin Permease).

## 1.2 Konstruktion der Basisvektoren für ein *codA* basiertes Deletionssystem

Für die Konstruktion des neuen *codA* basierten Deletionsvektors wurde pAJ63a als parentaler Vektor ausgewählt. Dabei wurde der ORF des *upp* Gens aus pAJ63 entfernt und durch die *cod*-Kassette aus *E. coli* K12 ersetzt. Der Promotorbereich von *upp* (15 bp - 200 bp vor dem Startcodon) blieb im Vektor erhalten und erfüllte dadurch die Promotorfunktion für das neu eingefügte *codA/codB*. Das *cod* Operon wurde aus dem Genom von *E. coli* K12 (einschließlich 23 bp vor dem Startcodon zur Erhaltung der RBS) amplifiziert. Für den Austausch des *upp* Gens mit der *cod* Kassette wurde die Ligase-freie Klonierungstechnik (II.4.11 S.32) verwendet. Die Primer pAJdUPP\_F / pAJdUPP\_Fov und pAJdUPP\_R / pAJdUPP\_Rov wurden für die Amplifikation des Vektorrückgrats verwendet, die Produktgröße entsprach 4088 bp. Die Primer codBA\_F / codBA\_Fov und codBA\_R / codBA\_Rov dienen der Amplifikation der *cod*-Kassette mit genomischer DNA von *E. coli* K12 als Matrize, das Produkt ergab eine Größe von 2604 bp. Die vier daraus entstandenen Produkte mit 5' bzw. 3' komplementären Überhängen wurden hybridisiert und das resultierende zirkuläre Produkt wurde zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 eingesetzt. Das Plasmid wurde aus den transformierten Zellen isoliert, es entsprach der erwarteten Größe von 6689 bp und wurde als pKOS6b bezeichnet. Die korrekte Vektorkonstruktion wurde mittels Restriktionsverdau bestätigt. Zur basengenauen Überprüfung der Vektorkonstruktion erfolgte die komplette Sequenzierung des Vektors mit den Primern pKOS6SEQ1, pKOS6SEQ2, pKOS6SEQ3, pKOS6SEQ4, pKOS6SEQ5, pKOS6SEQ6 pKOS6SEQ7 und pKOS6SEQ8. Eine schematische Darstellung der Vektorkonstruktion ist in Abbildung 7 aufgeführt.

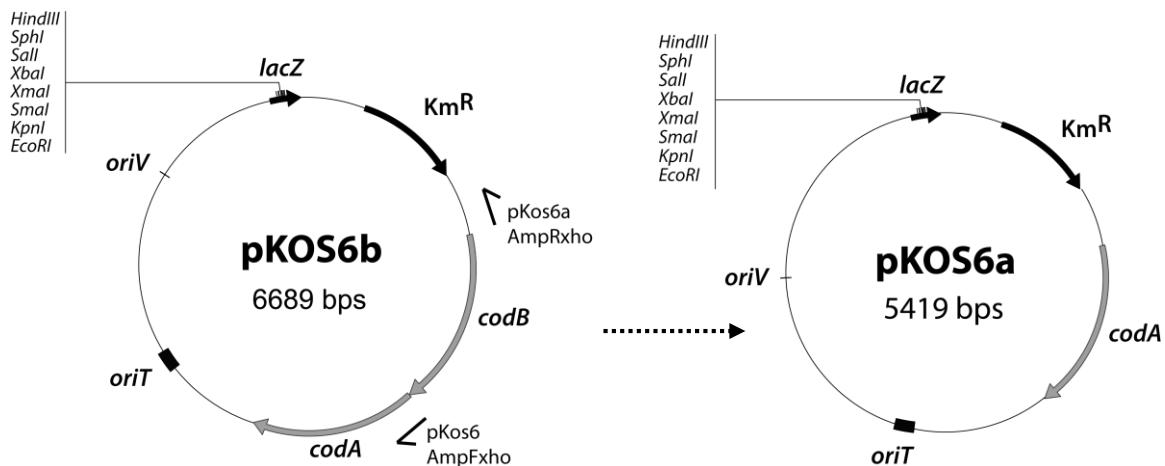
Ein zweiter, kleinerer Vektor wurde konstruiert, um den Einfluss und die Bedeutung des *codB* Gens (Cytosin Permease) für die Funktionalität der *cod*-Kassette näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde *codB* komplett aus dem Plasmid entfernt. Der zuvor konstruierte Vektor

pKOS6b diente als Matrize, mit den Primern pKos6AmpF<sub>xho</sub> und pKos6aAmpR<sub>xho</sub> wurde das Rückgrat des Vektors mit Ausschluss von *codB* amplifiziert. Das 5438 bp große Amplikon wurde mit *XhoI* hydrolysiert und in einem Ligationsprozess zirkularisiert. Der resultierende Vektor pKOS6a wurde nach der Transformation in *E. coli* Top10 isoliert und entsprach einer Größe von 5419 bp. Die Integrität des verbliebenen *codA* Gens wurde mittels Sequenzierung (Primer *codBA*checkF und *codBA*checkR) bestätigt. Eine schematische Übersicht zu der Vektorkonstruktion findet sich in Abbildung 8.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Konstruktion des Basisvektors pKOS6b.** Austausch der *upp*-Kassette mit dem *cod*-Operon aus *E. coli* K12. Km<sup>R</sup>: Kanamycin Resistenzgen; *codA*: Cytosin Deaminase; *codB*: Cytosin Permease; *oriT*: Transferursprung; *oriV* Replikationsursprung; *lacZ*: *LacZ*  $\alpha$  Gen für blau-weiß Selektion.





**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Konstruktion von pKOS6a.** Nur das *codA* Gen ist im neu konstruierten Vektor enthalten, *codB* wurde entfernt. *KmR*: Kanamycin Resistenzgen; *codA*: Cytosin Deaminase; *codB*: Cytosin Permease; *oriT*: Transferursprung; *oriV* Replikationsursprung; *lacZ*: *LacZ*  $\alpha$  Gen für blau-weiß Selektion.

### 1.3 Anwendung des *cod*-Deletionssystems in *G. oxydans* DSM 3504

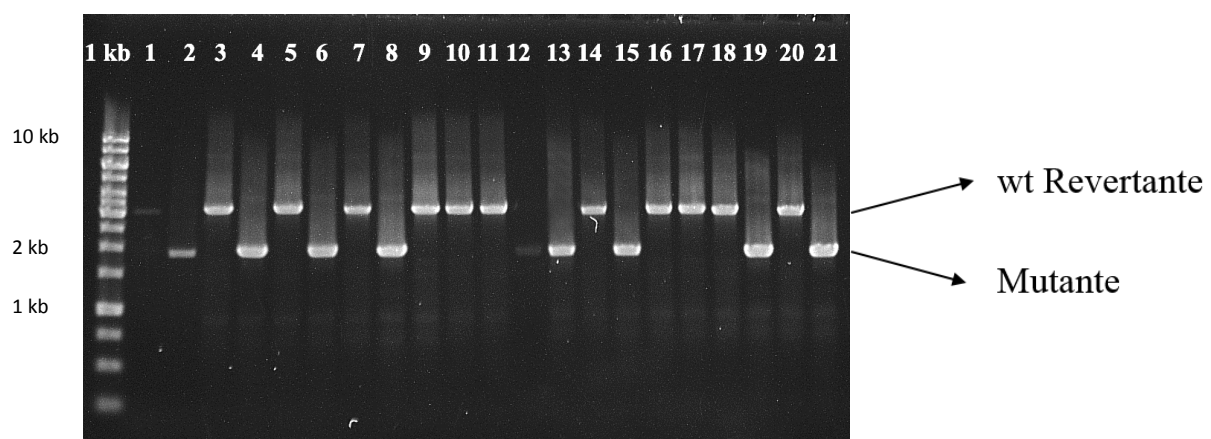
Die Funktionalität und Effizienz des neuen Deletionssystems wurde anhand einer exemplarischen Deletion im Stamm *G. oxydans* DSM 3504 getestet. Die Auswahl fiel auf das nicht essentielle Gen GLS\_c09570 (vormals RGLU00922), das laut Annotation für eine Laevansucrase codieren sollte.

#### Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b $\Delta$ 9570

Als parentaler Vektor wurde pKOS6b, welcher das gesamte *cod*-Operon aus *E. coli* enthält, eingesetzt. Die flankierenden Bereiche stromauf- und stromabwärts der Levansucrase wurden mit den Primern 0922\_F\_kpn / 0922\_FUSR und 0922FUSF / 0922\_xbaR amplifiziert. Die 912 bp bzw. 850 bp großen Produkte wurden mit den Primern 0922\_F\_kpn und 0922\_xbaR in einer LFH-PCR (II.4.9) fusioniert. Das daraus entstandene Fusionsprodukt sowie der Vektor pKOS6b wurden einem *KpnI* / *XbaI* Verdau unterzogen. Nach der Dephosphorylierung von pKOS6b erfolgte die Ligation des Fusionsprodukts in den Vektor. Der daraus resultierende Vektor wurde zur Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen verwendet. Die Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_2R wurden für eine Kolonie-PCR (II.4.8) eingesetzt und dienten der Amplifikation der MCS Region von pKOS6b. Es wurden zwei Klone mit dem korrekten Insert in pKOS6b ausgewählt und der isolierte Vektor nochmals über einen Restriktionsverdau (*EcoRI*) sowie Sequenzierung (mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) bestätigt. Der entstandene 8451 bp große Vektor wurde fortan als pKOS6b $\Delta$ 9570 bezeichnet.

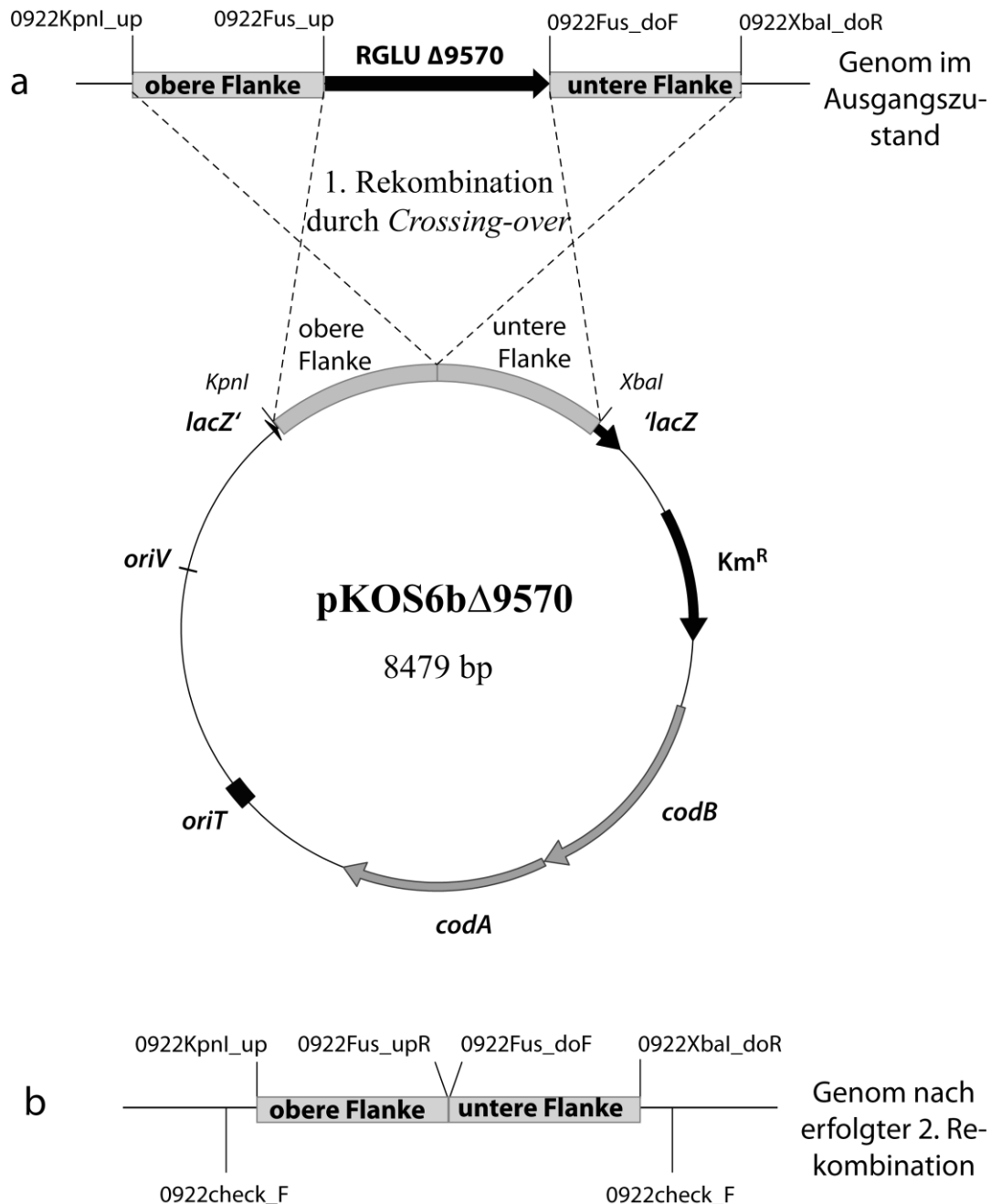
### Konstruktion eines *G. oxydans* DSM 3504 $\Delta$ 9570 Deletionsstamms

Die Transformation von *G. oxydans* DSM 3504 erfolgte mittels Elektroporation (II.4.15). Die Integration des Plasmids ins Genom (erste Rekombination) findet als zufälliges Ereignis entweder im *upstream* oder *downstream* des im Zielgen gelegenen Bereichs statt. Mit dem genom-spezifischen Primer 0922check\_F und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R wurde die erfolgte Integration mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu$ g/ml) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60  $\mu$ g/ml FC) ausplattiert. Nur Zellen, die in einem zweiten Rekombinationsschritt den integrierten Deletionsvektor verloren hatten, konnten auf dem Nährboden überleben. Besagte zweite Rekombination führt entweder zur Entstehung von Revertanten oder zum erwünschten Austausch des Zielgens mit den fusionierten Genflanken des Deletionsvektors. Nach einer Inkubationszeit von drei bis fünf Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 0922checkF und 0922checkR identifiziert. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 3178 bp, bei den Mutanten 1861 bp. Das Verhältnis zwischen Mutanten und Revertanten betrug laut der durchgeführten PCR etwa 50:50 (Abbildung 9). Zwei Klone mit nachgewiesener Mutation wurden ausgewählt und die erfolgte Deletion von 1317 bp sowohl mittels Sequenzierung (II.4.18) als auch durch einen *Southern Blot* bestätigt (II.4.19). Die genomische DNA von WT und Mutanten wurde für den *Southern Blot* vollständig mit *EcoRI* hydrolysiert. Eine 731 bp große Biotin-gelabelte Sonde (Primer 0922sondeF / 0922sondeR) wurde für die Hybridisierung eingesetzt.

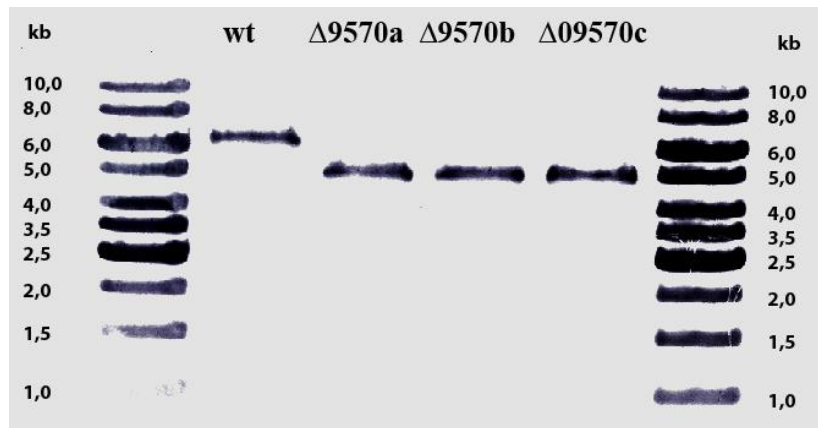


**Abbildung 9: Kolonie-PCR zum Nachweis der erfolgten 2. Rekombination nach Selektion auf FC-Nährböden.** Die durch die gelelektrophoretische Auftrennung sichtbaren Größenunterschiede ermöglichen die Unterscheidung von Revertanten (3178 bp) und Mutanten (1861 bp). Bei etwa 50 % der getesteten Klone erwies sich die Deletion als erfolgreich.

Das Ergebnis des Southern Blots ist in Abbildung 11 dargestellt, die unterschiedlichen Fragmentgrößen zwischen WT (6284 bp) und  $\Delta 9570$  Mutante (4967 bp) sind deutlich zu erkennen. Die ermittelten Größenunterschiede entsprachen exakt den Erwartungen. Mit dem Einsatz des neu entwickelten Deletionssystem ist es somit erstmals gelungen eine markerfreie Deletionsmutante in *G. oxydans* DSM 3504 zu erzeugen.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Funktionsweise des *cod*-Deletionssystems anhand der Deletion des Gens *GLS\_c09570* (Levansucrase) in *G. oxydans* DSM 3504. (a) Integration des Deletionsvektors in die obere bzw. untere Homologieflanke im Genom über *crossing over*. (b) Die resultierende markerfreie Gendeletion, mit fehlendem *GLS\_c09570* zwischen den Genflanken.**



**Abbildung 11: Southern Blot zum Nachweis der markerfreien Deletion der Levansucrase (GLS\_c09570) in *G. oxydans* DSM 3504.** Die genomische DNA des WT sowie der  $\Delta 9570$  Mutanten a bis c wurde mit *EcoRI* hydrolysiert, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet. Die 731 bp große Sonde wurde mit den Primern 0922sondeF / 0922sondeR und genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Die Hybridisierung wurde mit der Biotin gelabelten Sonde bei 60°C durchgeführt. Die Banden entsprachen den erwarteten Größen von 6284 bp für den WT und 4967 bp für die Deletionsstämme.

#### 1.4 Etablierung des *cod*-Deletionssystems in *G. oxydans* ATCC 621H

Um die Eignung der Methode für ein generelles Deletionssystem mit Anwendungsmöglichkeiten in verschiedenen *G. oxydans* Stämmen zu belegen, wurde eine  $\Delta 854\Delta 855$  Mutante mit fehlender Polyol-Dehydrogenase (*sldAB*) des Stammes ATCC 621H erzeugt. In einem ersten Schritt wurde die minimale Hemmkonzentration von FC und FU bestimmt. Die Hemmkonzentrationen entsprachen den Werten, die zuvor bei DSM 3504 beobachtet wurden. Bei FC wurde bis zu Konzentrationen von über 500  $\mu\text{g/ml}$  (4 mM) keine hemmende Wirkung auf das Wachstum nachgewiesen. FU wirkte schon ab 30  $\mu\text{g/ml}$  (0,25 mM) stark hemmend (Tabelle 5 und Tabelle 6).

**Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentration von FC bei *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 3504.** Die dargestellten Daten ergaben sich aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten.

FC Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	30	60	120	240	500
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	+	+	+	+	+	+
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	+	+	+	+	+	+

**Tabelle 5: Bestimmung der MHK von FU bei *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 3504.** Die dargestellten Daten ergaben sich aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten.

<b>FU Konzentration [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>180</b>
<i>G. oxydans</i> 621H	+	-	-	-	-
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	+	-	-	-	-

### **Konstruktion des *sldAB*-Deletionsvektors (pKOS6b $\Delta$ *sldAB*)**

Als Ausgangsvektor wurde pKOS6b eingesetzt, die flankierenden Bereiche des Zielgens wurden mit den Primern *sldAB\_xbaF* / *up\_sldA\_rev* und *do\_sldB\_fwd* / *sldAB\_ecoR* amplifiziert. Das 967 bp große *upstream* Fragment wurde über eine LFH-PCR (II.4.9) mit dem 1018 bp großen *downstream* Fragment fusioniert und im Anschluss mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut. Nach der Ligation in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten pKOS6b erfolgte die Übertragung des Konstrukts in chemisch-kompetente *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_2R durchgeführt. Der aus *E. coli* isolierte, über Restriktionsverdau (*EcoRI*) und Sequenzierung überprüfte Vektor hatte eine Größe von 8674 bp und wurde nun als pKOS6b $\Delta$ *sldAB* bezeichnet.

### **Erzeugung einer *sldAB*-Deletionsmutante**

Die Transformation von *G. oxydans* ATCC 621H erfolgte bei diesem Stamm über Konjugation mit *triparentalem Mating* (II.4.14). Die erste Rekombination (Integration des Vektors ins Genom) wurde mit den Primern *sldABseq\_F* und pK18MCS\_R über Kolonie-PCR nachgewiesen. Für die 2. Rekombination wurden einige der Integrentenklone unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu\text{g/ml}$ ) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60  $\mu\text{g/ml}$  FC) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von drei bis fünf Tagen wurden die Klone mit erfolgter 2. Rekombination über eine Kolonie-PCR bestimmt. Mutanten wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern *sldABseq\_F* und *sldABseq\_R* von Revertanten unterschieden. Diese Primerkombination ergab für den WT eine Fragmentgröße von 4674 bp und 2728 bp für Stämme mit erfolgreicher Deletion von *sldAB*. Die erfolgte Deletion von 1946 bp wurde außerdem über Sequenzierung mit den Primern *sldABseq\_F* / *sldAseq\_R* sowie mittels *Southern Blot* bestätigt. Für die letztere Überprüfungsmethode wurde die genomische DNA vom WT wie Mutante mit *EcoRI* vollständig verdaut. Eine 750 bp große Biotin-

gelabelte Sonde (PCR Produkt aus sonde\_sldAB\_F / sonde\_sldAB\_R mit genomischer DNA als Matrize) wurde für die Hybridisierung eingesetzt. Die aus der Gendeletion resultierenden Größenunterschiede von 1946 bp zwischen WT und  $\Delta$ sldAB Mutante sind in Abbildung 13 deutlich erkennbar.

Die Mutanten entsprachen ebenso dem erwarteten Phänotyp: Aufgrund der fehlenden Polyol-Dehydrogenase war kein Wachstum in Flüssig- bzw. auf Festmedien mit Mannitol als C-Quelle feststellbar. Dadurch konnte die erfolgreiche Anwendung des *cod*-Deletionssystems in einem zweiten wildtypischen Stamm bestätigt werden.

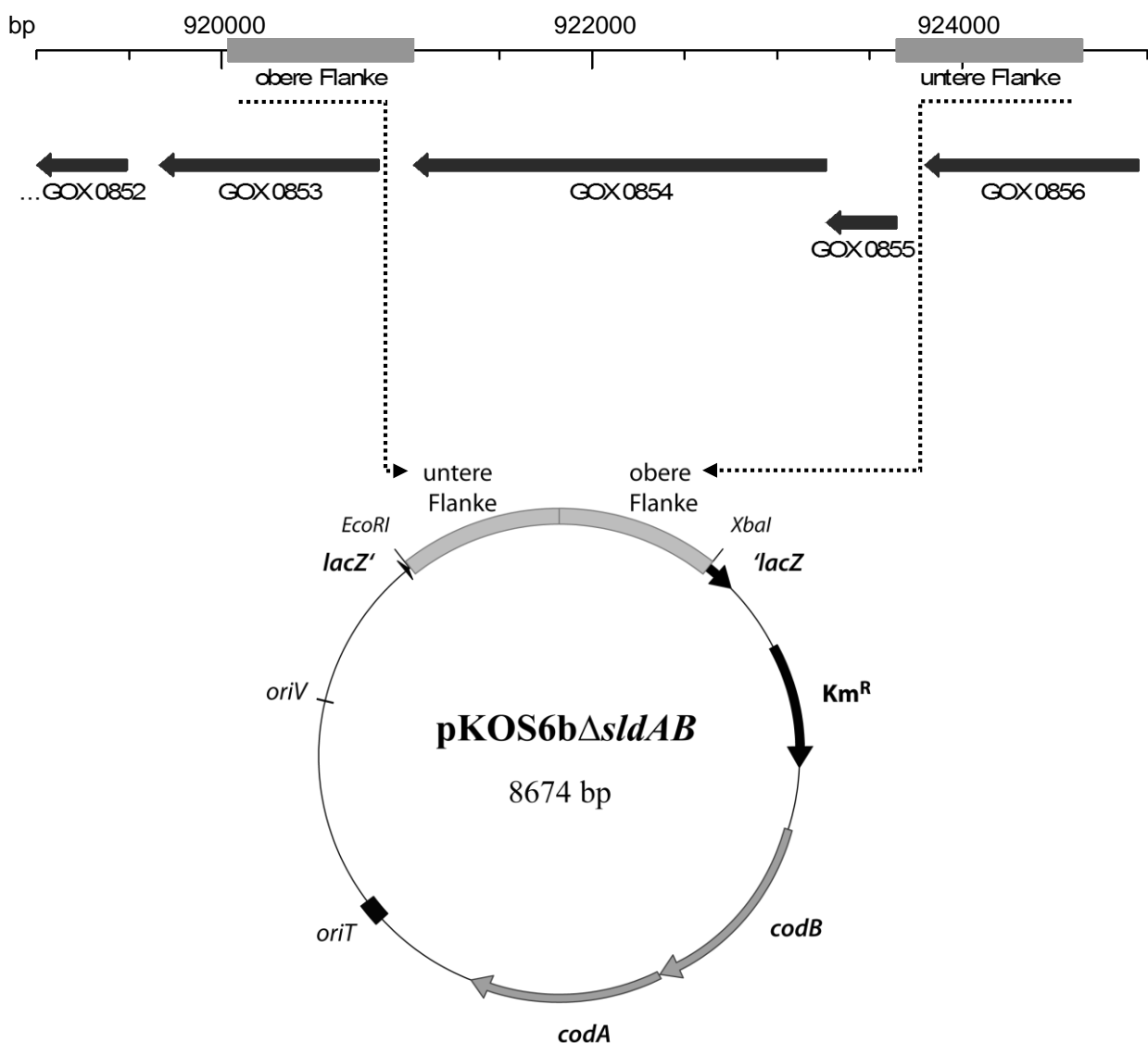
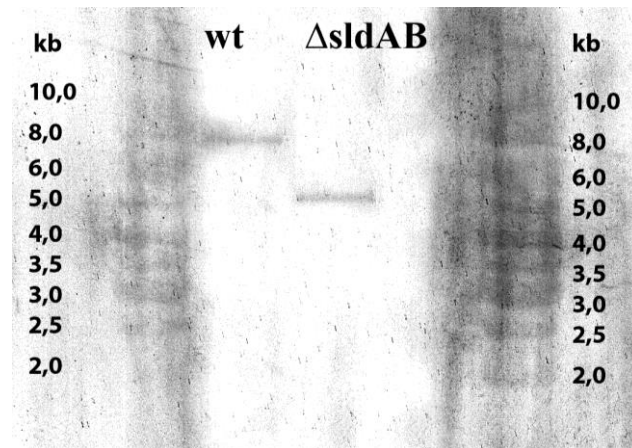


Abbildung 12: Übersicht der Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b $\Delta$ sldAB zur Deletion der Polyol Dehydrogenase in *G. oxydans* ATCC 621H. Die strangaufwärts und strangabwärts gelegenen Flankenbereiche wurden über PCR amplifiziert, über LFH-PCR fusioniert und in pKOS6b inseriert.



**Abbildung 13: Southern Blot zum Nachweis der markerfreien Deletion von *sldAB* (GOX0854 / GOX0855) in *G. oxydans* ATCC 621H.** Die genomische DNA des WT sowie der  $\Delta sldAB$  Mutante wurde mit *EcoRI* hydrolysiert, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet. Die 750 bp große Sonde wurde mit den Primern sonde\_ *sldAB*\_F / sonde\_ *sldAB*\_R und genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Die Hybridisierung wurde mit der Biotin gelabelten Sonde bei 67°C durchgeführt. Die Banden entsprachen den erwarteten Größen von 7937 bp für den WT und 5326 bp für den Deletionsstamm.

### 1.5 Untersuchung des Einflusses von *codB* auf das *cod*-Deletionssystem

Die Bedeutung von *codB* für das Deletionssystem sowie für die Umwandlung von FC zu toxischem FU sollte näher untersucht werden, um die Möglichkeit zu überprüfen einen kleineren Deletionsvektor, der nur *codA* enthält, zu verwenden. In diesem Versuch wurden beide Varianten des Deletionsvektors (pKOS6a, enthält nur *codA* Gen und pKOS6b, enthält *codA* sowie *codB*) in Bezug auf ihr Verhalten unter FC-Selektionsdruck miteinander verglichen

### Konstruktion der Integrationsvektoren und Integration ins Genom von *G. oxydans*

Eine homologe Region zum Genom von ATCC 621H wurde in die Vektoren inseriert, um die Integration zu erzwingen. Als Homologieregion wurde ein 1115 bp großes PCR Produkt des strangabwärts gelegenen Bereichs von GOX2567-GOX2569 (Typ I Restriktionssystem) genutzt. Die Amplifikation der strangabwärts gelegenen Flanke erfolgte mit den Primern 2567\_F\_ECO und 2567\_FUS\_R. Als Matrize diente genomische DNA von *G. oxydans* ATCC 621H. Die mit *EcoRI* und *XbaI* hydrolysierte Homologieregion wurde in die entsprechenden Schnittstellen der dephosphorylierten und verdauten Vektoren pKOS6a und pKOS6b ligiert. Die resultierenden Vektoren wurden mittels Restriktionsverdau (*EcoRI*) und Sequenzierung überprüft und wiesen eine Größe von 6534 bp sowie 7804 bp auf.

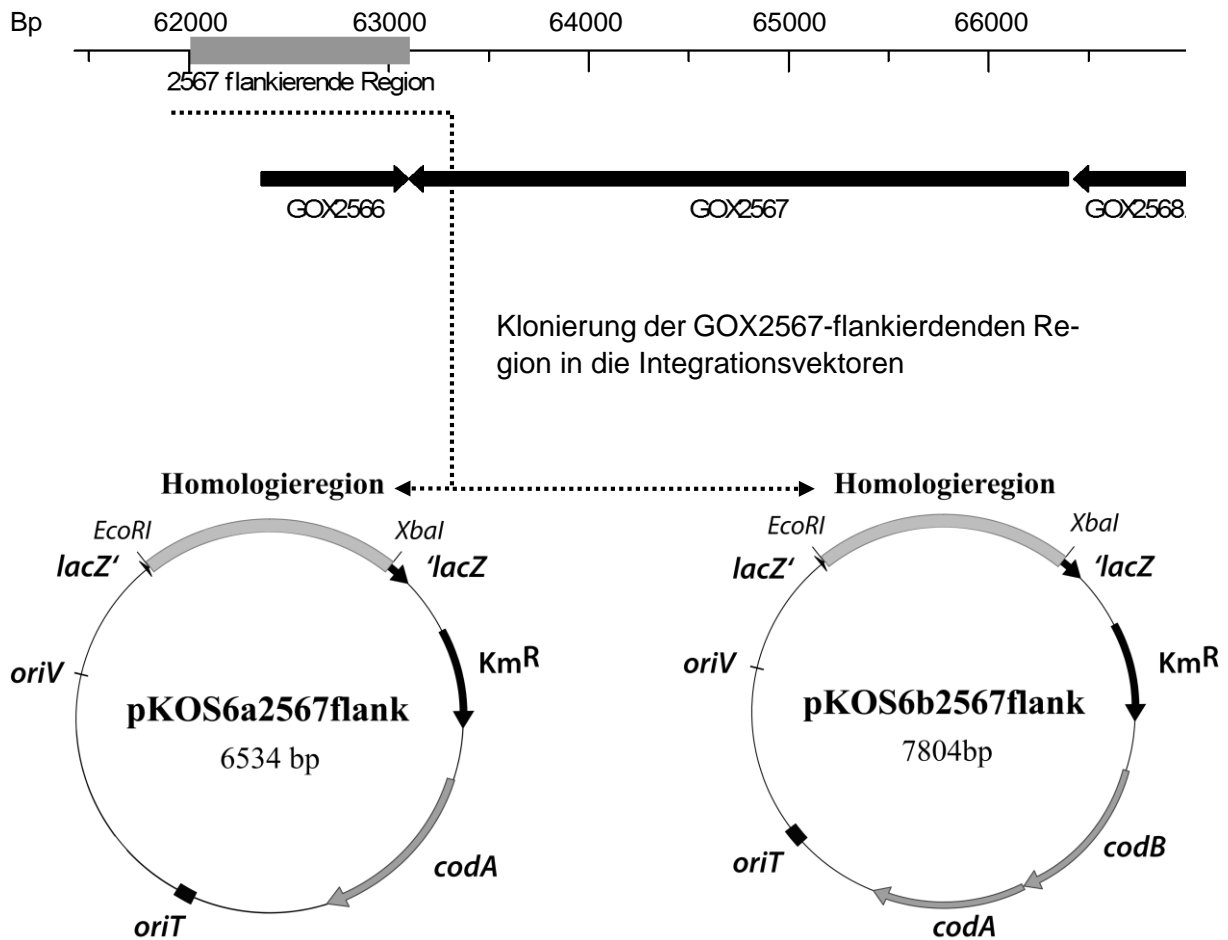


Abbildung 14: Übersicht der Konstruktion der Integrationsvektoren zum Testen der Bedeutung von *codB* für die Umsetzung von FC zu toxischem FU.

Die Transformation von *G. oxydans* ATCC 621H erfolgte über Konjugation mittels *triparentalem Mating*. Die Integration wurde auf Nährböden mit 50 µg/ml Km gewachsenen Kolonien mittels Kolonie-PCR nachgewiesen (genomspezifischer Primer 2567\_F\_CHECKgenom und plasmidspezifischer Primer pK18MCSR).

### Untersuchung der FC-Umsatzeffizienz der Integrationsvektoren

Die Integrationsvektoren pKOS6a2567flank und pKOS6b2567flank wurden in Wachstumsversuchen auf ihre Fähigkeit hin getestet FC in toxisches FU umzuwandeln. Die Stämme *G. oxydans* ATCC 621H pKOS6a2567flank und ATCC 621H pKOS6b2567flank wurden in Reagenzgläsern in MV mit Konzentrationen von 0 bis 500 µg/ml FC und 50 µg/ml Km angeimpft und bei 30°C für drei Tage in einem Rundschtüttler inkubiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.



Für den Stamm mit integriertem *codA/codB* Vektor wurde eine MHK von 60 µg/ml FC bestimmt. Bei 30 µg/ml erfolgte ein leichtes Anwachsen des Stammes, das aber dann vollkommen zum Erliegen kam. Für den Stamm mit integriertem pKOS6a2567flank Vektor ohne *codB* stieg die MHK auf den Wert 500 µg/ml an (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Bestimmung der MHK von FC in *G. oxydans* ATCC 621H mit integriertem pKOS6a2567flank (fehlende Cytosin Permease) bzw., pKOS6b2567flank (Cytosin Deaminase und Cytosin Permease enthalten).**

FC Konzentration [µg/ml]	0	30	60	120	240	500
<i>G. oxydans</i> 621H mit integriertem pKOS6a2567flank	+	+	+	+	+/-	-
<i>G. oxydans</i> 621H mit integriertem pKOS6b2567flank	+	+/-	-	-	-	-

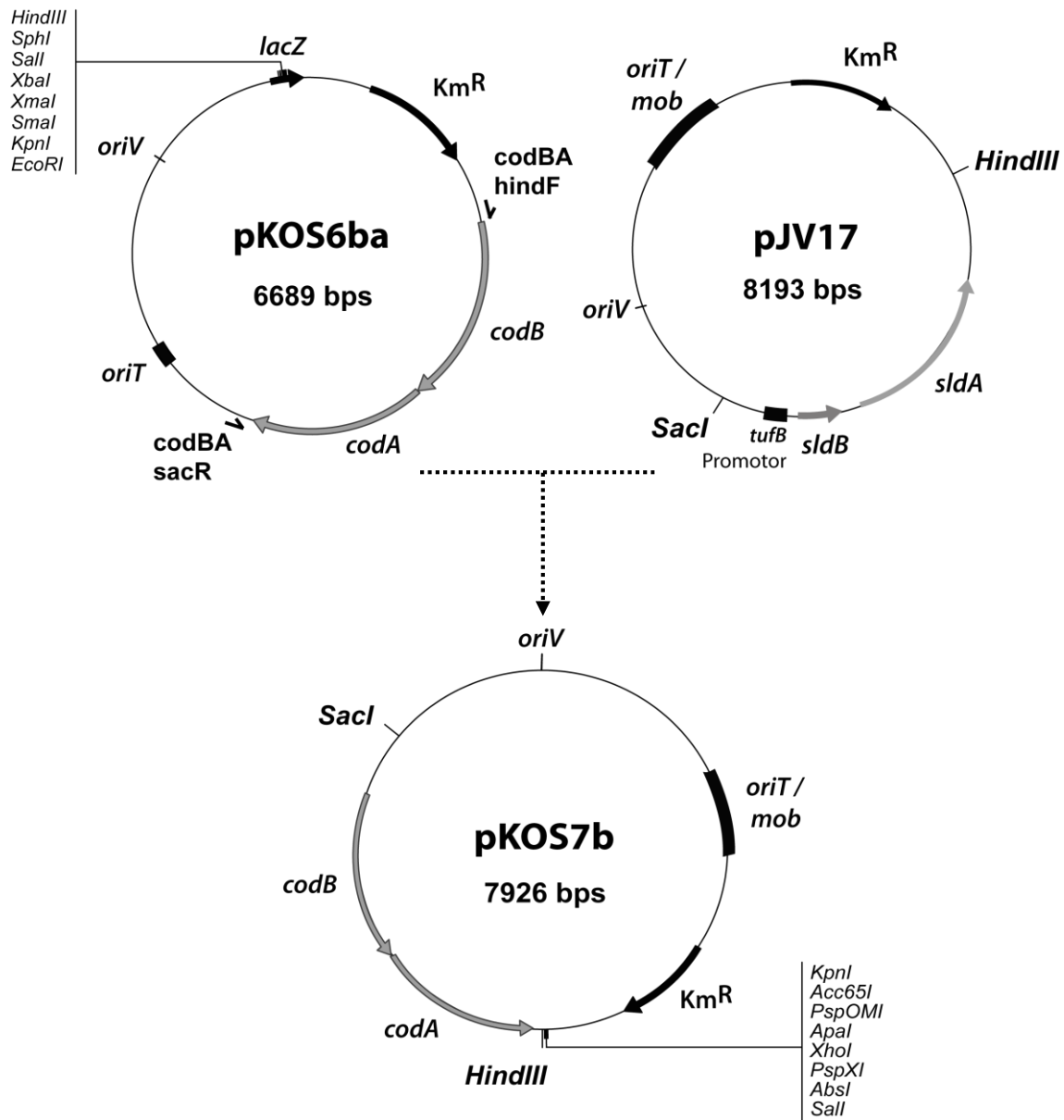
### 1.6 Studie zur Verwendung eines replizierenden Vektors für das *cod*-Deletionssystem

Die Verwendung von Suizid-Vektoren wie pKOS6b bringt eine geringere Transformationseffizienz mit sich, da das seltene Ereignis der Rekombination stattfinden muss, um das „Überleben“ des Vektors in der Zelle zu ermöglichen. Die Verwendbarkeit eines replizierenden Vektors sowie der Einfluss der Suizid-Eigenschaft auf die Funktionalität des *cod*-Deletionssystems sollten daher näher untersucht werden.

#### Konstruktion eines replizierenden Vektors mit *cod*-Operon

Als parentaler Vektor wurde pJV17, ein in *G. oxydans* replizierender Vektor, verwendet. Die enthaltenen *sldAB* Gene inklusive Promotor wurden komplett mit dem *cod*-Operon inklusive *upp* Promotor aus pKOS6b ausgetauscht. Die *sldAB* Gene wurden aus pJV17 über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *SacI* mittels Hydrolyse entfernt. Der Verdau wurde über Gelelektrophorese aufgetrennt und das 5080 bp große Fragment mit dem Rückgrat von pJV17 über Gelextraktion isoliert. Die *cod*-Kassette wurde mit dem Primern *codBAhindF* / *codBASacR* amplifiziert, Plasmid DNA von pKOS6b diente als Matrize. Das PCR Produkt mit einer Größe von 2861 bp wurde im Anschluss mit *HindIII* und *SacI* verdaut und mit dem ebenso verdauten und dephosphorylierten Vektorrückgrad von pJV17 in einer Ligationsreaktion fusioniert. Der daraus resultierende Vektor wurde zur Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*

TOP10 Zellen verwendet. Die Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R wurden für eine Kolo-  
nie-PCR eingesetzt und dienten der Amplifikation der Insertionsregion des neuen Vektors. Es  
wurden vier Klone mit dem korrekten Insert ausgewählt und nochmals über einen Restriktions-  
verdau (*SspI*) (Abbildung 16) sowie Sequenzierung (mit den Primern pK18MCS\_F und  
pK18MCS\_R) bestätigt. Der entstandene Vektor mit einer Größe von 7927 bp wurde als  
pKOS7b bezeichnet.



**Abbildung 15: Konstruktionsübersicht des Plasmids pKOS7b.** Über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *HindIII* KmR: Kanamycin Resistenzgen; *codA*: Cytosin Deaminase; *codB*: Cytosin Permease; *oriT / mob*: Transferursprungregion mit *mob*-Gen; *oriV* Replikationsursprung; *lacZ*: *LacZ*  $\alpha$   $\beta$  Galaktosidase Gen für blau-weiß Selektion.

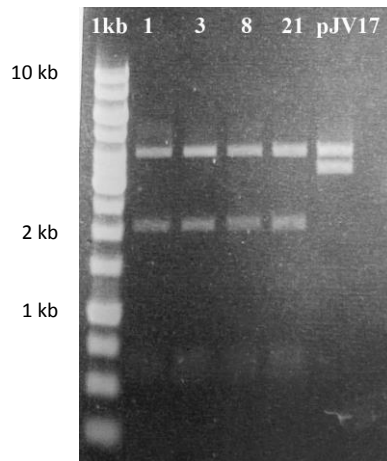


Abbildung 16: Agarosegel zur Bestätigung der pKOS7b Klone 1, 3, 8 und 21 sowie pJV17 nach Hydrolyse mit *SspI*. Fragmentgrößen von pKOS7b: 4440 bp, 2186 bp, 697 bp und 604 bp. Fragmentgrößen von pJV17: 4440 bp und 3753 bp.

### Konstruktion eines pKOS7b $\Delta$ ndh Deletionsvektors

Um die Effizienz eines replizierenden Deletionsvektors zu testen sollte das Gen GLS\_c05650 (NADH Dehydrogenase) in *G. oxydans* DSM 3504 deletiert werden. Die Genflanken des Zielgens wurden mit den Primern 0541\_HindF / 0541\_R\_upFUS und 0541\_F\_doFUS / 0541\_SalR amplifiziert und wiesen eine Größe von 908 bp (obere Flanke) und 933 bp (untere Flanke) auf. Die Flanken wurden mit den Primern 0541\_HindF und 0541\_SalR über LFH-PCR fusioniert. Insert und Vektor wurden mit *HindIII* und *Sall* verdaut, nach der Dephosphorylierung des Vektors folgten der Ligationsschritt und die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen. Die Primer pKOSreducR und codBcheckF wurden für eine Kolonie-PCR eingesetzt und dienen der Amplifikation der Insertionsregion des neuen Vektors. Es wurden vier Klone mit dem korrekten Insert (PCR Produkt mit 2550 bp) ausgewählt und nochmals mittels Sequenzierung (mit den Primern pKOSreducR und codBcheckF) bestätigt. Der entstandene Vektor pKOS7b $\Delta$ ndh wies eine Größe von 9702 bp auf (Abbildung 17).

### Verwendung von pKOS7b $\Delta$ ndh als Deletionsvektor

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Verwendung eines replizierenden Vektors Vorteile im Deletionsprozess mit sich bringt. Der Deletionsvektor wurde mittels Elektroporation in *G. oxydans* DSM 3504 transferiert und auf Km (50  $\mu$ g/ml) ausplattiert. Eine Vielzahl an Kolonien konnten am folgenden Tag auf den Platten beobachtet werden. Die erste Rekombination (Integration) des Vektors in die Homologieflanke des Genoms wurde mit den Primern pKOSreducR und 0541\_check\_R überprüft. Trotz mehrfacher Wiederholung des Versuchs konnte die saubere Integration des Plasmids nicht nachgewiesen werden. Die PCR wies stets mehrere Banden auf, die über ihre Größe nicht zugeordnet werden konnten, auch die

durchgeführten Sequenzierungsversuche erlaubten keine klare Lokalisierung der erfolgten, mehrfachen Rekombinationen des Vektors mit dem organismischen Genom. Die Versuche eine 2. Rekombination zu erreichen schlugen fehl, es konnten nur Revertanten nachgewiesen werden (Primer 0541\_check\_F / 0541\_check\_R). Die Einführung eines replizierenden Vektors für das *cod*-Deletionssystem brachte somit keine Steigerung der Effizienz mit sich, eine Deletion war nicht durchführbar. Die Funktionalität der Methode hängt offensichtlich von der Verwendung eines Suizidvektors, wie pKOS6b, mit starkem Drang zur Integration ins Genom ab. Die geringere Transformationseffizienz des Suizidvektors im direkten Vergleich zu einem replizierenden Vektor ist für die Erzeugung von Deletionsmutanten nicht relevant.

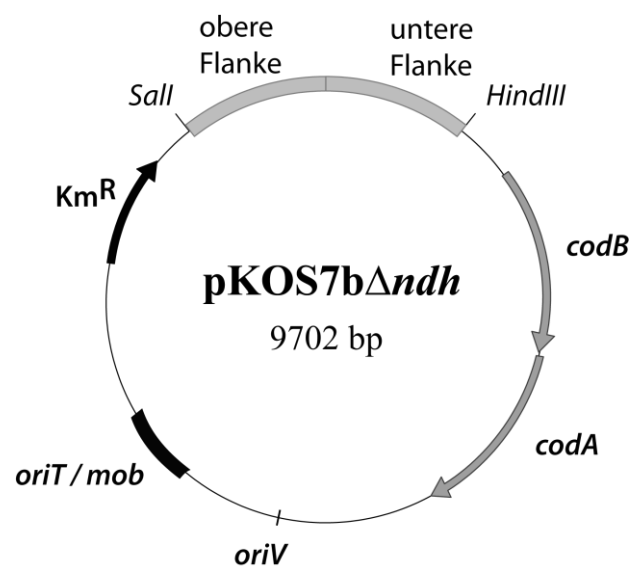


Abbildung 17: Vektorkarte des pKOS7b basierten Deletionsvektors für das *ndh* Gen aus *G. oxydans* DSM 3504

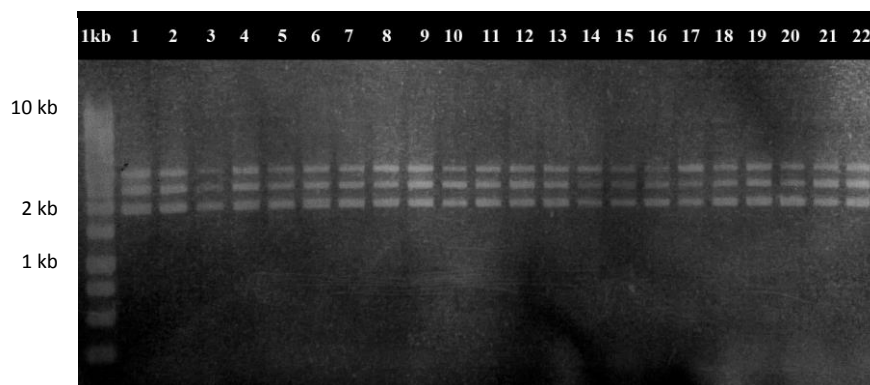
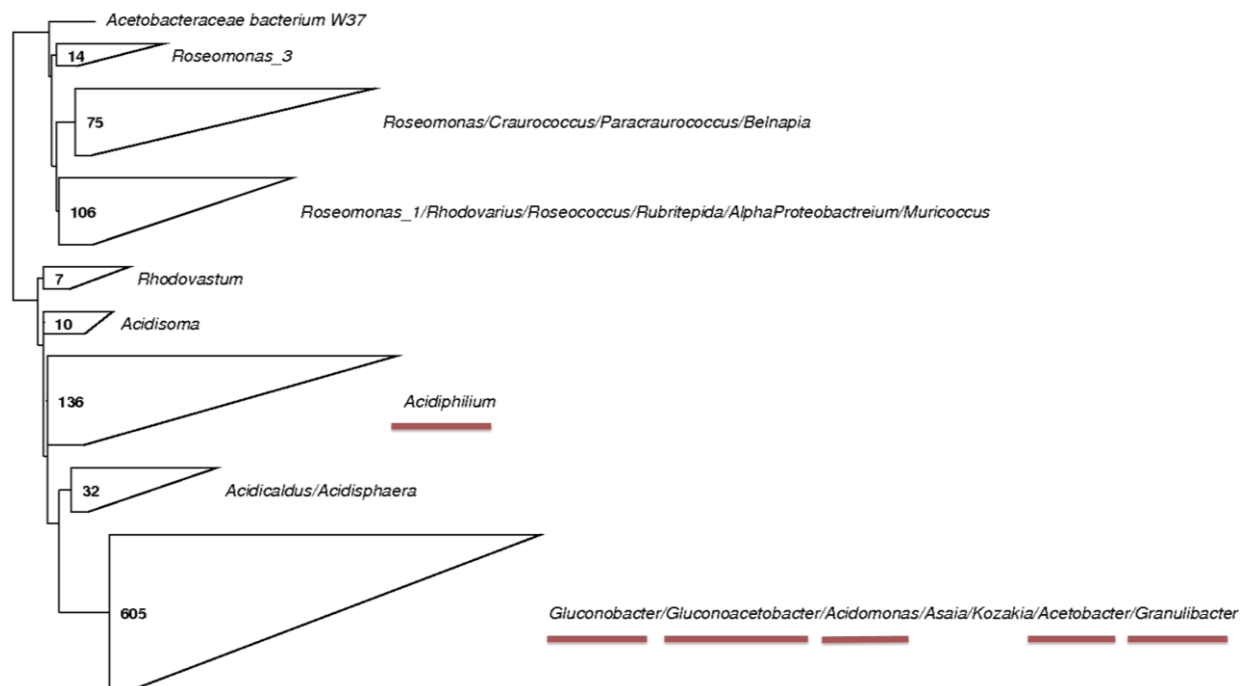


Abbildung 18: Nachweis der Integration von pKOS7b $\Delta$ *ndh* mittels Kolonie-PCR. Die normalerweise erfolgte Integration über eine Homologieflanke konnte nicht nachgewiesen werden. Durch die auf dem Agarosegel sichtbaren, mehrfach erfolgten Rekombinationen konnte die 2. Rekombination nicht eingeleitet werden.

### 1.7 Etablierungsmöglichkeiten des *cod*-Deletionssystems in weiteren Acetobacteraceae

Aufgrund der einfachen und problemlosen Etablierung der neuen *cod*-Deletionsmethode in verschiedenen *G. oxydans* Stämmen, wurden die Anwendungsmöglichkeiten in weiteren Acetobacteraceae untersucht. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf Stämme mit verfügbaren Genomsequenzdaten gelegt, für die es bisher keine effizient funktionierenden Deletionssysteme gab.



**Abbildung 19: Phylogenetischer Baum der 16s RNA Gensequenzen der Familie der Acetobacteraceae nach Ludwig *et al.* (2004).** Die Topologie wurde mittels ARB Software ermittelt. Die mit einem Balken markierten Gattungen wurden über einige ihrer Vertreter auf die Kompatibilität für das *cod*-Deletionssystem hin untersucht.

#### *In silico* Überprüfung der Anwendungsmöglichkeiten

In einem ersten Schritt wurden die Sequenzdaten einiger ausgewählter Acetobacteraceae *in silico* mithilfe des BLASTP-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) auf das Vorhandensein des *upp* Gens aus *G. oxydans* ATCC 621H hin untersucht, dies stellt die Grundlage für die Funktionalität des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Deletionssystems dar. Eine Uracil Phosphoribosyl Transferase konnte in allen untersuchten Sequenzen nachgewiesen werden, alle entsprechenden Gene wiesen relativ hohe Ähnlichkeiten zum *upp* Referenzgen (GOX 0327) aus ATCC 621H auf (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Auflistung der Sequenzähnlichkeiten (ermittelt mittels BLASTP-Algorithmus) des *upp* Gens aus *G. oxydans* ATCC 621H mit den Uracil Phosphoribosyl Transferasen verschiedener Acetobacteraceae.**

Organismus	Identität zu <i>upp</i>	Abdeckung (query coverage)
<i>G. oxydans</i> DSM3504	99 % (211 / 212 AS)	100 %
<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601	70 % (145 / 207 AS)	97 %
<i>A. pasteurianus</i> LMG 1513	71 % (147 / 208 AS)	98 %
<i>A. multivorum</i> DSM 11245	62 % (128 / 205 AS)	96 %
<i>G. bethesdensis</i> DSM 17861	62 % (126 / 204 AS)	96 %

Die Genomsequenzen der Stämme wurden ebenso auf das Vorhandensein eines Cytosin Deaminase Gens hin untersucht, die den Einsatz des *cod* Operons aus *E. coli* unter Umständen erschweren könnte. Eine funktionelle Cytosin Deaminase würde die Gegenselektion verhindern, da bereits der Wt das Gegenselektionsmittel umsetzt. Es konnte ein als Cytosin Deaminase annotiertes Gen in *A. multivorum* DSM 11245 gefunden werden. Die Identität zum *codA* Gen erwies sich aber als nicht signifikant. Die Identität von 26 % zu einer Amidohydrolase aus *G. diazotrophicus* DSM 5601 konnte ebenso als nicht signifikant eingestuft werden. In den übrigen Stämmen brachte die Suche mit BLASTP und dem *codA* Gen als Suchsequenz keine Übereinstimmungen.

**Tabelle 8: Übersicht der Sequenzähnlichkeiten (ermittelt mittels BLASTP) des *codA* Gens aus *E. coli* K12 mit der Cytosin Deaminase aus *A. multivorum* bzw. *G. oxydans* DSM 3504 und einer Amidohydrolase aus *G. diazotrophicus*.**

Organismus	Identität zu <i>codA</i>	Abdeckung (query coverage)
<i>A. multivorum</i> DSM 11245	46 % (173 / 374 AS)	87 %
<i>G. diazotrophicus</i> DSM 5601	26 % (170 / 388 AS)	90 %
<i>G. oxydans</i> DSM3504	30 % (8 / 27 AS)	10 %
<i>A. pasteurianus</i> LMG 1513	/	/
<i>G. bethesdensis</i> DSM 17861	/	/

### Experimentelle Überprüfung der FC Resistenz / FU Sensibilität

Die Resistenz der Acetobacteraceae-Stämme gegen FC, sowie die Sensibilität gegenüber FU ist essentiell für die Funktionalität des *cod*-Deletionssystems. Die z. T. bereits *in silico* überprüften Stämme wurden deshalb einer experimentellen Überprüfung unterzogen, um eine endgültige Aussage zur Anwendungsmöglichkeit treffen zu können. Dazu wurden Wachstumsversuche in FC- und FU-haltigen Medien durchgeführt, um die MHK für die verschiedenen Acetobacteraceae-Stämme zu bestimmen. Die Versuche wurden in 5 ml stammspezifischem Medium in Reagenzgläsern bei den entsprechenden Kulturbedingungen (II.3.3) durchgeführt. FC

sowie FU war in steigenden Konzentrationen zugegeben worden. Die Inkubationszeit betrug mindestens drei Tage.

Wie in Tabelle 9 ersichtlich konnte bei den getesteten Stämmen keinerlei wachstumshemmende Wirkung von FC festgestellt werden, selbst bei Konzentrationen über 500 µg/ml wurde keine Beeinträchtigung des Wachstums festgestellt. Während *A. multivorum* DSM 11245 ab dem zweiten Inkubationstag unvermindertes Wachstum bei allen Konzentrationen zeigte, konnte bei den anderen Stämmen schon nach einem Inkubationstag stark fortgeschrittenes Wachstum beobachtet werden. Die wachstumshemmende Wirkung von FU hingegen konnte in allen getesteten Stämmen, schon bei relativ geringen Konzentrationen (30 µg / ml) festgestellt werden. Der einzige Stamm, der bei 30 µg / ml FU noch leichtes Wachstum zeigte war *A. pasteurianus* LMG 1513, ab 60 µg / ml war bei keinem der getesteten Stämme Wachstum feststellbar. Dies ermöglicht die Nutzung des auf dem Gegenselektionsmarker *codA* basierten Deletionssystems nicht nur für die Kerngruppe der Essigsäurebakterien sondern für eine Vielzahl weiterer Acetobacteraceae (Abbildung 19).

**Tabelle 9: Bestimmung der MHK von FC für verschiedene Acetobacteraceae.**

5-FC concentration [µg/ml]	0	30	60	120	240	500
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	+	+	+	+	+	+
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	+	+	+	+	+	+
<i>G. oxydans</i> DSM 7145	+	+	+	+	+	+
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> DSM 5601	+	+	+	+	+	+
<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1513	+	+	+	+	+	+
<i>Acidomonas methanolica</i> DSM 5432	+	+	+	+	+	+
<i>Granulibacter bethesdensis</i> DSM 17861	+	+	+	+	+	+
<i>Acidiphilium multivorum</i> DSM 11245	+	+*	+*	+*	+/-*	+/-*

\* Wachstum nach zwei Tagen feststellbar

Tabelle 10: Bestimmung der MHK von FU für verschiedene Acetobacteraceae.

5-FU concentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	30	60	90	180
<i>G. oxydans</i> 621H	+	-	-	-	-
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	+	-	-	-	-
<i>G. oxydans</i> DSM 7145	+	-	-	-	-
<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> DSM 5601	+	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1513	+	-/+	-	-	-
<i>Acidomonas methanolica</i> DSM 5432	+	-	-	-	-
<i>Granulibacter bethesdensis</i> DSM 17861	+	-	-	-	-
<i>Acidiphilium multivorum</i> DSM 11245	+	-	-	-	-

## 2. Untersuchung der Wachstumscharakteristiken von *G. oxydans* DSM 3504

### 2.1 Genomische Unterschiede zwischen *G. oxydans* DSM 3504 und ATCC 621H

Die Betrachtung und Gegenüberstellung der unterschiedlichen genotypischen Merkmale der nah verwandten *G. oxydans* Stämme stellte die Grundlage für die detaillierte Untersuchung der sich stark unterscheidenden Wachstumseigenschaften dar. Wie Junker (2009) anhand eines Genomvergleichs beider Stämme zeigen konnte, gibt es in DSM 3504 345 offene Leserahmen, die in ATCC 621H vollkommen fehlen. Neben einer Vielzahl an hypothetischen Proteinen kommen auch verschiedene Dehydrogenasen nur in DSM 3504 vor. In der Dissertation von Junker (2009) wurden vier Gene mit möglichen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten ausgewählt: eine Nitrilase (GLS\_c12310), eine Gluconat 2-Dehydrogenase mit zwei Untereinheiten (GLS\_c05030 und GLS\_c05040), eine Triosephosphat Isomerase (GLS\_c05720) und eine NADH Dehydrogenase (GLS\_c05650). Die Deletionen der Gene in DSM 3504 konnten nicht durchgeführt werden, da es für den Stamm kein funktionierendes Deletionssystem gab. Die Gene wurden zwar in ATCC 621H exprimiert, eine Steigerung der Biomassebildung konnte dabei lediglich für die NADH Dehydrogenase dokumentiert werden. Die Gründe für die stark abweichende Biomasseproduktion konnte dadurch allerdings nicht auf fundierte Weise erfolgen.



Für eine detaillierte Untersuchung des Einflusses und der Funktionen besagter Gene wurden nun direkt in DSM 3504 Deletionen mithilfe der neu entwickelten Methode generiert und die Mutanten in ausgiebigen Wachstumsanalysen charakterisiert. Die ausgewählten Gene sind in Tabelle 11 aufgelistet.

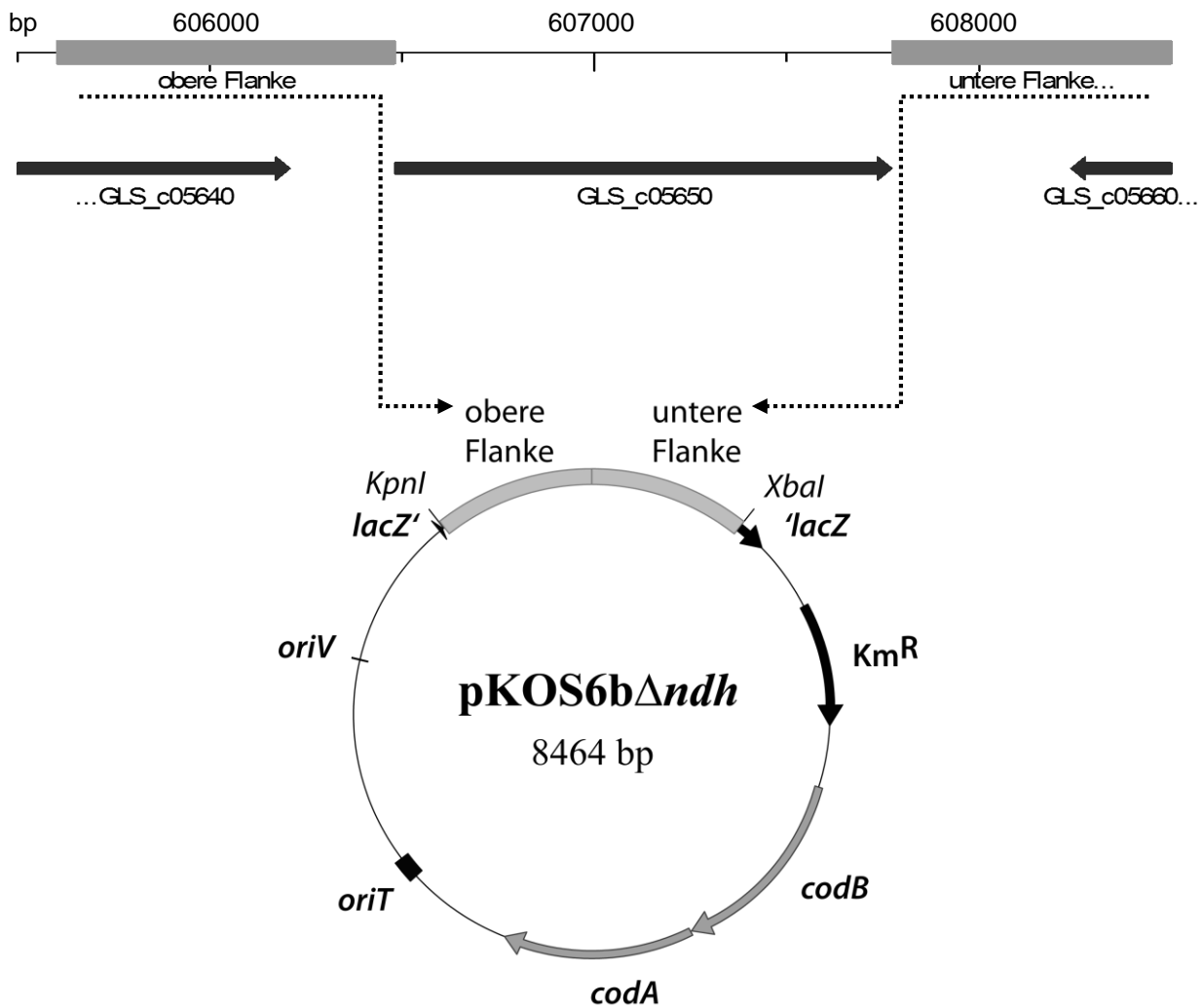
**Tabelle 11: Auflistung der zu deletierenden Gene aus *G. oxydans* DSM 3504 zur Untersuchung der Wachstumscharakteristik des Stammes im Vergleich zu ATCC 621H**

Annotationsnummer	Genbezeichnung	Abkürzung	Größe (bp)
GLS_c05650	NADH Dehydrogenase (Klasse II)	<i>ndh</i>	1293
GLS_c05720	Triosephosphate Isomerase	<i>tpiA</i>	789
GLS_c05030	Gluconat 2-Dehydrogenase (alpha Untereinheit)	<i>g2dh-a</i>	1779
GLS_c05040	Gluconat 2-Dehydrogenase (gamma Untereinheit)	<i>g2dh-b</i>	699

## 2.2 Deletion der *ndh* in *G. oxydans* DSM 3504

### Konstruktion des Vektors zur Deletion von *ndh*

Als Ausgangsvektor wurde pKOS6b eingesetzt, die flankierenden Bereiche des Zielgens *ndh* (GLS\_c05650) (Genbezeichnung ist nicht festgelegt, *ndh* wurde in der vorliegenden Arbeit als Abkürzung verwendet, um konsistent mit den Annotationsbezeichnungen zu bleiben) wurden mit den Primern 0541\_F\_Kpn\_up / 0541\_R\_upFUS und 0541\_F\_doFUS / 0541\_R\_xbaDO amplifiziert und wiesen eine Größe von 908 bp (obere Flanke) und 933 bp (untere Flanke) auf. Die Flanken wurden mit den Primern 0541\_F\_Kpn\_up und 0541\_R\_xbaDO über LFH-PCR fusioniert. Im Anschluss erfolgte die Hydrolyse mit *KpnI* und *XbaI*. Nach der Ligation in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten pKOS6b (Abbildung 20) erfolgte die Übertragung des Konstrukts in chemische-kompetente *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_2R durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte Vektor pKOS6b $\Delta$ ndh hatte eine Größe von 8464 bp und wurde durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* (Fragmentgrößen: 7696 bp, 388 bp, 316 bp, 52 bp, 12 bp) und über Sequenzierung (Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) überprüft.

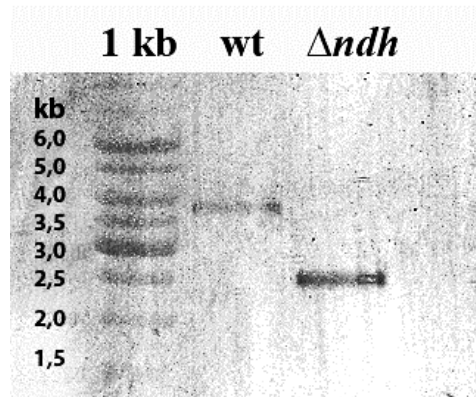


**Abbildung 20:** Übersicht der Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b $\Delta$ ndh zur Deletion der NADH Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 3504. Die strangaufwärts und strangabwärts gelegenen Flankenbereiche wurden über PCR amplifiziert, über LFH-PCR fusioniert und in pKOS6b inseriert.

### Erzeugung des *G. oxydans* DSM 3504 $\Delta$ ndh Deletionsstamms

Die Transformation von *G. oxydans* DSM 3504 erfolgte mittels Elektroporation. Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genom-spezifischen Primer 0541\_check\_F und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu$ g/ml) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60  $\mu$ g/ml FC) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 0541\_check\_F und 0541\_check\_R bestimmt. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 3197 bp und bei den Mutanten 1904 bp. Ein Klon mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 1293 bp mittels Sequenzierung (Primer 0541\_check\_F und 0541\_check\_R) wie auch durch einen *Southern Blot*

(Abbildung 21) bestätigt. Die genomische DNA von WT und Mutanten wurde für den *Southern Blot* vollständig mit *EcoRI* hydrolysiert. Eine 710 bp große Biotin-gelabelte Sonde (PCR Amplifikat aus Primern sonde\_0541nF / sonde\_0541nR) wurde für die Hybridisierung eingesetzt.



**Abbildung 21: Southern Blot zum Nachweis der markerfreien Deletion von *ndh* (GLS\_c05650) in *G. oxydans* DSM 3504.** Die genomische DNA des WT sowie der  $\Delta ndh$  Mutante wurde mit *EcoRI* hydrolysiert. Die Hybridisierung wurde mit der 710 bp großen Biotin markierten Sonde bei 67°C durchgeführt. Die Banden entsprachen den erwarteten Größen von 3841 bp für den WT und 2548 bp für den Deletionsstamm.

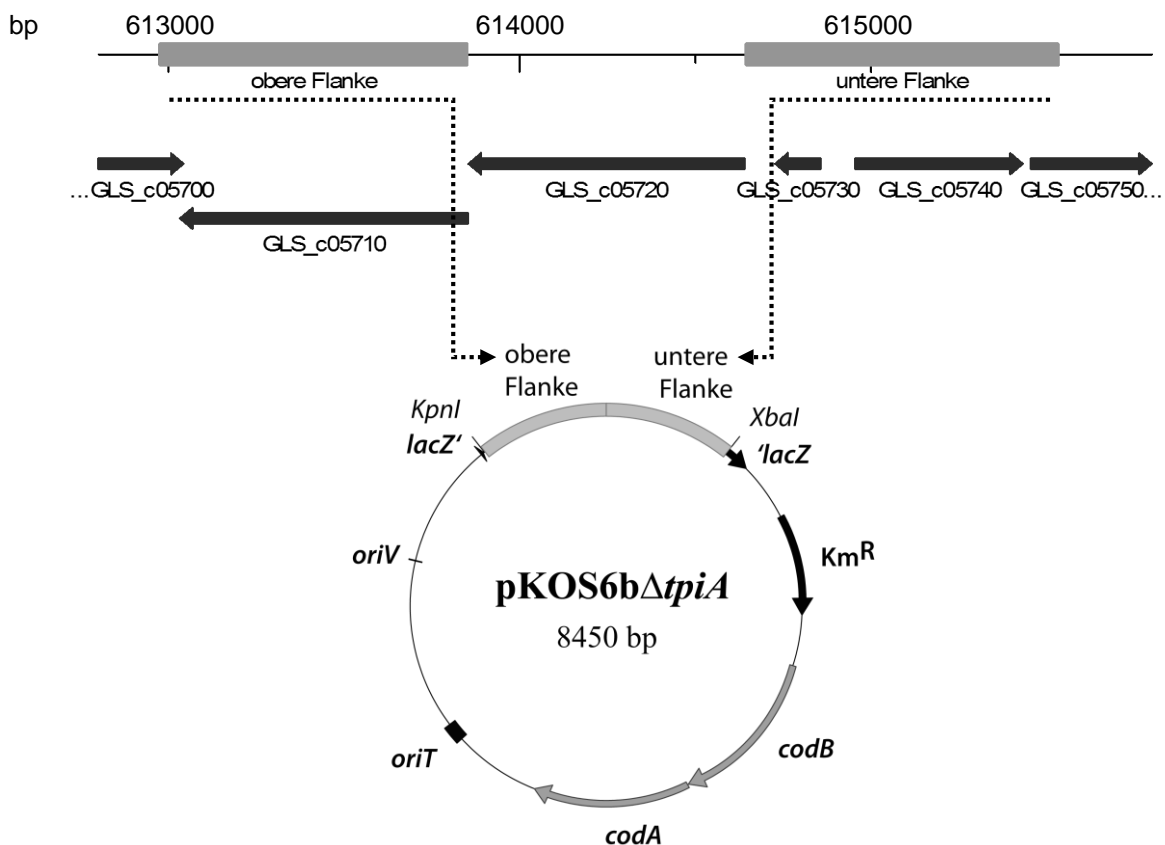
## 2.3 Deletion der *tpiA* in *G. oxydans* DSM 3504

### Konstruktion des Vektors zur Deletion von *tpiA*

Die flankierenden Bereiche des Zielgens *tpiA* (GLS\_c05720) wurden mit den Primern 0548\_Kpn\_F / 0548\_FUS\_R und 0548\_FUS\_F / 0548\_xbaR amplifiziert und wiesen eine Größe von 907 bp (obere Flanke) und 917 bp (untere Flanke) auf. In einer LFH-PCR wurden die Flanken mit den Primern 0548\_Kpn\_F und 0548\_xbaR fusioniert. Im Anschluss erfolgte der Verdau des Inserts mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XbaI*. Nach der Ligation in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten pKOS6b (Abbildung 22) erfolgte damit die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_2R durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte und durch einen Restriktionsverdau mit *XbaI* überprüfte Vektor pKOS6b $\Delta tpiA$  hatte eine Größe von 8450 bp, eine Sequenzierung (Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) bestätigte die korrekte Basenabfolge des Inserts.

### Erzeugung eines *G. oxydans* DSM 3504 $\Delta tpiA$ Deletionsstamms

Die Transformation von *G. oxydans* DSM 3504 erfolgte mittels Elektroporation. Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genom-spezifischen Primer 0548\_check\_F und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Druck von Km (50  $\mu\text{g/ml}$ ) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60  $\mu\text{g/ml}$  FC) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 0548\_check\_F und 0548\_check\_R bestimmt. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 3713 bp und bei den Mutanten 2924 bp. Ein Klon mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 789 bp mittels Sequenzierung (Primer 0548\_check\_F und 0548\_check\_R) bestätigt. Außerdem wurde ein *Southern Blot* durchgeführt: Die genomische DNA von WT und Mutanten wurde dafür vollständig mit *PstI* hydrolysiert. Eine 695 bp große Biotin-gelabelte Sonde (PCR Amplifikat aus Primern 0548\_sonde\_F / 0548\_sonde\_R) wurde für die Hybridisierung eingesetzt (Abbildung 23).

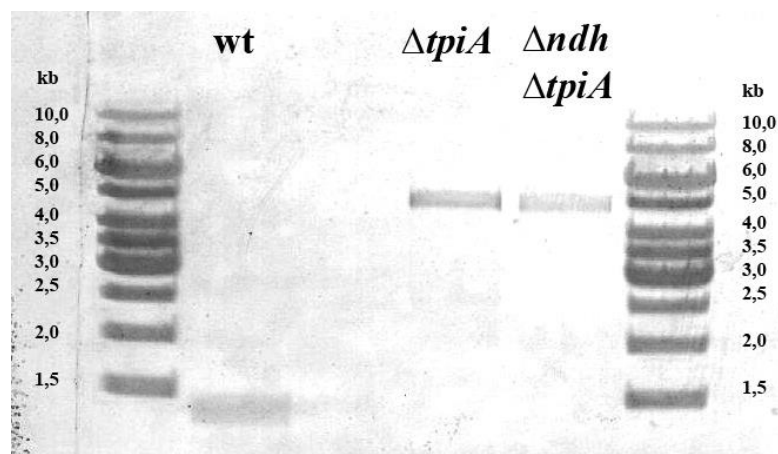


**Abbildung 22:** Übersicht der Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b $\Delta tpiA$  zur Deletion der Triosephosphat Isomerase in *G. oxydans* DSM 3504 Die strangaufwärts und strangabwärts gelegenen Flankenbereiche wurden über PCR amplifiziert, über LFH-PCR fusioniert und in pKOS6b inseriert.

## 2.4 Erzeugung einer *G. oxydans* DSM 3504 $\Delta ndh \Delta tpiA$ Doppelmutante

Um die Auswirkungen der Deletionen der *ndh* sowie *tpiA* in einem einzigen Stamm zu untersuchen und mit den Einzelmutanten zu vergleichen, wurde ein  $\Delta ndh \Delta tpiA$  Deletionsstamm von DSM 3504 erzeugt.

Der unter III.2.3 konstruierte Vektor pKOS6b $\Delta tpiA$  wurde erneut für die Deletion der *tpiA* eingesetzt. Als Empfängerstamm für die Transformation mittels Elektroporation diente der validierte Deletionsstamm *G. oxydans* DSM 3504 $\Delta ndh$ . Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genomspezifischen Primer 0548\_check\_F und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu\text{g/ml}$ ) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60  $\mu\text{g/ml}$  FC) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 0548\_check\_F und 0548\_check\_R bestimmt. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 3713 bp und bei den Mutanten 2924 bp. Ein Klon mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 789 bp mittels Sequenzierung (Primer 0548\_check\_F und 0548\_check\_R) und *Southern Blot* bestätigt. Dafür wurde die genomische DNA von WT und Mutante vollständig mit *PstI* hydrolysiert. Eine 695 bp große Biotin-markierte Sonde (PCR Amplifikat aus Primern 0548\_sonde\_F / 0548\_sonde\_R) wurde für die Hybridisierung eingesetzt.

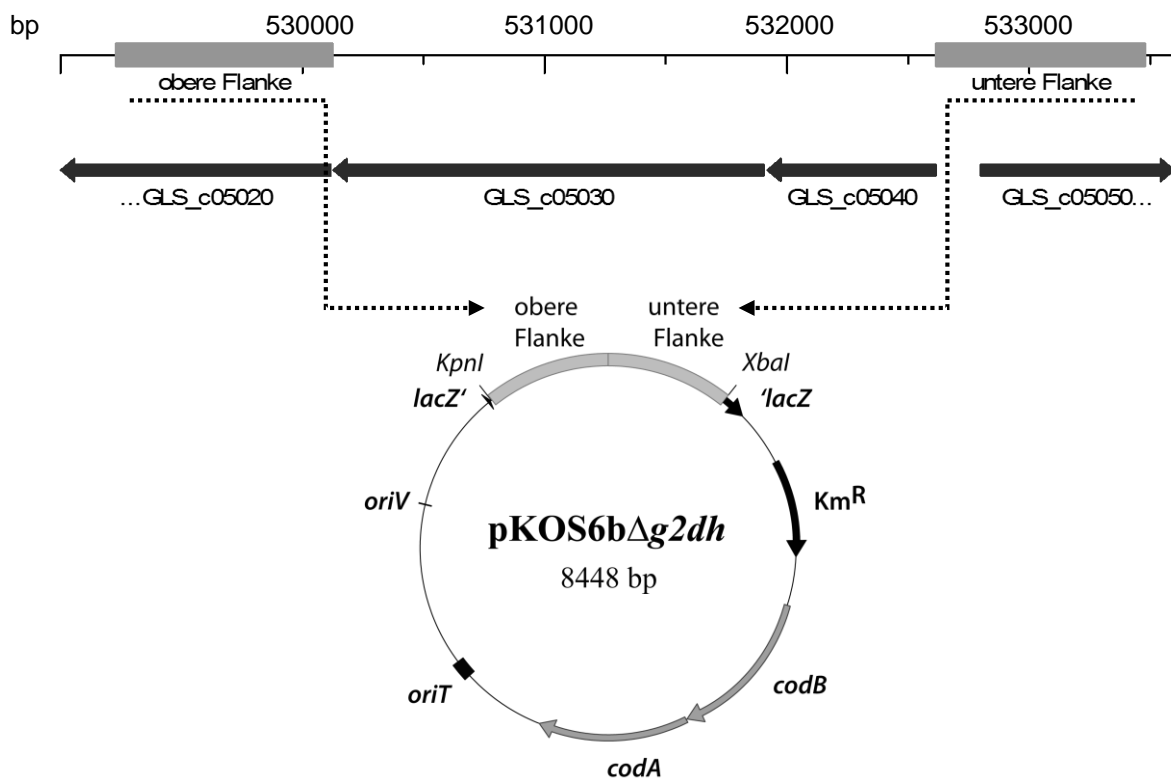


**Abbildung 23:** *Southern Blot* zum Nachweis der markerfreien Deletion von *tpiA* (GLS\_c05720) in *G. oxydans* DSM 3504 und DSM 3504 $\Delta ndh$ . Die genomische DNA des WT sowie der  $\Delta tpiA$  Mutante und  $\Delta ndh \Delta tpiA$  Doppelmutante wurde mit *PstI* hydrolysiert. Die Hybridisierung wurde mit der 695 bp großen Biotin markierten Sonde bei 60°C durchgeführt. Die Banden entsprechen den erwarteten Größen von 1308 bp für den WT und 4940 bp für die Deletionsstämme.

## 2.5 Deletion der *g2dh* in *G. oxydans* DSM 3504

### Konstruktion des *g2dh* Deletionsvektors

Die flankierenden Bereiche der Zielgene *g2dh-a* (GLS\_c05030) und *g2dh-b* (GLS\_c05040) (Genbezeichnungen sind nicht festgelegt, *g2dh-a* und *-b* wurden in der vorliegenden Arbeit als Abkürzungen verwendet, um konsistent mit den Annotationsbezeichnungen zu bleiben) wurden mit den Primern 0478\_Kpn\_F / 0478\_FUS\_R und 0478\_FUS\_F / 0478\_xbaR amplifiziert und wiesen eine Größe von 923 bp (obere Flanke) und 891 bp (untere Flanke) auf. Mittels LFH-PCR wurden die Flanken mit den Primern 0478\_Kpn\_F und 0478\_xbaR fusioniert. Das Insert wurde mit *KpnI* und *XbaI* hydrolysiert. Nach der Ligation in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten pKOS6b (Abbildung 24) erfolgte die Übertragung des Vektorkonstrukts in chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_2R durchgeführt. Der aus *E. coli* isolierte und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüfte Vektor pKOS6bΔ*tpiA* hatte eine Größe von 8448 bp, die Sequenzierung (Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) bestätigte die korrekte Basenabfolge des Inserts.



**Abbildung 24: Übersicht der Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6bΔ*g2dh* zur Deletion der beiden Untereinheiten der Gluconat 2-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 3504** Die strangaufwärts und strangabwärts gelegenen Flankenbereiche wurden über PCR amplifiziert, über LFH-PCR fusioniert und in pKOS6b inseriert.

### **Erzeugung eines *G. oxydans* DSM 3504 *g2dh*-A Deletionsstamms**

Die Transformation von *G. oxydans* DSM 3504 erfolgte mittels Elektroporation. Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genomspezifischen Primer 0478\_check\_F und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50 µg/ml) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60 µg/ml FC) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 0478\_check\_F und 0478\_check\_R bestimmt. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 4385 bp und bei den Mutanten 1896 bp. Ein Klon mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 2489 bp mittels Sequenzierung bestätigt.

### **2.6 Überexpression von *ndh* in *G. oxydans* ATCC 621H**

Für die Überexpression der NADH Dehydrogenase in *G. oxydans* ATCC 621H wurde der von Junker (2009) konstruierte Vektor pAJ78 verwendet. Der Vektor basiert auf pBBR1-MCS2 und enthält *ndh* mit einer putativen Promotorregion von 163 bp vor dem ORF. Das Plasmid wurde mittels Elektroporation in ATCC 621H übertragen. Nach der Selektion auf Km (50 µg/ml) wurde das Vorhandensein des Plasmids in den Zellen über eine Kolonie-PCR mit den plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R nachgewiesen (Fragmentgröße bei korrektem pAJ78: 1880 bp). Zwei Klone wurden ausgewählt und ihre Integrität über eine Sequenzierung mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_R bestätigt.

### **2.7 Wachstumsanalyse der $\Delta ndh$ , $\Delta tpiA$ , $\Delta ndh/\Delta tpiA$ Mutanten im klassischen Verfahren**

In einem ersten Schritt wurden einige der validierten Deletionsstämme von *G. oxydans* DSM 3504 in Wachstumsversuchen mit Erlenmeyerkolben auf Rundschüttlern bei 180 rpm und 30 °C Inkubationstemperatur mittels OD<sub>600</sub> Messung untersucht, um die Auswirkungen der Deletionen auf die Biomassebildung zu dokumentieren. Diese Experimente wurden nicht für *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta g2dh$  bzw. *G. oxydans* ATCC 621H pAJ78 durchgeführt, die am Durchführungszeitpunkt noch nicht fertiggestellt und validiert waren. Alle verwendeten Erlenmeyerkolben waren mit Schikanen ausgestattet, um einen erhöhten Sauerstoffeintrag im Medium zu gewährleisten. Das Wachstum wurde in MV (50 mM Mannitol) und GV (50 mM Glucose) durchgeführt.

Die Wachstumsdokumentation auf MV zeigte deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Stämmen in Bezug auf die maximal gebildete Biomasse. Der WT Stamm DSM 3504 erreichte

im Vergleich zu allen anderen getesteten Stämmen die höchsten OD<sub>600</sub> Werte. Der  $\Delta ndh$  Stamm lag in seiner Wachstumsleistung deutlich hinter dem WT, die maximalen OD<sub>600</sub> Werte lagen beinahe eine Einheit unter der des WT. Der  $\Delta tpiA$  Stamm erreichte eine etwas geringere OD<sub>600</sub> als der WT. Die Doppelmutante  $\Delta ndh \Delta tpiA$  unterschied sich nur unwesentlich von der  $\Delta ndh$  Einfachmutante. Der WT von Stamm ATCC 621H lag mit seiner Biomassebildung weit unter dem maximalen OD<sub>600</sub> Wert von über 4 von DSM 3504 und erreichte einen maximalen Wert von lediglich 1,8 (Abbildung 25). Wie in Tabelle 12 ersichtlich unterschieden sich die maximalen Wachstumsraten nur unwesentlich im Gegensatz zu den stark divergierenden Werten der OD<sub>600</sub>, die Rückschlüsse auf die Biomassebildung erlauben.

**Tabelle 12: Auflistung der Wachstumsraten und OD<sub>600</sub> Werte von *G. oxydans* DSM 3504 WT,  $\Delta ndh$ ,  $\Delta tpiA$ ,  $\Delta ndh \Delta tpiA$  und *G. oxydans* ATCC 621H WT auf Vollmedium mit 50 mM Mannitol (MV). Der Versuch wurde in drei biologisch unabhängigen Experimenten reproduziert.**

Stamm	Max Wachstumsrate $\mu$ [1/h]	Max. optische Dichte (OD <sub>600</sub> )
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	0,61	4,49
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta tpiA$	0,60	4,22
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta ndh$	0,56	3,22
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta ndh \Delta tpiA$	0,57	3,20
<i>G. oxydans</i> ATCC 621H	0,58	1,79

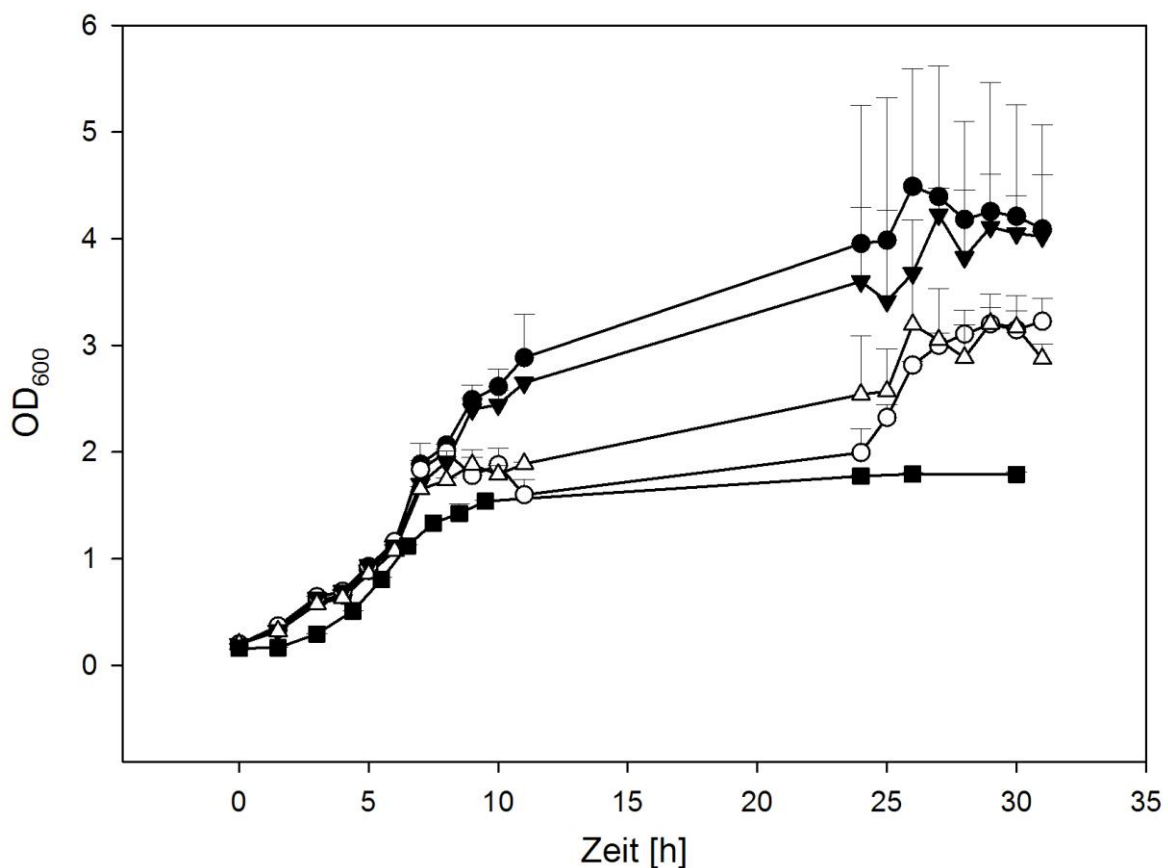
Es folgten Wachstumsversuche auf Glucose Vollmedium (50 mM Glucose) mit denselben Stämmen. Auch auf dieser Kohlenstoffquelle konnten keine Unterschiede bei den Wachstumsraten der unterschiedlichen Stämme festgestellt werden. Im Unterschiede zum Wachstum auf Mannitol konnten allerdings auch keine signifikanten Differenzen in den OD<sub>600</sub> Werten dokumentiert werden. Der Stamm DSM 3504 zeigte auf Glucose keinen entscheidenden Unterschied zum Stamm ATCC 621H, die herausragenden Wachstumsvorteile die bei Mannitol beobachtet wurden konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 13).



**Tabelle 13: Auflistung der Wachstumsraten und Biomasseproduktion (OD<sub>600</sub>) von *G. oxydans* DSM 3504 WT,  $\Delta ndh$ ,  $\Delta tpiA$ ,  $\Delta ndh \Delta tpiA$  und *G. oxydans* ATCC 621H WT in Vollmedium mit 50 mM Glucose (GV). Der Versuch wurde in drei biologisch unabhängigen Experimenten reproduziert.**

Stamm	Max Wachstumsrate $\mu$ [1/h]	Max. Biomasse (OD <sub>600</sub> )
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	0,57	1,18
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta ndh$	0,47	0,96
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta tpiA$	0,55	1,03
<i>G. oxydans</i> DSM 3504 $\Delta ndh \Delta tpiA$	0,51	1,00
<i>G. oxydans</i> ATCC 621H	0,57	1,14

### Wachstum auf MV (50 mM Mannitol)



**Abbildung 25: Wachstum von *G. oxydans* ATCC 621H WT, DSM 3504 WT und der DSM 3504 Deletionsstäme in 50 mM Mannitol (MV). (●): *G. oxydans* DSM 3504 Wt; (○): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh$ ; (▼): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta tpiA$ ; (Δ): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh \Delta tpiA$ ; (■): *G. oxydans* ATCC 621H Wt. Der Versuch wurde in drei biologisch unabhängigen Experimenten reproduziert.**

## Wachstum auf GV (50 mM Glucose)

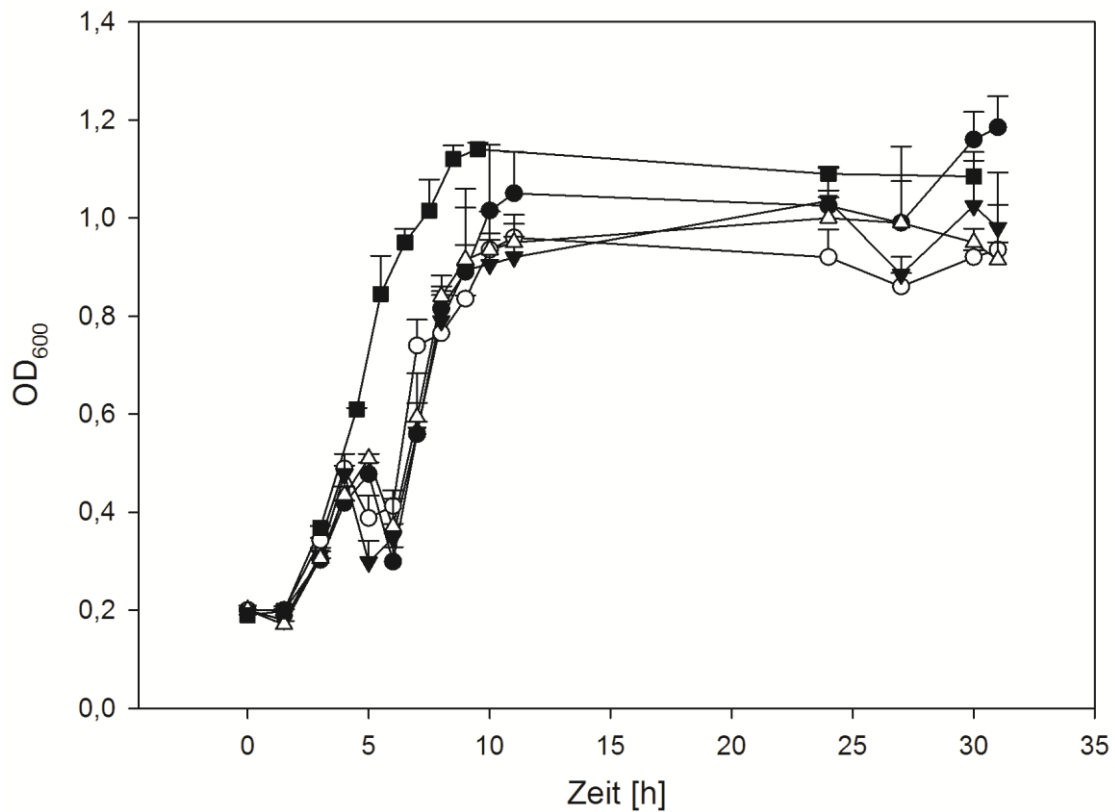


Abbildung 26: Wachstum von *G. oxydans* ATCC 621H WT, DSM 3504 WT und der DSM 3504 Deletionsstämme in 50 mM Glucose (GV). (●): *G. oxydans* DSM 3504 WT; (○): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh$ ; (▼): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta tpiA$ ; (Δ): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh \Delta tpiA$ ; (■): *G. oxydans* ATCC 621H WT. Der Versuch wurde in drei biologisch unabhängigen Experimenten reproduziert.

Aufgrund der z. T. hohen Standardabweichungen bei der Wachstumsdokumentation mittels Erlenmeyerkolben wurden nachfolgend Messungen mit weiteren, präziseren und kontinuierlicheren Methoden (BioLector, RAMOS) durchgeführt, um die Ergebnisse in aussagekräftiger Form bestätigen zu können. Ebenso sollte mit diesen Methoden eine detaillierte Untersuchung der Atmungsaktivitäten und der Substratverbräuche der Stämme erfolgen.

## 2.8 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta ndh$ mit BioLector und RAMOS

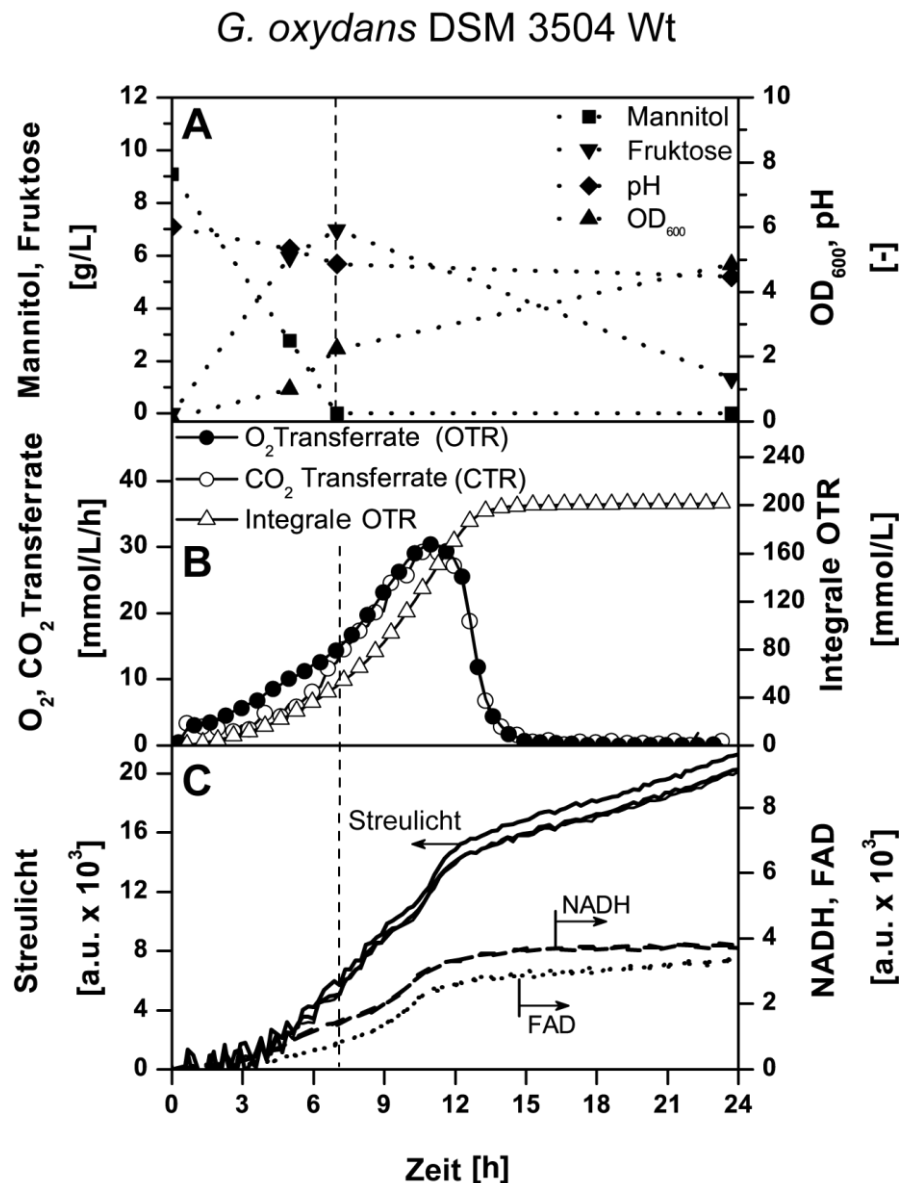
Das Wachstum der  $\Delta ndh$  Mutante sowie NADH- und FAD Gehalt im Medium wurden mittels BioLectors (II.7.4) bestimmt. Die Wachstumsversuche wurden in Vollmedium mit 50 mM Mannitol durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 995 rpm bei 30°C in 48 Well Platten zusammen mit den anderen DSM 3504 Deletionsstämmen, dem DSM 3504 WT, ATCC 621H WT und dem ATCC 621H NDH-2-Überexpressionsstamm. Von jedem Stamm wurden zwei Parallelen angezogen und gemessen. Die Zunahme der Biomasse wurde dabei mittels Streulicht

(620 nm) und NADH sowie FAD über Lichtabsorption mittels Optoden gemessen, die Maßeinheit entsprach der willkürlichen Einheit [a.u.].

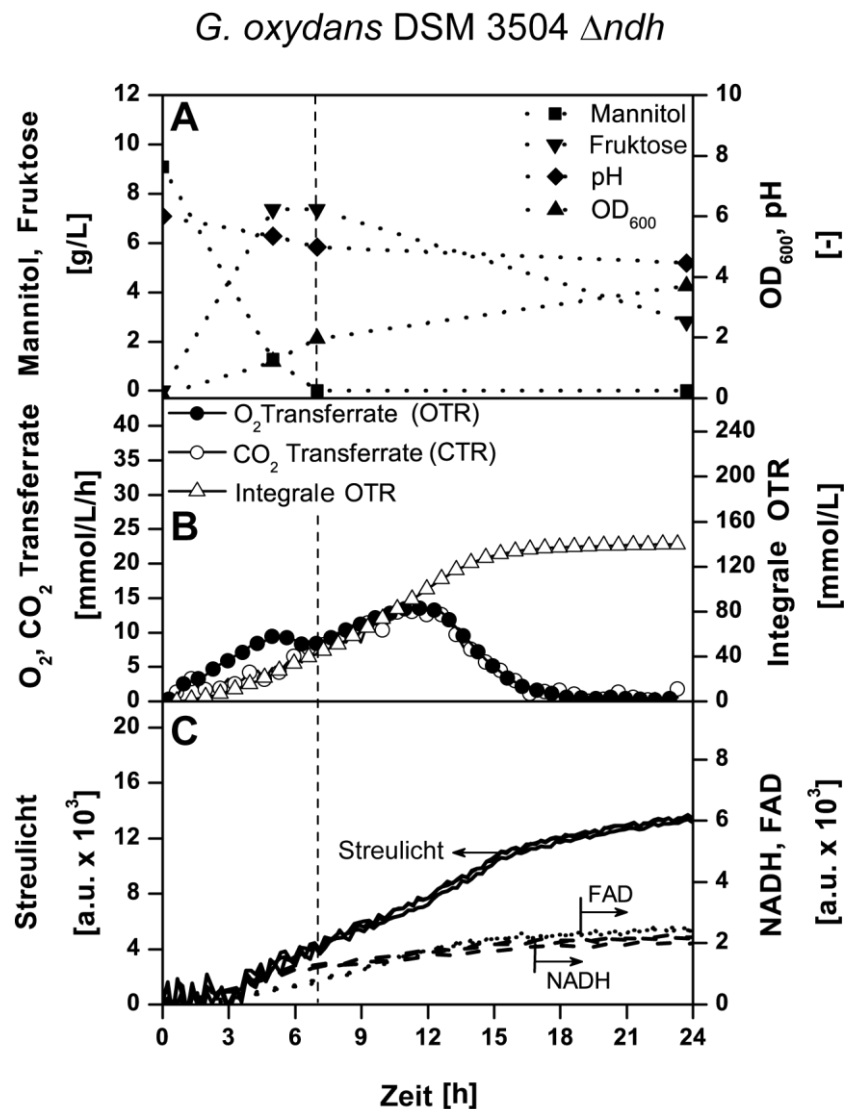
Wie in Abbildung 27 c und Abbildung 28 c ersichtlich wies der DSM 3504 *Δndh* Stamm im Vergleich zum WT einen sehr ähnlichen Wachstumsverlauf in den ersten 6 h der Inkubation auf, in der Folge kam es allerdings zu einer massiven Verlangsamung der Biomassebildung beim Deletionsstamm. Diese Verlangsamung kennzeichnete den gesamten weiteren Messungsverlauf. Nach einer Inkubationszeit von 30 h waren die Streulichtwerte von DSM 3504 *Δndh* über 30 % geringer als im WT. Bei den NADH Werten konnte in der Mutante ein Rückgang von 45 % und bei den FAD Werten von 30 % im Vergleich zum WT dokumentiert werden. NADH Dehydrogenasen transferieren Elektronen von NADH zur Atmungskette.

Um die Atmungsaktivität der Stämme detailliert untersuchen zu können, wurden mithilfe einer RAMOS Anlage (II.7.2) die Sauerstoff- (OTR) und Kohlendioxidtransferraten (CTR) sowie die respiratorischen Quotienten bestimmt. Die Inkubation erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Spezialaufsätzen, bei 30°C und 300 rpm auf einem Rundschüttler. Die RAMOS Experimenten wurden ebenso mit den anderen DSM 3504 Deletionsstämmen, dem DSM 3504 WT, ATCC 621H WT und dem ATCC 621H NDH-2-Überexpressionsstamm durchgeführt, jeder Stamm wurde in fünf Parallelkulturen angezogen, eine Probe war für die online Messungen vorgesehen und vier Kulturen für die Entnahme der Offlineproben. Im direkten Vergleich wies der *ndh*-Deletionsstamm bei allen ermittelten Parametern einen signifikant geringeren Wert auf als der WT (Abbildung 27 b und Abbildung 28b). Im WT stiegen die OTR und CTR Werte im Laufe der Inkubation stark an und erreichten Maxima von bis zu 30 mM / L / h. Bei der Mutante erreichten die OTR und CTR Werte nach sechs h Inkubationszeit einen ersten Höhepunkt und nach kurzem Rückgang einen zweiten Höhepunkt nach 11 h. Dieser Stamm erreicht dabei lediglich Maximalwerte von 11 mM / L / h. Nach dem Erreichen der Maxima sanken die OTR / CTR Werte bei beiden Stämmen stark ab. Die integrale OTR gibt die absolute Menge an verbrauchtem O<sub>2</sub> an einem spezifischen Zeitpunkt an, auch hier wird der Unterschied zwischen Mutanten mit 140 mM / L und WT mit 200 mM / L deutlich. Für die Analyse der offline Daten wurden Proben an vier verschiedenen Zeitpunkten aus den dafür vorgesehenen Kulturen entnommen. Nach der Bestimmung von OD<sub>600</sub> sowie pH Wert dieser Proben wurde eine HPLC (II.7.3) durchgeführt, um Mannitol- und Fruktose-Verbrauchsdaten zu ermitteln (Abbildung 27 A und Abbildung 28 A). Die Messung der pH Werte zeigte keine Unterschiede zwischen WT und *Δndh* Stamm. Die OD<sub>600</sub> wies bei der ersten Messung und nach fünf h keine nennenswerten Divergenzen auf, nach sieben h kam es zu einem leichten Anstieg im WT und nach 24 h gab es einen merklichen Abstand in der OD<sub>600</sub> zwischen WT mit 4,9 und *ndh* Deletionsstamm mit 3,8.

Dies entspricht somit den mittels BioLector über Streulichtmessungen ermittelten Ergebnissen. Die HPLC Analysen zeigten, dass Mannitol nach 7 h Inkubationszeit vollkommen verbraucht war, die Fruktosekonzentration stieg aufgrund der Umwandlung von Mannitol in Fruktose an. Nach diesem Schritt begannen die Zellen die produzierte Fruktose zu verstoffwechseln. Die einzige Diskrepanz zwischen WT und  $\Delta ndh$  lag hier in der Endkonzentration der Fruktose im Medium. Im WT waren 1,5 g / L verfügbare Fruktose im Medium messbar, bei der Mutante hingegen 2,9 g / L.



**Abbildung 27:** Darstellung der Wachstumsanalyse von *G. oxydans* DSM 3504 WT auf MV (50 mM). A: Substratverbrauchsdaten, pH Werte und OD<sub>600</sub> aus Offlineproben; B: RAMOS Daten mit OTR (Sauerstofftransferrate), CTR (Kohlendioxidtransferrate) und integraler OTR (zur besseren graphischen Darstellung wurde nicht jeder Messpunkt mit einem Symbol hinterlegt); C: Mittels Streulicht bestimmte Wachstumskurve sowie NADH / FAD Verlauf. Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt an dem Mannitol verbraucht ist.



**Abbildung 28:** Darstellung der Wachstumsanalyse von *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh$  auf MV (50 mM). A: Substratverbrauchsdaten, pH Werte und OD<sub>600</sub> aus Offlineproben; B: RAMOS Daten mit OTR, CTR und integraler OTR (zur besseren graphischen Darstellung wurde nicht jeder Messpunkt mit einem Symbol hinterlegt); C: Mittels Streulicht bestimmte Wachstumskurve sowie NADH / FAD Verlauf aus BioLector-Daten. Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt an dem Mannitol verbraucht ist.

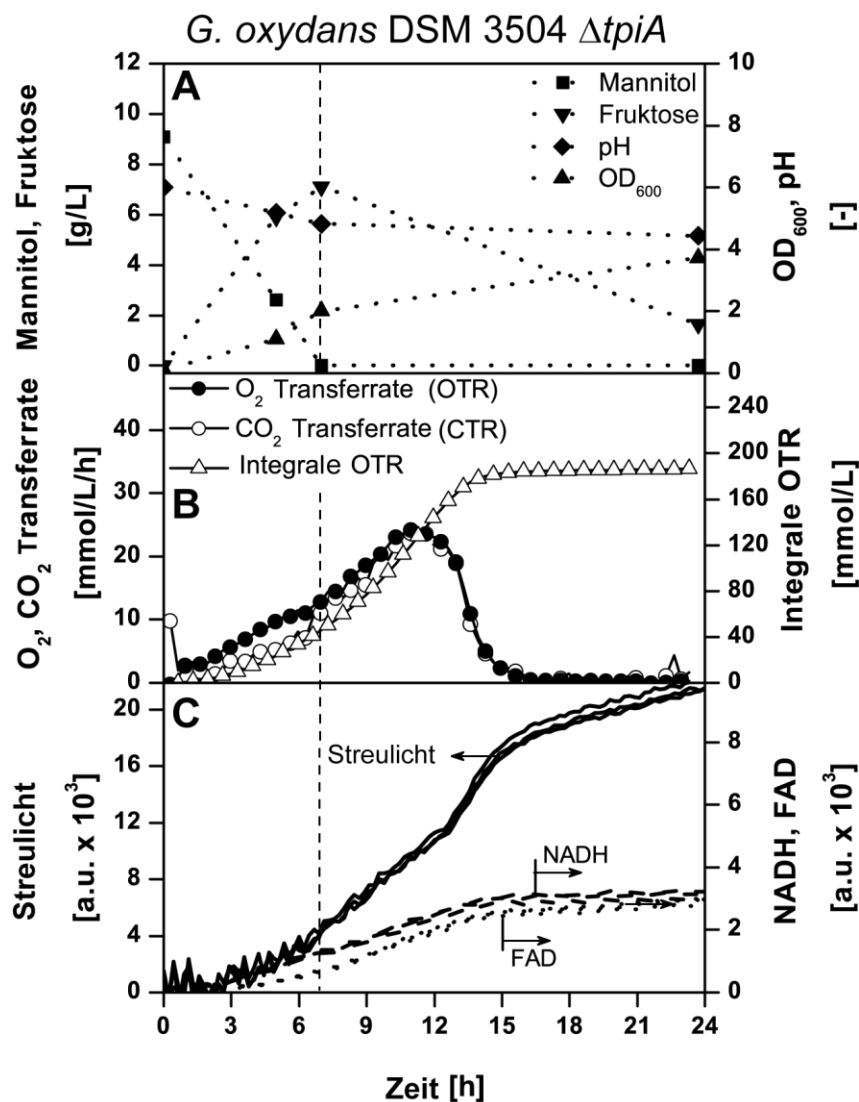
In Übereinstimmung mit den Messdaten aus der OD<sub>600</sub> Messung im Erlenmeyerkolben konnten beim Wachstum auf 50 mM Glucose bei den mittels BioLector durchgeführten Streulichtmessungen keine Unterschiede zum WT festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

## 2.9 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta tpiA$ mit BioLector und RAMOS

Das zweite Gen mit potentiell Einfluss auf das Wachstum von DSM 3504, die zusätzliche Triosephosphat Isomerase, zeigte bereits bei den OD<sub>600</sub> Messungen bei Inkubation auf MV im Erlenmeyerkolben eine leicht geringere Biomassebildung. Die Messungen mittels BioLector ergaben ein schwächeres Wachstum (Streulichtmessung) und geringere NADH und FAD Werte

in der  $\Delta ndh$  Mutante bei Anzucht auf MV. Nach 13 h Inkubation wurde in der Mutante ein geringfügig höherer Biomassewert als im WT gemessen, diese Tendenz wurde allerdings nicht in den NADH / FAD Messungen dokumentiert, die Werte blieben unter denen des WT (Abbildung 27 C und Abbildung 29 C).

Bei der Analyse der OTR und CTR mittels RAMOS wurden ebenso geringere Transferraten in der Mutante (max. 24 mM / L / h) im Vergleich zum WT (max. 30 mM / L / h) dokumentiert, dies stimmt mit dem geringeren Wachstum der Mutante überein. Auch die integrale OTR ging von 200 mM / L im WT auf 180 mM / L in der Mutante zurück (Abbildung 27 B und Abbildung 29 B).



**Abbildung 29:** Graphische Darstellung der Daten aus der Wachstumsanalyse von *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta tpiA$  auf MV (50 mM). A: Substratverbrauchsdaten, pH Werte und OD<sub>600</sub> aus Offlineproben; B: RAMOS Daten mit OTR, CTR und integraler OTR (zur besseren graphischen Darstellung wurde nicht jeder Messpunkt mit einem Symbol hinterlegt); C: Mittels Streulicht bestimmte Wachstumskurve sowie NADH / FAD Verlauf aus BioLector-Daten. Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt an dem Mannitol verbraucht ist.

Der Verlauf des pH Wertes wies bei beiden Stämmen während der gesamten Inkubation keinen feststellbaren Unterschied auf, die Bestimmung der OD<sub>600</sub> zeigte übereinstimmend mit den anderen Daten ein geringeres Wachstum von  $\Delta ndh$ , der leichte Anstieg der Streulichtmessung nach 13 h wurde auch von der OD Messung nicht bestätigt. Nach 24 h Inkubation konnte in der Mutante eine OD<sub>600</sub> von unter 4 und im WT 4,9 gemessen werden (Abbildung 27 A, Abbildung 29 A).

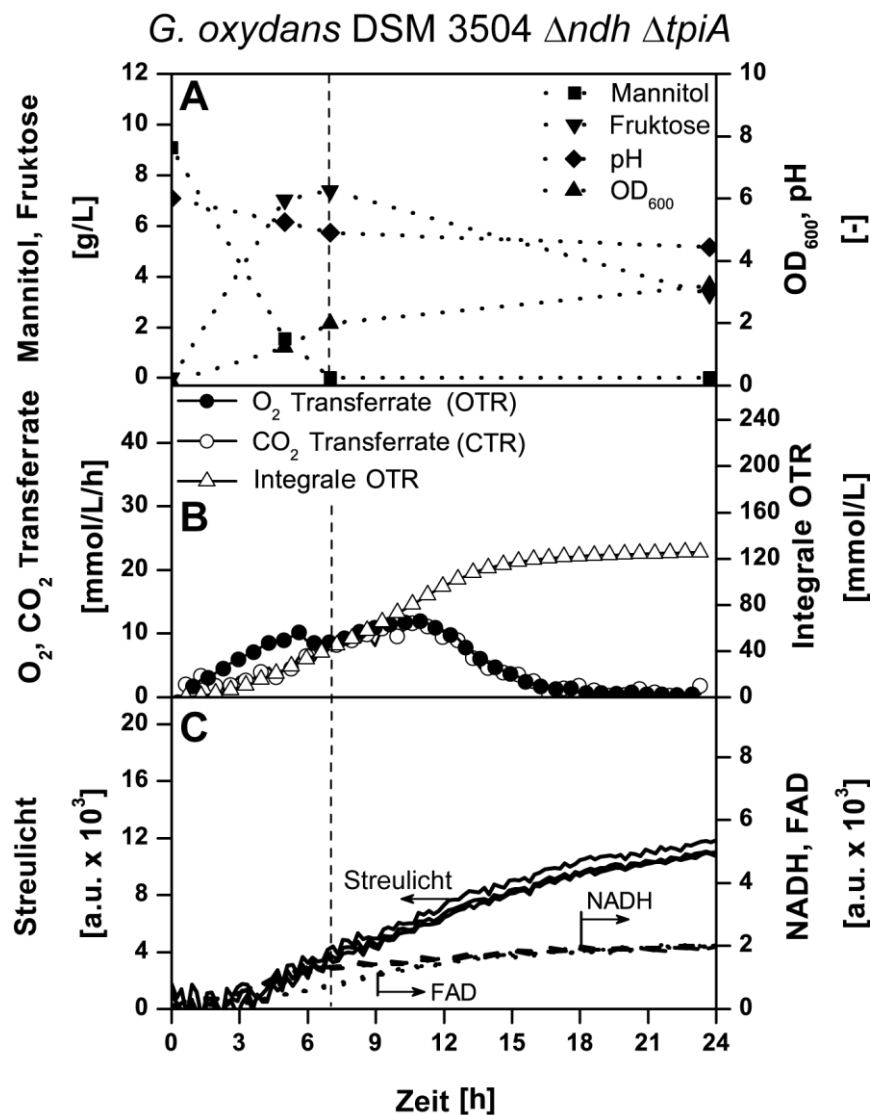
In Übereinstimmung mit den Messdaten aus der OD<sub>600</sub> Messung im Erlenmeyerkolben konnten beim Wachstum auf 50 mM Glucose bei den mittels BioLector durchgeführten Streulichtmessungen keine Unterschiede zum WT festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### **2.10 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta tpiA \Delta ndh$ mit BioLector und RAMOS**

Wie schon in den vorhergehenden Experimenten gezeigt werden konnte haben die Gene *ndh* und *tpiA* einen nachweislichen Einfluss auf die Biomassebildung von *G. oxydans* DSM 3504. Die Untersuchung der Konsequenzen auf das Wachstum bei einer Deletion beider Gene (*ndh* und *tpiA*) wies bei der OD<sub>600</sub> Messung der Inkubation auf MV im Erlenmeyerkolben bereits auf einen stärkeren Rückgang als bei den Einfachmutanten hin. Die BioLector-Daten von DSM 3504  $\Delta tpiA \Delta ndh$  zeigten ebenso einen Rückgang der Streulichtkurve beim Wachstum auf MV im Vergleich zur DSM 3504  $\Delta ndh$  Einfachmutante an. Dies trifft auch auf die NADH und FAD Werte zu, die signifikant niedriger als im WT und der  $\Delta tpiA$  Mutante und leicht niedriger als in der  $\Delta ndh$  Mutante sind (Abbildung 28 C, Abbildung 29 C, Abbildung 30 C).

Diese Tendenz wurde auch bei der Evaluierung der RAMOS Daten widerspiegelt: Die OTR und CTR nahmen im Vergleich zur  $\Delta ndh$  Mutante ab, die integrale OTR ging von 180 mM / L im  $\Delta tpiA$  Stamm und 140 mM / L im  $\Delta ndh$  Stamm auf 120 mM / L im  $\Delta ndh \Delta tpiA$  Stamm zurück (Abbildung 28 B, Abbildung 29 B, Abbildung 30 B). Der pH Verlauf sowie die Mannitolverbrauchsdaten zeigten keinen merklichen Unterschied beim Vergleich mit den Einfachmutanten, die finale Fruktosekonzentration im Medium betrug allerdings 3,4 g / L und war somit die höchste im Vergleich zu den anderen DSM 3504 Stämmen. In Übereinstimmung mit den Streulichtmessungen waren die OD<sub>600</sub> Werte aus den Offlineproben in der Doppelmutante etwas niedriger als im  $\Delta ndh$  Stamm. Infolgedessen war die gebildete Biomasse im  $\Delta ndh \Delta tpiA$  Stamm auch die niedrigste im Vergleich zu allen anderen *G. oxydans* DSM 3504 Stämmen (Abbildung 28 C, Abbildung 29 C, Abbildung 30 C). In Abbildung 31 ist eine Gegenüberstellung der Messergebnisse (Streulicht und Atmungsaktivität) aller DSM 3504 Stämme auf Mannitol Vollmedium (50 mM) zur besseren Übersicht dargestellt. In Übereinstimmung mit den Messdaten aus der OD<sub>600</sub> Messung im Erlenmeyerkolben konnten beim Wachstum auf 50 mM

Glucose bei den mittels BioLector durchgeführten Streulichtmessungen auch keine Unterschiede zum WT festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 30:** Graphische Darstellung der Daten aus der Wachstumsanalyse von *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh \Delta tpiA$  auf MV (50 mM). A: Substratverbrauchsdaten, pH Werte und OD<sub>600</sub> aus Offlineproben; B: RAMOS Daten mit OTR, CTR und integraler OTR (zur besseren graphischen Darstellung wurde nicht jeder Messpunkt mit einem Symbol hinterlegt); C: Mittels Streulicht bestimmte Wachstumskurve sowie NADH / FAD Verlauf aus BioLector-Daten. Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt an dem Mannitol verbraucht ist.

### 2.11 Wachstumsdokumentation von DSM 3504 $\Delta g2dh$ mit BioLector und RAMOS

Im Gegensatz zu den DSM 3504  $\Delta ndh$ ,  $\Delta tpiA$  und  $\Delta ndh \Delta tpiA$  Stämmen, zeigten die Daten aus den Experimenten mit BioLector und RAMOS keine signifikanten Unterschiede zwischen der *g2dh* Mutante und dem WT beim Wachstum auf Mannitol Vollmedium (MV). Die online über Streulicht und offline über OD<sub>600</sub> gemessene Biomassebildung weicht an keinem Datenpunkt wesentlich von der des WT ab. Dies gilt im gleichen Maße für die mittels BioLector bestimmten



NADH / FAD Werte und für die mittels RAMOS bestimmten OTR / CTR (Daten nicht gezeigt). Bei der Streulichtmessung auf Medium mit 50 mM Glucose konnten ebenso keine Unterschiede zum wildtypischen Referenzstamm dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Gluconat 2-Dehydrogenase auf das Wachstum auf Mannitol minimal ist.

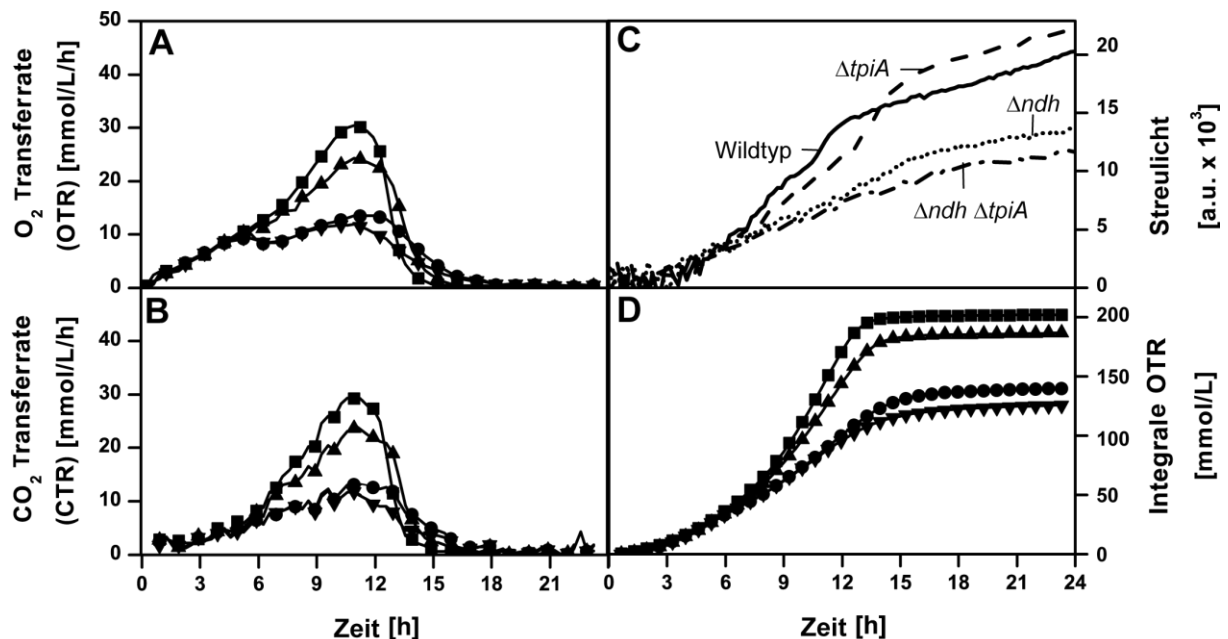


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Wachstumsdaten von DSM3504 WT sowie *ndh* und *tpi* Deletionsmutanten. (■): *G. oxydans* DSM 3504 Wt; (●): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh$ ; (▲): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta tpiA$ ; (▼): *G. oxydans* DSM 3504  $\Delta ndh \Delta tpiA$ . A: OTR Werte aus RAMOS; B: CTR Werte aus RAMOS; C: Streulichtmessung aus BioLector (N.B. Der Anstieg bei der  $\Delta tpiA$  ab 13h konnte bei keiner anderen Messung festgestellt werden); D: Integrale OTR aus RAMOS Messungen.

## 2.12 Wachstumsdokumentation des ATCC 621H pAJ78 mit BioLector und RAMOS

Nachdem durch die Deletion eines der beiden *ndh* Gene im Stamm DSM 3504 ein starker Rückgang des Wachstums beobachtet wurde, sollten nun die Auswirkungen im Stamm ATCC 621H, beim Einbringen der zusätzlichen NDH-2 auf einem Plasmid (pAJ78), untersucht werden. Bereits während der Anzucht der Vorkulturen in MV war die Steigerung des Wachstums durch die zweite NDH aus DSM 3504, exprimiert durch ihren eigenen Promotor auf dem Plasmid pAJ78, erheblich. Die im BioLector bei der Anzucht in MV durchgeführten Messungen unterstützten diese Beobachtungen und zeigten einen starken Anstieg im Stamm mit pAJ78 bei allen aufgezeichneten Parametern. Die Streulichtwerte schossen von  $6 \times 10^3$  a.u. im WT auf  $40 \times 10^3$  a.u. im ATCC 621H pAJ78 Stamm. Die FAD Konzentration stieg von  $1 \times 10^3$  auf

$23 \times 10^3$  a.u. und NADH von  $1 \times 10^3$  auf  $40 \times 10^3$  a.u. (Abbildung 32 C und F). Auch die Daten aus den RAMOS Messungen zeigten einen ausgeprägten Effekt der zusätzlichen Kopien der NADH Dehydrogenase in ATCC 621H. Sowohl OTR wie auch CTR stiegen deutlich an, der Gesamtverbrauch an  $O_2$ , gemessen über die integrale OTR, stieg von 78 mM / L im WT auf 130 mM / L im pAJ78 enthaltenden Stamm (Abbildung 32 B und E). Es konnten ebenso Auswirkungen auf den pH Verlauf im NDH-2 Expressionsstamm beobachtet werden, der bei allen anderen Kulturen messbare Abfall wurde in diesem Stamm nach 7 h Inkubation invertiert. In der Folge kam es zu einem Anstieg auf einen pH von 6,5 im Gegensatz zu Werten unter 5 im WT (Abbildung 32 A und D). Die HPLC Analyse der Offlineproben zeigte für den pAJ78 enthaltenden Stamm eine durchgehende, langsame Abnahme der Mannitolkonzentration im Medium neben einer konstant geringen, beinahe nicht mehr nachweisbaren Konzentration an Fruktose. In Übereinstimmung mit den BioLector Daten zeigten auch die Messungen der Optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) einen enormen Anstieg von 1,8 im WT auf Werte von 4,0 im ATCC 621H pAJ78 (Abbildung 32 A und D).

Die im BioLector erfolgte Streulichtmessung der auf 50 mM Glucose angezogenen Kulturen von ATCC 621H pAJ78 zeigte im Gegensatz zu allen anderen getesteten Stämmen einen deutlichen Unterschied zum WT. Für die Messungen wurde jeder Stamm in drei Parallelen angezogen und gemessen. Für die Streulichtmessungen der auf Glucose gewachsenen Kulturen wurde ein neueres BioLector Modell verwendet, welches ein alternatives Skalensystem für die Messwerte verwendet, daher sind die Streulichtdaten in Bezug auf ihre absoluten Größen nicht direkt mit den Daten aus den Messungen in MV vergleichbar. Die Streulichtwerte erreichten im Stamm mit dem NDH-2 Expressionsvektor den mehr als vierfachen Wert (440 a.u.) als im ATCC 621H WT (100 a.u.). Die höhere Anzahl von *ndh* Kopien in der Zelle führt demnach auch in glucosehaltigem Medium zu einem starken Anstieg der Biomasseproduktion des Stammes.

Alle erhaltenen Messdaten konnten somit den starken, nachhaltigen Einfluss der zusätzlichen NADH Dehydrogenase auf das Wachstum von ATCC 621H bestätigen.

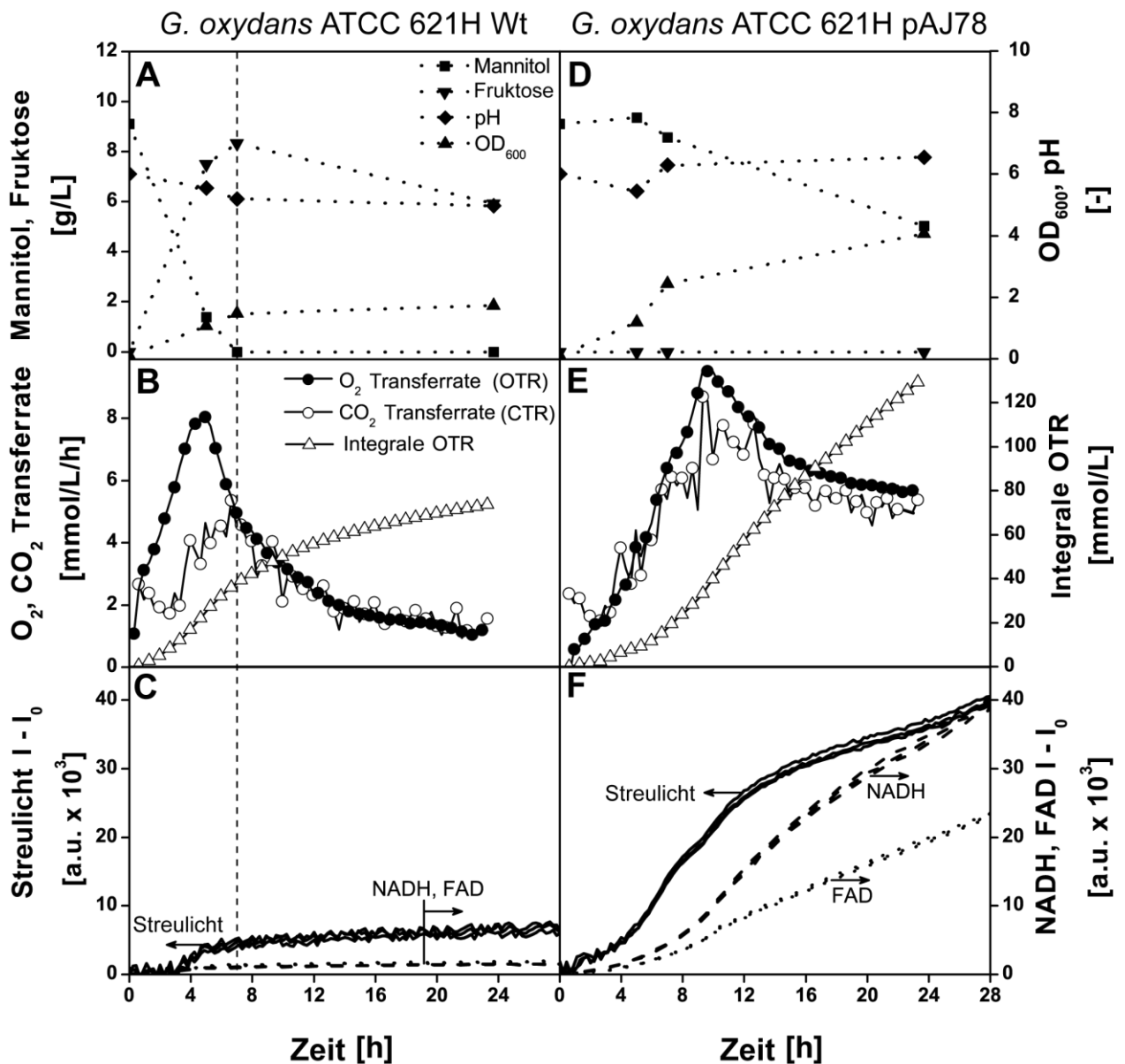
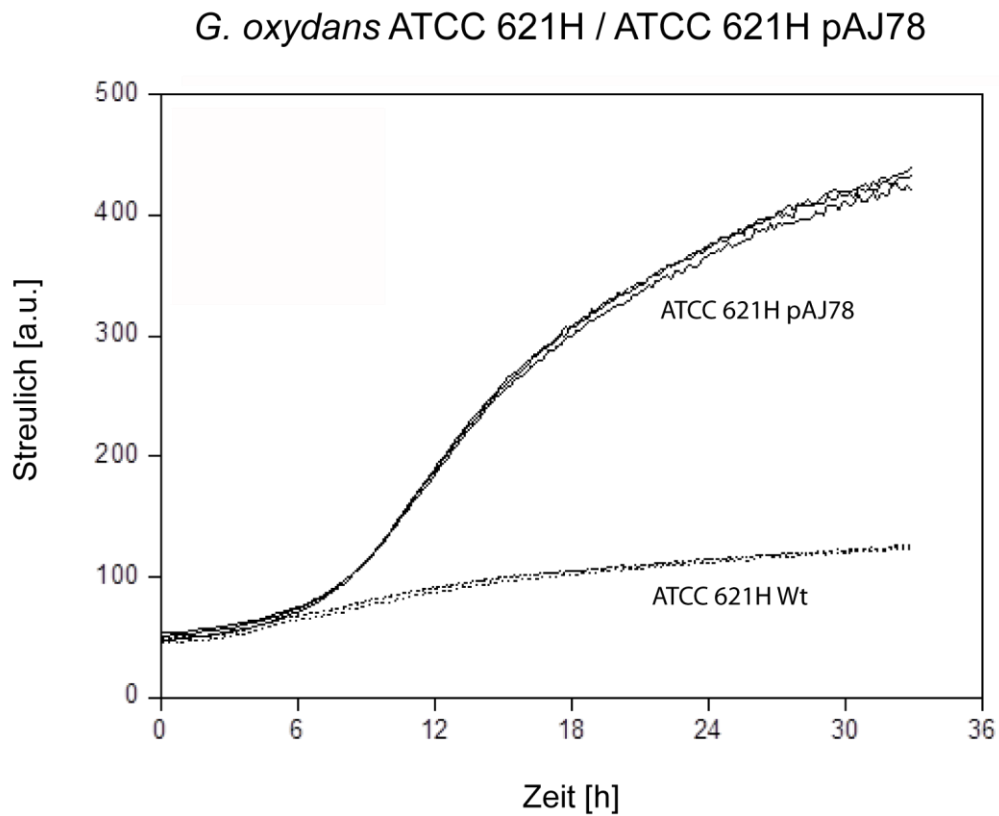


Abbildung 32: Gegenüberstellung der Daten aus der Wachstumsanalyse von *G. oxydans* ATCC 621H WT und ATCC 621H pAJ78 auf MV (50 mM). A: Substratverbrauchsdaten, pH Werte und  $OD_{600}$  aus Offlineproben; B: RAMOS Daten mit OTR, CTR und integraler OTR (zur übersichtlicheren Darstellung wurde nicht jeder Messpunkt mit einem Symbol hinterlegt); C: Mittels Streulicht bestimmte Wachstumskurve sowie NADH / FAD Verlauf aus BioLector-Daten. Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt an dem Mannitol vollends verbraucht ist.



**Abbildung 33:** Graphische Darstellung des mittels Streulicht gemessenen Wachstumsverlaufs von *G. oxydans* ATCC 621H WT und ATCC 621H pAJ78 auf Vollmedium mit 50 mM Glucose. Die Messungen wurden in einem weiterentwickelten BioLector Gerät durchgeführt, die Skalierung der Streulichtwerte weicht daher von den bisherigen Messungen, mit dem BioLector Prototyp ab.

### 3. Untersuchung von Restriktionssystemen in Essigsäurebakterien

Bei der Entwicklung molekularbiologischer Methoden für verschiedene Bakterien erschweren Restriktionssysteme das Einbringen von Klonierungsvektoren zum Teil erheblich. Nachdem Klonierungs- und Deletionssysteme für bestimmte Organismen verfügbar sind, ist es daher ratsam nach aktiven Restriktionssystemen zu suchen und diese zu inaktivieren, um die gentechnische Veränderung der Organismen zu erleichtern. Im folgenden Kapitel wurden in den *G. oxydans* Stämmen ATCC 621H sowie DSM 3504 nach Restriktionssystemen gesucht und ihr Einfluss auf die Transformationsfähigkeit der Stämme untersucht.

#### 3.1 Suche nach potentiellen Restriktionssystemen mittels ReBase Datenbank

**Restriction Enzyme data Base** (ReBase) (Roberts *et al.* 2010) ist eine Datenbank mit einer Sammlung an Informationen über Restriktionssysteme aus einer Vielzahl von Organismen. Es sind sowohl experimentell geprüfte wie auch *in silico* auf Basis der Gensequenzen vorhergesagte putative DNA Methyltransferasen, Restriktionsenzyme, Spezifitäts-Untereinheiten und weitere beteiligte Proteinen in der Datenbank enthalten.

Bei der Betrachtung des Genoms von *G. oxydans* ATCC 621H, welches in der ReBase Datenbank bereits auf Restriktionsenzyme hin untersucht wurde und unter „ReBase Genomes“ abrufbar ist, konnten chromosomal zwei an verschiedenen Stellen lokalisierte Methyltransferasen gefunden werden, GOX 0344 (Adenin DNA Methyltransferase) und GOX 1888 (DNA Methyltransferase). An einer dritten Stelle des bakteriellen Chromosoms konnte ein Typ II Restriktionssystem gefunden werden, welches aus einem putativen Typ II DNA Restriktions-Modifikationsenzym (GOX 1505) und einer putativen Restriktionsendonuklease (GOX 1507) besteht (Abbildung 34). Außerdem konnte auf dem chromosomalen Plasmid pGOX1 ein putatives Typ I Restriktionssystem gefunden werden, bestehend aus einem putativen Typ I Restriktionsenzym (GOX 2567), einem Typ I Restriktions-Modifikationsenzym (Spezifitätsfaktor) (GOX 2568) und einem Typ I M-Protein (Methylase) (GOX 2569) (Abbildung 35).

Das Genom von DSM3504 ist aufgrund der erst vor kurzem erfolgten Sequenzierung und Annotation der Sequenzdaten noch nicht in der ReBase Datenbank enthalten. Die Suche nach Restriktionssystemen erfolgte daher in diesem Stamm ohne die Unterstützung von ReBase.

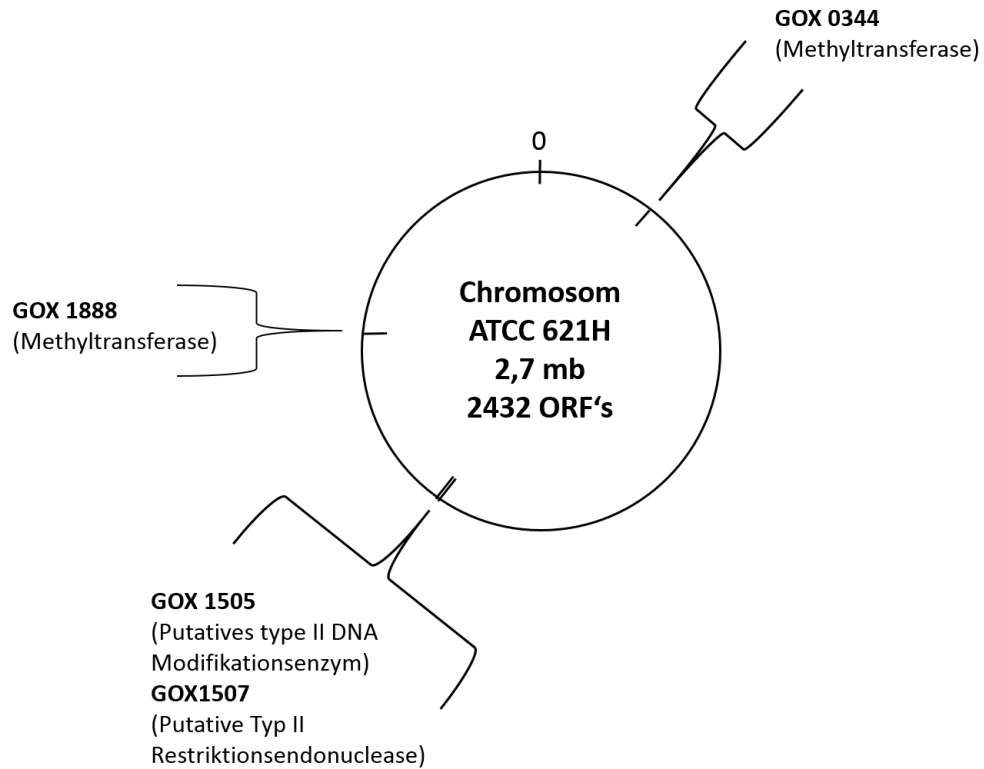


Abbildung 34: Mittels ReBase lokalisierte Gene, welche für potentielle Restriktionssysteme im Chromosom von *G. oxydans* ATCC 621H codieren.

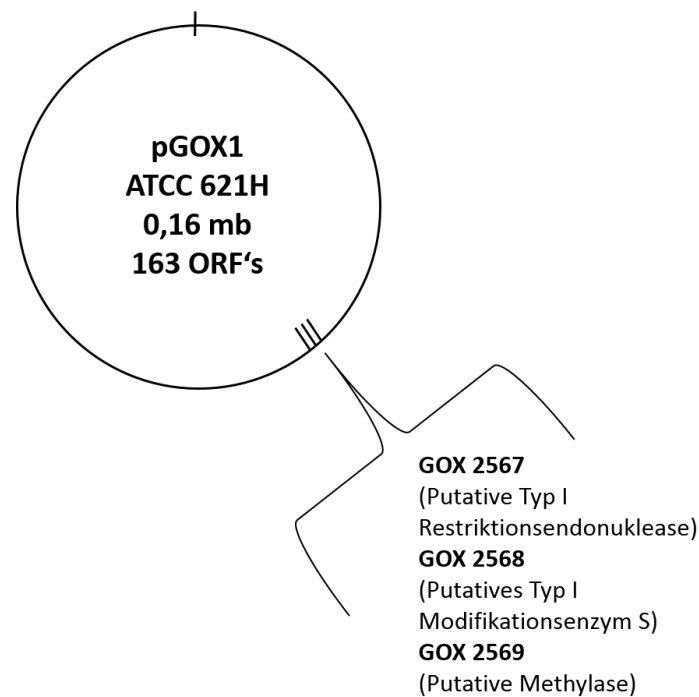
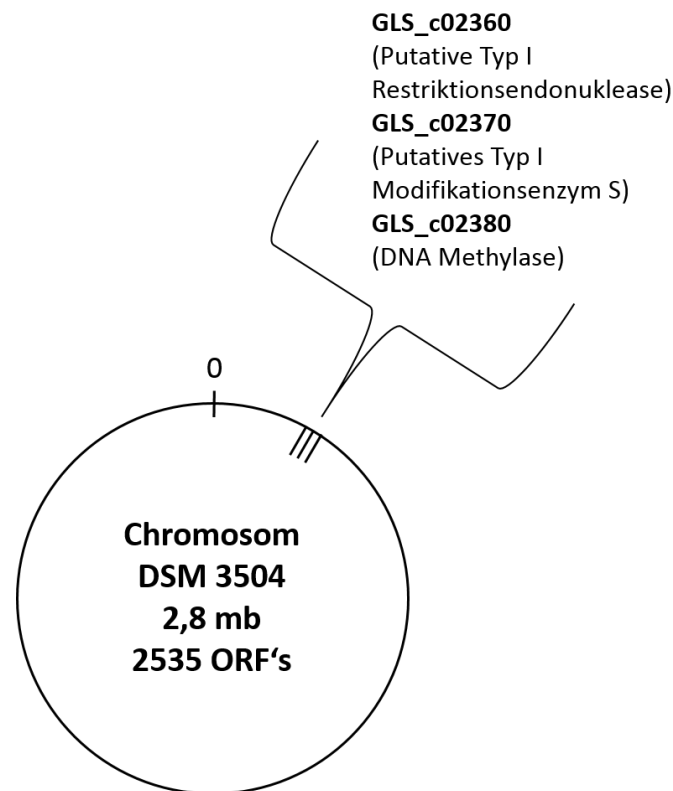


Abbildung 35: Mittels ReBase auf dem chromosomalen Plasmid pGOX1 von *G. oxydans* ATCC 621H lokalisierte Gene, welche für ein potentielles Typ I Restriktionssystem codieren.

Ein putatives Typ I Restriktionssystem konnte in DSM 3504 unter den annotierten ORFs gefunden werden, zur Überprüfung wurde die Aminosäuresequenz gegen die ReBase Datenbank geblastet. Die Sequenz entsprach mit einer Identität von 97 % (978 / 1005 AS) einem sehr ähnlichen Typ I Restriktionssystem aus *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513. Die Ähnlichkeit zum Typ I Restriktionssystem aus ATCC 621H war mit 26 % (127 / 487 AS) überraschend gering. Ein potentielles Typ II Restriktionssystem konnte in DSM 3504, trotz Einbezug von ReBase und BlastN nicht gefunden werden.



**Abbildung 36:** Im Chromosom von *G. oxydans* DSM 3504 lokalisierte Gene, welche für ein potentielles Typ I Restriktionssystem codieren. Durch BLASTP gegen die ReBase Datenbank konnte eine hohe Ähnlichkeit zum Typ I Restriktionssystem aus *A. pasteurianus* LMG 1513 nachgewiesen werden.

### 3.2 Deletion des Typ II Restriktionssystems in *G. oxydans* ATCC 621H $\Delta upp$

Die Deletion sollte gezielt das Restriktionsenzym (GOX 1507) des Typ II Restriktionssystems ausschalten. Die Deletion erfolgte mit dem von Junker (2009) entwickelten *upp*-basierten Deletionssystem, da die Entwicklung und Erprobung des neuen *cod*-basierten Systems zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war. Aus diesem Grund erfolgte die Deletion im ATCC 621H  $\Delta upp$  Stamm.

### **Konstruktion des Vektors zur Deletion des putativen Restriktionssystems GOX 1507**

Die flankierenden Bereiche des Zielgens GOX 1507 (putative Restriktionsendonuklease) wurden mit den Primern 1507\_f\_ECORI / 1507\_FUS\_R und 1507\_FUS\_F / 1507\_HIND\_R amplifiziert und wiesen eine Größe von 1066 bp (obere Flanke) und 1080 bp (untere Flanke) auf. Mithilfe einer LFH-PCR wurden die Flanken mit den Primern 1507\_f\_ECORI und 1507\_HIND\_R fusioniert. Im Anschluss erfolgte der Verdau des Inserts mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII*. Nach der Ligation in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten pAJ63a erfolgte damit die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_R durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüfte Vektor pAJ63a $\Delta$ 1507 hatte eine Größe von 7829bp, eine Sequenzierung (Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) bestätigte die korrekte Basenabfolge des Inserts. Eine Übersicht der Konstruktion ist in Abbildung 37 dargestellt.

### **Erzeugung eines *G. oxydans* ATCC 621H $\Delta$ upp $\Delta$ 1507 Deletionsstamms**

Die Konjugation von *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta$ upp erfolgte mittels *triparentalem Mating* und die anschließende Selektion auf MV Nährböden mit 50  $\mu$ g / ml Km. Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genomspezifischen Primer 1507\_F\_genomCHECK und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu$ g/ml) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FU-Selektionsplatten (60  $\mu$ g/ml FU) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 1507\_F\_genomCHECK und 1507\_R\_CHECKgenom bestimmt. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 4167 bp und bei den Mutanten 3414 bp. Zwei Klone mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 753 bp mittels Sequenzierung mit den Primern 1507NEW\_SEQ und 1507NEW\_SEQ\_R bestätigt.

### **3.3 Deletion des Typ I Restriktionssystems in ATCC 621H $\Delta$ upp**

Die Deletion der drei Gene des Restriktionssystems erfolgte auch in diesem Fall noch mit dem von Junker (2009) entwickelten *upp*-basierten Deletionssystem im Stamm ATCC 621H  $\Delta$ upp, da die Entwicklung und Erprobung des neuen *cod*-basierten Systems zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war.



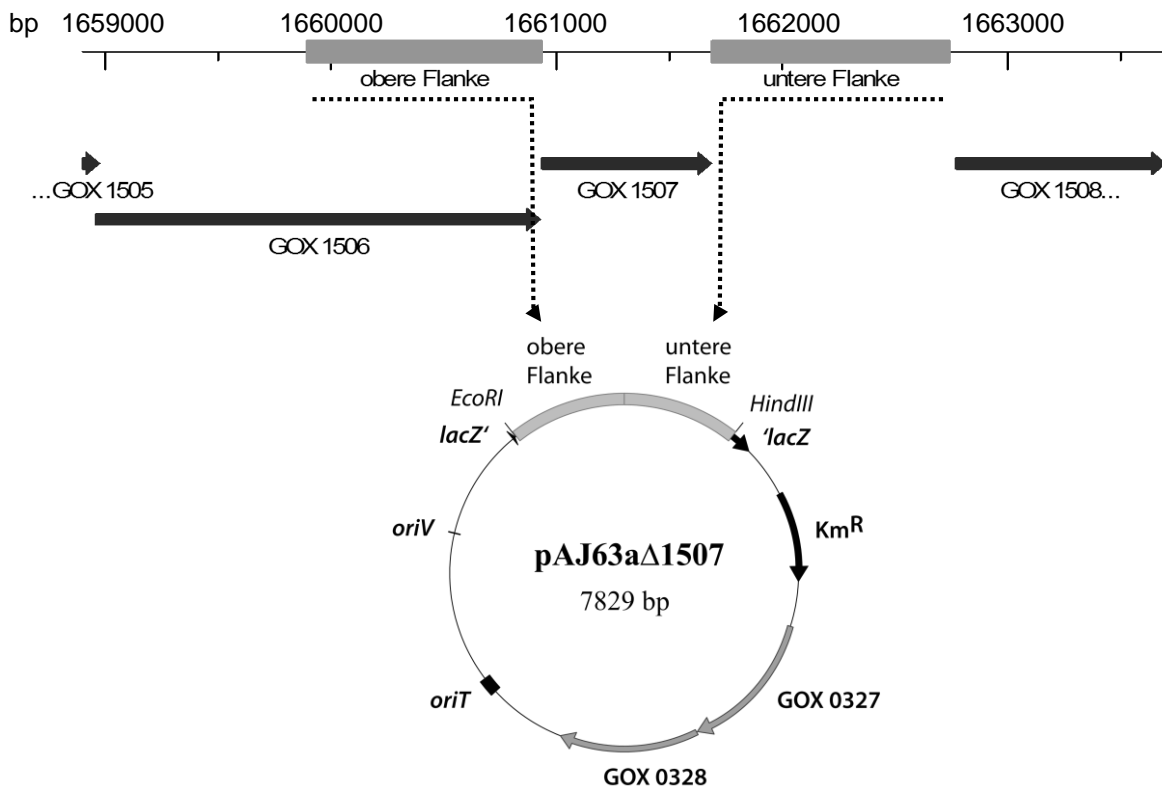


Abbildung 37: Übersicht der Konstruktion des Deletionsvektors pAJ63aΔ1507 zur Deletion des putativen Typ II Restriktionssystems in *G. oxydans* ATCC 621H. Die über LFH-PCR erzeugten Flankenbereiche wurden in pAJ63a inseriert.

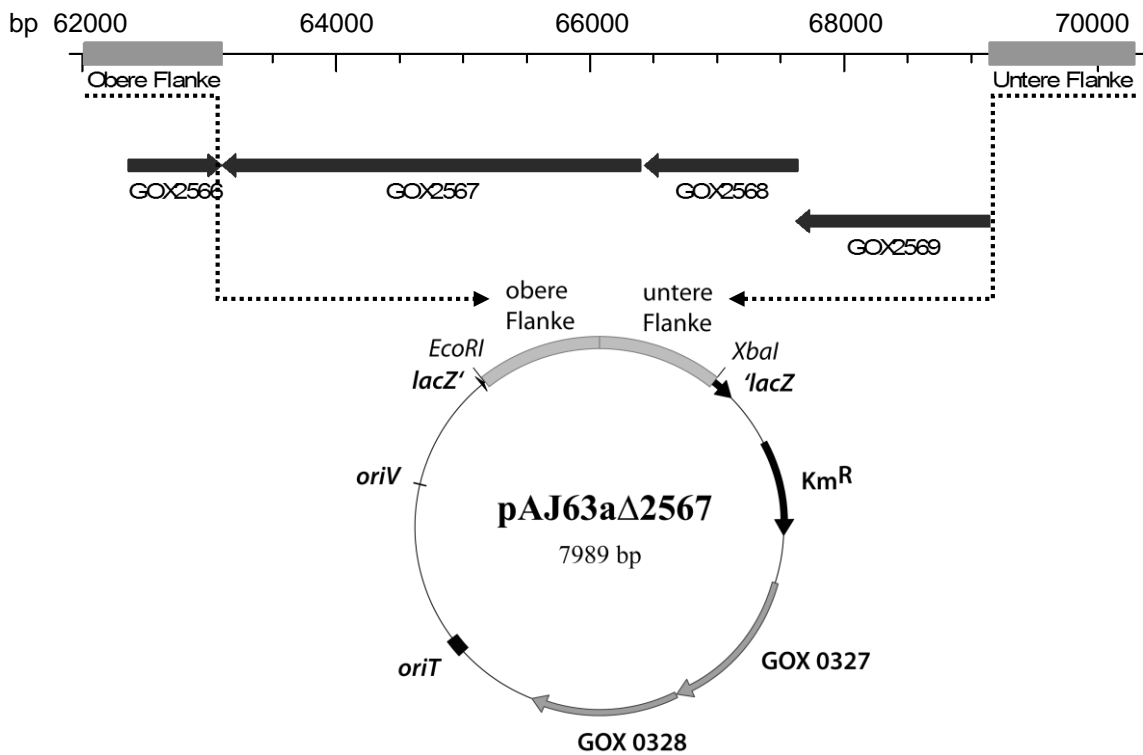


Abbildung 38: Schema der Konstruktion des Deletionsvektors pAJ63aΔ2567 zur Deletion des putativen Typ I Restriktionssystems in *G. oxydans* ATCC 621H.

### **Konstruktion des Vektors zur Deletion des putativen Typ I Restriktionssystems GOX 2567-2569**

Zur Deletion der Gene GOX 2567 (putative TypI Restriktionsendonuklease), GOX 2568 (putatives Modifikationsenzym S) und GOX 2569 (Methylase) wurde ein Flankenbereich strangabwärts von GOX 2567 mit den Primern 2567\_F\_ECO / 2567\_FUSION\_R (obere Flanke) und strangaufwärts des Gens GOX 2569 mit den Primern 2567\_FUSION\_F / 2567\_R\_XBAI (untere Flanke) amplifiziert. Die Amplifikate wiesen eine Größe von 1115 bp (obere Flanke) und 1169 bp (untere Flanke) auf. Mithilfe einer LFH-PCR wurden die Flanken mit den Primern 2567\_F\_ECO und 2567\_R\_XBAI fusioniert. Im Anschluss erfolgte der Verdau des Inserts mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI*. Nach der Ligation in den mit denselben Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten pAJ63a erfolgte damit die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_R durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüfte Vektor pAJ63a $\Delta$ 1507 hatte eine Größe von 7989 bp, eine Sequenzierung (Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) bestätigte die korrekte Basenabfolge des Inserts. In Abbildung 38 ist die Konstruktion des Deletionsvektors schematisch dargestellt.

### **Erzeugung eines *G. oxydans* ATCC 621H $\Delta$ upp $\Delta$ 2567 Deletionsstamms**

Die Konjugation von *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta$ upp erfolgte mittels *triparentalem Mating* und die anschließende Selektion auf MV Nährböden mit 50  $\mu$ g / ml Km. Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genomspezifischen Primer 2567\_F\_CHECKgenom und dem plasmidspezifischen Primer pK18MCS\_R mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu$ g/ml) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FU-Selektionsplatten (60  $\mu$ g/ml FU) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern 2567\_F\_CHECKgenom und 2567\_R\_CHECKgenom bestimmt. Bei den Revertanten ergab sich hierbei eine Fragmentgröße von 8966 bp und bei den Mutanten 2922 bp. Zwei Klone mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 6044 bp mittels Sequenzierung mit den Primern 2567\_Seq\_F und 2567\_Seq\_R, durch das Fehlen des Zielgens im Übergangsbereich zwischen oberer und unterer Flanke im Genom bestätigt.

### 3.4 Deletion des Typ I Restriktionssystems in DSM 3504

Zur Inaktivierung des putativen Typ I Restriktionssystems in DSM 3504 sollte gezielt die entscheidende Untereinheit, das *hsdR* Gen, kodierend für die Restriktionsendonuklease, deletiert werden. Die Deletion erfolgte mit dem neu entwickelten *cod*-basierten Deletionssystem.

#### Konstruktion des Vektors zur Deletion von *hsdR*

Die flankierenden Bereiche des Zielgens *hsdR* (GLS\_c02360) wurden mit den Primern *hsdr\_F\_xba* / *hsdr\_fusR* und *hsdr\_fus\_F* / *hsdr\_pstI\_R* amplifiziert und wiesen eine Größe von 940 bp (obere Flanke) und 938 bp (untere Flanke) auf. In einer LFH-PCR wurden die Flanken mit den Primern *hsdr\_F\_xba* und *hsdr\_pstI\_R* fusioniert. Im Anschluss erfolgte der Verdau des Inserts mit den Restriktionsenzym *XbaI*. Nach der Ligation in den mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *SmaI* hydrolysierten und dephosphorylierten pKOS6b (Abbildung 39), erfolgte damit die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pK18MCS\_F und pK18MCS\_2R durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte Vektor pKOS6bΔ*hsdR* hatte eine Größe von 8514 bp. Der Restriktionsverdau mit *PstI* (Fragmentgrößen 200, 1800, 2750 und 3700 bp) sowie die anschließende Sequenzierung (Primer pK18MCS\_F und pK18MCS\_R) bestätigte die korrekte Basenabfolge des Inserts.

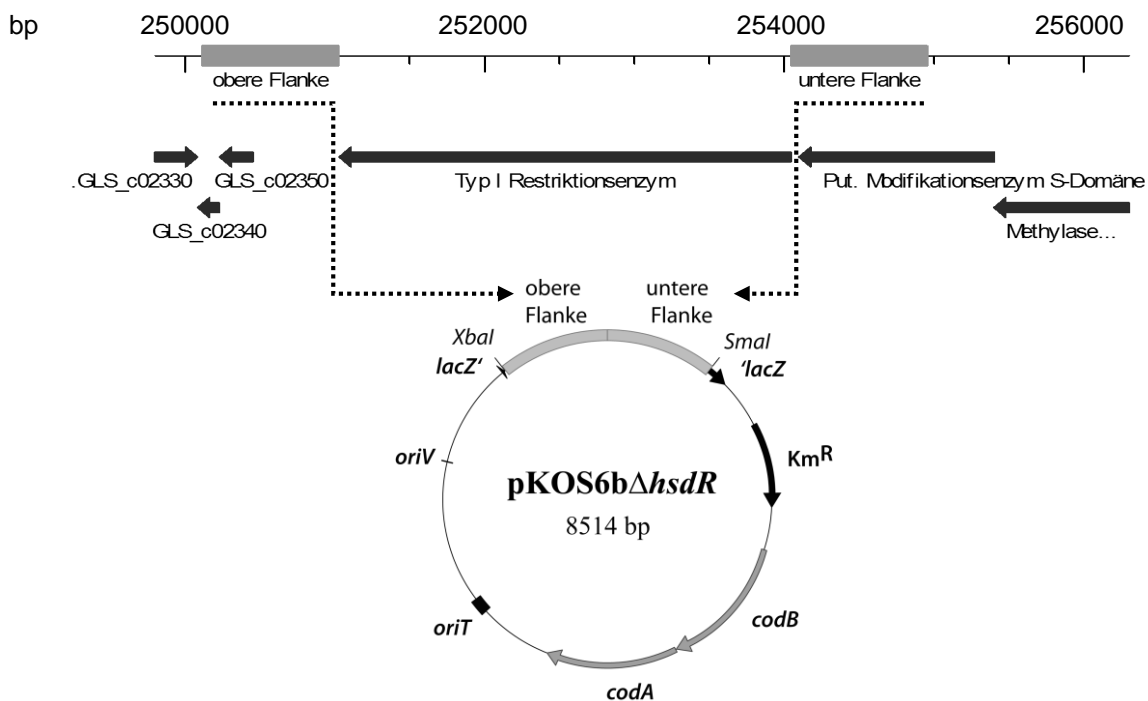


Abbildung 39: Schema der Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b Δ*hsdR* zur Deletion des putativen Typ I Restriktionsenzym (*hsdR*) in *G. oxydans* DSM3504. Die Gene GLS\_c02330 bis GLS\_c02350 stellen hypothetische Proteine dar.

### Erzeugung eines *G. oxydans* DSM 3504 $\Delta$ *hsdR* Deletionsstamms

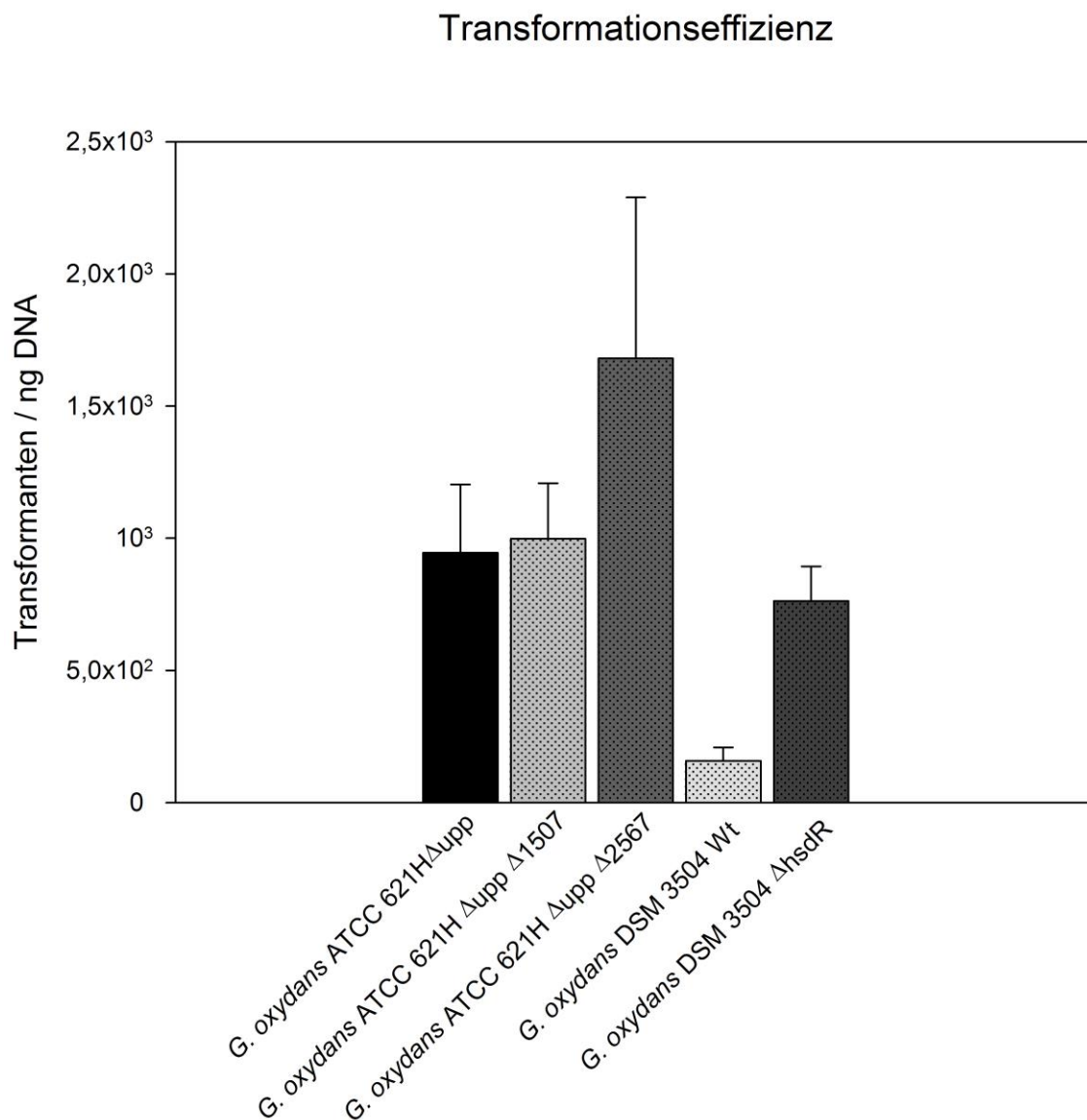
Die Transformation von *G. oxydans* DSM 3504 erfolgte mittels Elektroporation. Die Integration des Plasmids ins Genom wurde mit dem genomspezifischen Primer *hsdr\_checkF* und dem plasmidspezifischen Primer *pK18MCS\_R* mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die ausgewählten Klone wurden unter dem Selektionsdruck von Km (50  $\mu$ g/ml) in frischem Medium kultiviert und in  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnungen auf MV-FC-Selektionsplatten (60  $\mu$ g/ml FC) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die korrekten Klone über eine Kolonie-PCR mit den Primern *hsdr\_checkF* und *hsdr\_checkR* bestimmt. Bei den Revertanten konnte eine Fragmentgröße von 4980 bp und bei den Mutanten von 1962 bp nachgewiesen werden. Ein Klon mit nachgewiesener Mutation wurde ausgewählt und die erfolgte Deletion von 3018 bp mittels Sequenzierung (Primer *hsdr\_checkF* und *hsdr\_checkR*) bestätigt.

### 3.5 Experimentelle Bestimmung der Transformationseffizienzen / -frequenzen

Um die durch die Deletionen der Restriktionsenzyme erfolgten Veränderungen dokumentieren zu können, wurde die Transformationseffizienz der Stämme *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta$ *upp*, ATCC 621H  $\Delta$ *upp*  $\Delta$ 1507, ATCC 621H  $\Delta$ *upp*  $\Delta$ 2567, DSM 3504 WT und DSM 3504  $\Delta$ *hsdR* experimentell bestimmt (siehe II.4.16). Die Stämme wurden in EP Medium angezogen und erreichten bei der Ernte eine  $OD_{600}$  von 0,8. Für die Elektroporation wurde das Plasmid *pMM3b*, das zur Replikation in *G. oxydans* befähigt ist, ausgewählt. Die eingesetzte Menge an Plasmid DNA betrug 56 ng bzw. 224 ng. Jeder Stamm wurde dreimal elektroporiert, in einem Ansatz mit 56 ng DNA und im zweiten und dritten Ansatz mit 224 ng DNA. Die Elektroporation erfolgte mit 400  $\Omega$ , 2,5 kV und 25  $\mu$ F. Die Zellen wurden im Anschluss über Nacht bei 30°C und 180 rpm regeneriert. Aus jedem Ansatz wurden 10  $\mu$ l entnommen und bis  $10^7$  verdünnt. Aus der  $10^6$  und  $10^7$  Verdünnung wurden 100  $\mu$ l auf MV Nährböden für die Bestimmung der Lebendkeimzahl (LKZ) ausplattiert. Der restliche Elektroporationsansatz wurde zur Bestimmung der Transformantenanzahl auf MV mit 50  $\mu$ g / ml Km ausplattiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Kolonien ausgezählt und daraus die Transformationseffizienz und -frequenz, wie unter II.4.16 beschrieben, berechnet. Bei der Reproduktion des Versuchs wurde bei der Elektroporation in allen drei Ansätzen 5  $\mu$ l Plasmid DNA mit einer Konzentration von 32,8 ng /  $\mu$ l eingesetzt.

Signifikante Auswirkungen auf Effizienz bzw. Frequenz der Transformation konnten nur bei den Stämmen mit deletiertem Typ I Restriktionssystem beobachtet werden. Der stärkste Effekt konnte bei der  $\Delta$ *hsdR* Mutante von DSM 3504 festgestellt werden, bei der sich die Effizienz beinahe um das Fünffache und die Frequenz beinahe um das Vierfache im Vergleich zum WT

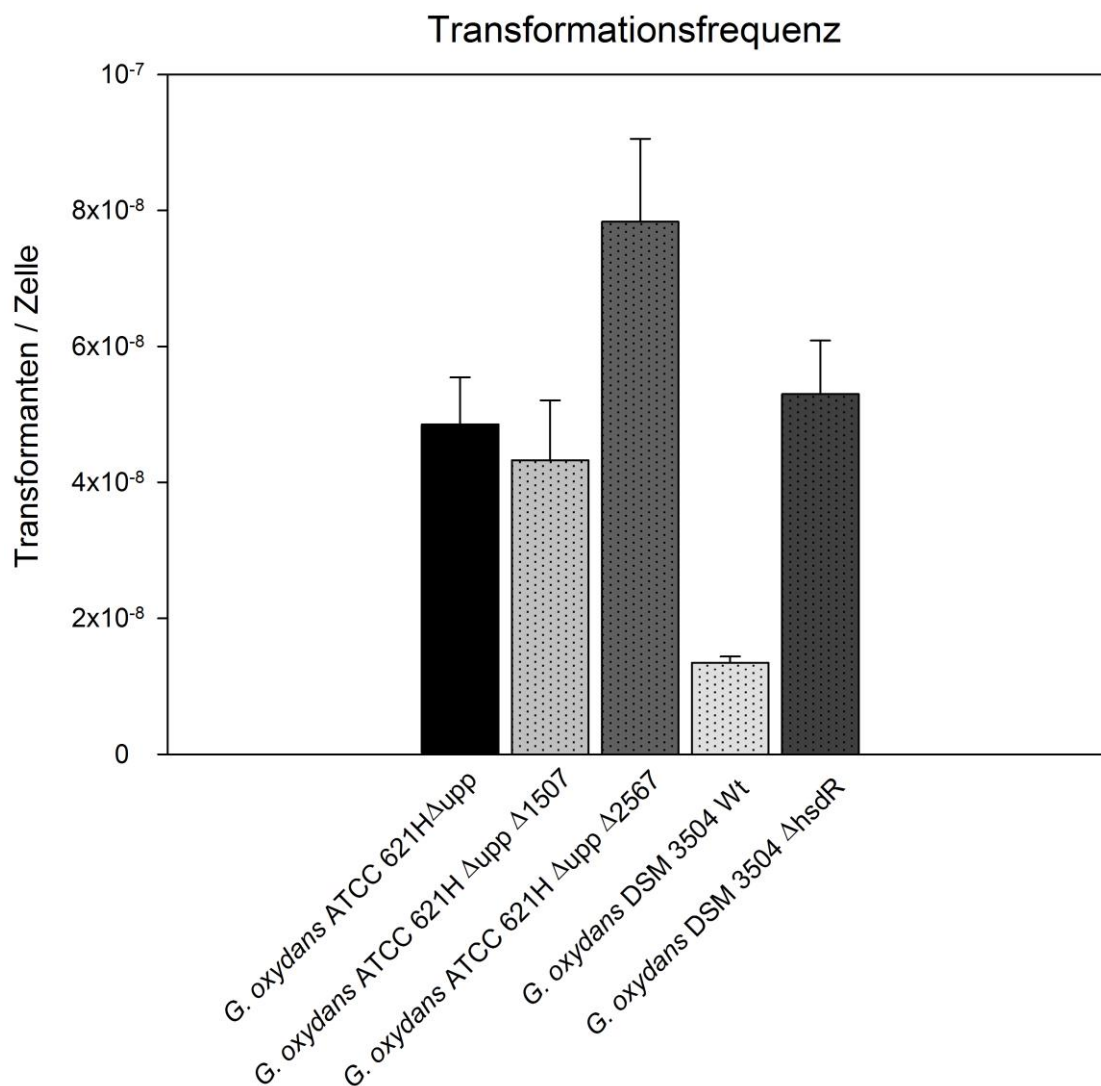
gesteigert hat. Bei der  $\Delta 2567$  Mutante von ATCC 621H $\Delta upp$  konnte ebenso Effizienz und Frequenz gesteigert werden. Die Deletion des Typ II Restriktionssystem im  $\Delta 1507$  Stamm brachte keine nachweisbare Veränderung der Transformationseigenschaften mit sich. Auffallend war außerdem der erhebliche Unterschied der Transformationseffizienz wie –frequenz bei den Wildtypen von Stamm ATCC 621H  $\Delta upp$  und DSM 3504. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 14 aufgelistet und in Abbildung 40 / Abbildung 41 in Form von Balkendiagrammen dargestellt.



**Abbildung 40:** Graphische Darstellung der getesteten Transformationseffizienzen in verschiedenen *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta upp$  und DSM 3504 Stämmen. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen biologischen Ergebnissen ermittelt.

**Tabelle 14: Auflistung der in verschiedenen *G. oxydans* Stämmen bestimmten Transformationseffizienzen und -frequenzen.** In Spalte 4 wurden die prozentualen Veränderungen von Effizienz und Frequenz bei der Transformation der Deletionsstämme im Vergleich zum jeweiligen WT angegeben.

Stamm	T. Effizienz	T. Frequenz	Veränderung
	Transformanten / ng	Transformanten / Zelle	Effizienz / Frequenz
ATCC 621H $\Delta upp$	945	$4,85 \times 10^{-8}$	- / -
ATCC 621H $\Delta upp \Delta 1507$	998	$4,32 \times 10^{-8}$	+6 % / -11 %
ATCC 621H $\Delta upp \Delta 2567$	1681	$7,83 \times 10^{-8}$	+78 % / + 61 %
DSM 3504 WT	158	$1,34 \times 10^{-8}$	- / -
DSM 3504 $\Delta hsdR$	763	$5,29 \times 10^{-8}$	+382 % / +295 %



**Abbildung 41: Darstellung der getesteten Transformationsfrequenzen in verschiedenen *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta upp$  und DSM 3504 Stämmen**

#### 4. Etablierung eines vektorbasierten Expressionssystems in *G. oxydans*

Nach der erfolgreichen Etablierung eines allgemeinen Deletionssystems für Essigsäurebakterien in *G. oxydans* sollte nun ein leicht anwendbares vektorbasiertes Expressionssystem für *G. oxydans* und weitere Essigsäurebakterien entwickelt werden. Da das System speziell für die Expression membranständiger Dehydrogenasen verwendet werden sollte und die Expression von in der Membran lokalisierten Proteinen oft durch schlecht abgestimmte Promotoren behindert wird, stand die Bestimmung eines geeigneten, nativen Promotors für die Expression im Vordergrund. Aufgrund der geringen Anzahl an verfügbaren Shuttlevektoren für *E. coli* und *Gluconobacter* sollte auch ein neues Plasmid konstruiert werden und als Basisvektor für das Expressionssystem eingesetzt werden.

##### 4.1 Konstruktion eines neuartigen *E. coli* – *G. oxydans* Shuttlevektors (pKOS4beta)

Die Auswahl des parentalen Vektors fiel auf pBR322, der mit seinen 20 Kopien pro Zelle in die Kategorie der *medium copy* Vektoren eingestuft wird (Boros *et al.* 1984). Die geringere Kopienanzahl in *E. coli* sollte auch eventuell störende Effekte der inserierten Gene aus *G. oxydans* verringern. Als Replikationsursprung für *G. oxydans* wurde der *ori* des chromosomalen Plasmids pGOX3 eingesetzt (*Rep* sowie *Par* Lokus).

Das Rückgrat des neuen Vektors wurde mit den Primern pBRredF / pBRredR und Plasmid DNA von pBR322 als Matrize amplifiziert, das Produkt hatte eine Größe von 3810 bp. Die Primer enthielten die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *NcoI*, um die spätere Ligation des Vektors mit der *ori* Region aus pGOX3 zu ermöglichen. Die Tetracyclinkassette wurde nur zum Teil amplifiziert und erfüllt deshalb im neuen Vektor keinerlei Funktion. Der *ori* Bereich aus pGOX3 wurde mit den Primern *par\_repF* und *par\_repR* amplifiziert (Abbildung 42 A), genomische DNA von *G. oxydans* ATCC 621H wurde als Matrize eingesetzt. Das 2384 bp große Produkt und das amplifizierte Rückgrat von pBR322 (Abbildung 42 B) wurden mit *XbaI* und *NcoI* verdaut und anschließend in einem Ligationsprozess zu einem zirkulären Produkt ligiert, damit erfolgte die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung des korrekten Konstrukts wurde mit den Primern pKOS4checkF und pKOS4checkR in einer Kolonie PCR durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüfte Vektor pKOS4 hatte eine Größe von 6170 bp (Abbildung 42 C). Aufgrund der schlechten Selektionseigenschaften von Amp bei *G. oxydans* (besonders bei Stamm DSM 3504) wurde in einem zweiten Schritt die Amp Kasette durch eine Km Kasette ausgetauscht. Dazu wurde die Km Kasette aus pK19mobsacB mit den Primern

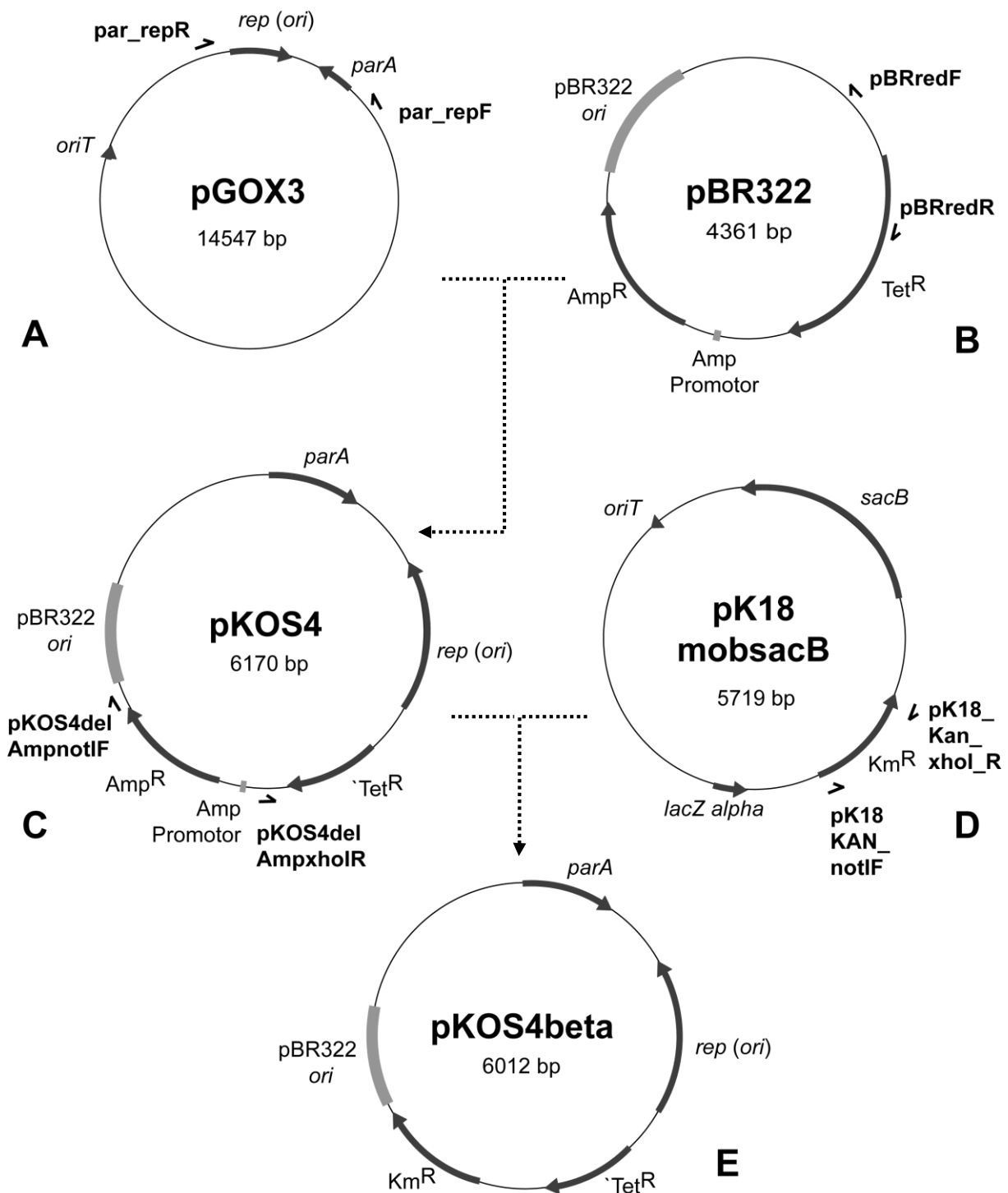
pK18KAN\_notIF / pK18\_Kan\_xhoI\_R amplifiziert (Abbildung 42 D) und über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *XhoI* in den mit den Primern pKOS4delAmpnotIF / pKOS4delAmpxhoIR aus pKOS4 amplifizierten Vektor ligiert. Der Ansatz wurde erneut zur Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen verwendet. Die Überprüfung des korrekten Konstrukts wurde mit den Primern pKOS4checkF und pKOS4checkR in einer Kolonie PCR durchgeführt. Der anschließend aus *E. coli* isolierte und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüfte Vektor pKOS4beta hatte eine Größe von 6012 bp (Abbildung 42 E), eine Sequenzierung (Primer pKOS4checkF und pKOS4checkR) bestätigte die korrekte Basenabfolge der im Rückgrat von pKOS4 inserierten ORI Region aus pGOX3.

#### 4.2 Erprobung der Replikationsfähigkeit und Persistenz von pKOS4beta in *G. oxydans*

Um die Replikationsfähigkeit von pKOS4beta zu testen wurde der Vektor mittels Elektroporation in *G. oxydans* ATCC 621H sowie in DSM 3504 transferiert. Die Selektion erfolgte auf MV Nährböden mit 50 µg / ml Km, angewachsene Kolonien wurden in 5 ml Flüssigmedium (mit 50 µl / ml Km) überführt und nach erneutem Anwachsen mittels Kolonie PCR mit den Primern pBRredF und / pKOS4delAmpxhoIR überprüft. Der Vektor konnte trotz zahlreicher Transformationsversuche in DSM 3504 nicht nachgewiesen werden. Die Klone von ATCC 621H wurden nach dem Nachweis in antibiotikafreies MV überimpft. Nach 24 h Inkubation konnte der Vektor nach wie vor nachgewiesen werden. Die Überimpfung wurde bis zu vier Passagen ohne Antibiotikazusatz wiederholt, bei jeweils 24 h Inkubationszeit. Auch nach der vierten antibiotikafreien Passage war der Vektor noch problemlos nachweisbar.

Die Isolation von einzelnen Plasmiden aus *G. oxydans* ATCC 621H ist aufgrund der vorhandenen chromosomalen Plasmide nicht möglich. Um den Vektor pKOS4beta auf seine Integrität hin zu testen, wurde daher die gesamte genomische DNA isoliert und mit 2 µg DNA eine Re-Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP 10 durchgeführt. Nach der Selektion von *E. coli* auf Km wurden fünf Kolonien ausgewählt, in Flüssigmedium angezogen und eine Plasmidisolation durchgeführt. Die resultierenden Plasmide wiesen eine Größe von etwa 20 kb statt der erwarteten 6 kb von pKOS4beta auf. Eine im Anschluss mit *NdeI* bzw. mit *EcoRV* erzeugte Restriktionskarte der isolierten Plasmide zeigte neben den für pKOS4beta erwarteten Bandengrößen noch weitere nicht näher identifizierbare Banden an. Eine *in silico* erstellte Restriktionskarte mit *NdeI* bzw. *EcoRV* von pGOX3 zeigte schließlich, dass die nicht zuordenbaren Banden zum Restriktionsmuster von pGOX3 gehören.



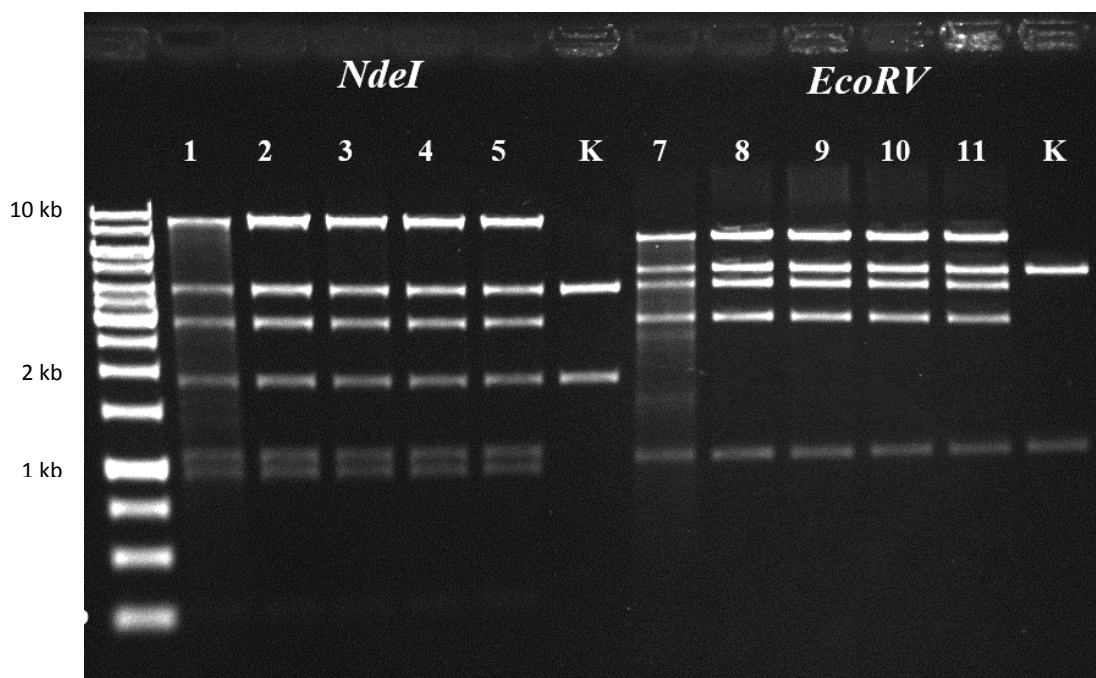


**Abbildung 42: Übersichtsschema zur Konstruktion von pKOS4beta.** Der *ori* für *G. oxydans* wurde aus dem chromosomalen Plasmid pGOX3 (A) und das Rückgrat des Vektors aus pBR322 (B) mit den angegebenen Primern über PCR erzeugt. Die mit *NcoI* und *XbaI* hydrolysierten Produkte wurden ligiert und der daraus resultierende Vektor als pKOS4 (C) bezeichnet. Die Km Resistenzkassette wurde mit den angegebenen Primer und pK18mobsacB als Matrize amplifiziert (D) und über die Schnittstellen *NotI* und *XhoI* in das amplifizierte Rückgrat von pKOS4 ligiert. Der resultierende Vektor wurde schließlich als pKOS4beta bezeichnet (E).

Auch mehrfache Wiederholungen des Experiments führten stets zum selben Ergebnis: Nach erfolgter Konjugation von pKOS4beta in ATCC 621H kam es durch ein homologes Rekombinationsereignis über die *par-rep* Region zur Integration von pKOS4beta in das chromosomale Plasmid pGOX3 und dadurch zur Entstehung eines Hybrids.

Das Plasmid pKOS4beta konnte trotz Integration stets über PCR in allen Passagen nachgewiesen werden, der entstandene Hybrid konnte aber erst durch die Re-Transformation in *E. coli* mit anschließender Isolation und Restriktionshydrolyse des Plasmids sichtbar gemacht werden. Es wurde im Anschluss der Versuch unternommen über eine Deletion des *par-rep* Bereichs von pGOX3 einen dauerhaften Verlust des chromosomalen Plasmids zu verursachen. Die Deletion konnte aber auch nach mehreren Versuchen nicht erfolgreich durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der erfolglosen Versuche das Plasmid in DSM 3504 zu transformieren und der Schwierigkeiten eine stabile Replikation (ohne Integration) im Stamm ATCC 621H zu gewährleisten, wurde als Basisvektor für das Expressionssystem das bereits erprobte Plasmid pJV17 verwendet. Die angewandte Methode stellt allerdings eine Möglichkeit dar, um chromosomale Plasmide von *G. oxydans* in *E. coli* zu transferieren und zu isolieren.



**Abbildung 43:** Agarosegel des aus *E. coli* Klonen nach Re-Transformation isolierten Plasmids. Hydrolyse mit *NdeI*: Spuren 1-5, Hydrolyse mit *EcoRV*: Spuren 7-11, K: mitgeführte Kontrolle bestehend aus DNA von pKOS4beta.

### 4.3 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts der Alkohol Dehydrogenase

Nach der erfolgten Auswahl von pJV17 als parentalen Vektor für das neue Expressionssystem, sollte ein nativer Promotor charakterisiert und für den Einsatz im neuen Expressionssystem für membranständige Dehydrogenasen ausgewählt werden. Die Wahl fiel auf den Promotorbereich der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (ADH – GOX 1068) von *G. oxydans* ATCC 621H.

Zur Charakterisierung des Promotorbereichs wurde zunächst der Transkriptionsstartpunkt der ADH mittels RLM Race (II.5.7) bestimmt. Hierzu wurde die gesamte RNA aus einer Kultur von ATCC 621H in der späten exponentiellen Wachstumsphase isoliert (II.5.2 ff.). Nach erfolgter Überprüfung der RNA auf Reinheit und Integrität (II.5.5 und II.5.6) erfolgte mit 10 µl (RNA Konzentration 1,6 µg / ml) die CIP-, TAP Behandlung der RNA sowie die Adapter Ligation wie unter II.5.7 beschrieben. Nach dem erfolgten RT Schritt wurde die *nested* PCR durchgeführt. Die Primer für die äußere PCR waren 5'Race specific outer Primer / 1068\_Race2F und für die innere PCR 5'Race specific inner Primer / 1068\_Race1F (Abbildung 44). Die Funktionalität der Primer wurde zuvor mit dem Primer 1068\_Race3F und genomischer DNA von ATCC 621H als Matrize überprüft. Die äußere PCR wies zwei Banden auf, die ausgeschnitten und sequenziert wurden. 1 µl des gereinigten äußeren PCR Produkts wurde für die *nested* PCR mit den inneren Primern verwendet. Die daraus resultierende Einzelbande wurde ebenfalls per Gelextraktion isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit den jeweils für die PCR eingesetzten Primern, im Rückwärts wie Vorwärtslauf. Anschließend wurden die Sequenzen mithilfe der Clone Manager Software (Version 9.0) von Sci-Ed (Cary, USA) analysiert, dabei wurden die Sequenzdaten der PCR Produkte mit der Adaptersequenz sowie mit der Genomsequenz von ATCC 621H verglichen. Sowohl die Adaptersequenz wie auch die Gensequenz wurden identifiziert, der Übergang zwischen Gensequenz und Adapterkappe markiert dabei den exakten Transkriptionsstartpunkt des nachfolgenden Gens. Sowohl für die Einzelbande der inneren PCR wie auch für eine der Banden der äußeren PCR war es möglich den Übergangsbereich zu lokalisieren. Die zweite Bande der äußeren PCR lieferte kein Sequenzierergebnis und wurde daher als unspezifisches Produkt eingestuft. Der für das Gen GOX 1068 bestimmte Transkriptionsstartpunkt lag laut Sequenz des äußeren PCR Produkts auf Position 1.172.127 bzw. auf dem Adenin 135 Basen vor dem Startcodon (Abbildung 45). Derselbe Startpunkt konnte durch die Sequenzdaten der Bande des inneren PCR Produkts bestätigt werden. Das Ergebnis wurde außerdem in einem zweiten unabhängigen biologischen Experiment validiert.

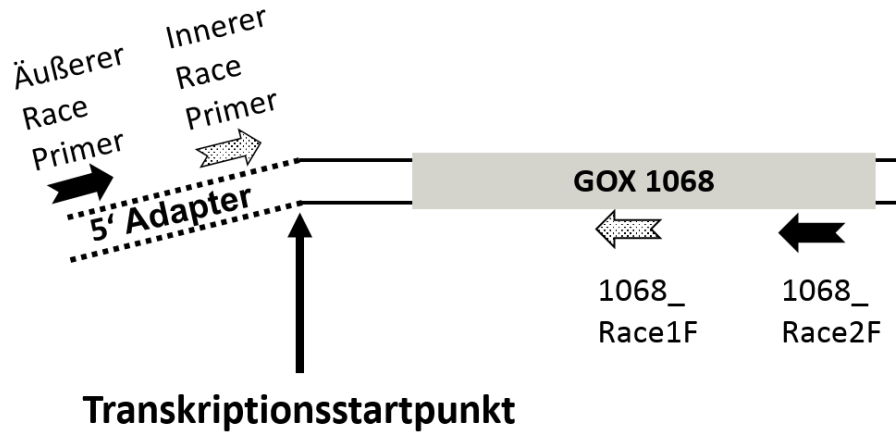


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Primerbindestellen der *nested PCR* zur Transkriptionsstartpunktbestimmung der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (GOX 1068). Der Knick weist auf den Übergang zwischen Adapter (gepunktete Linien) und Genomsequenz hin.

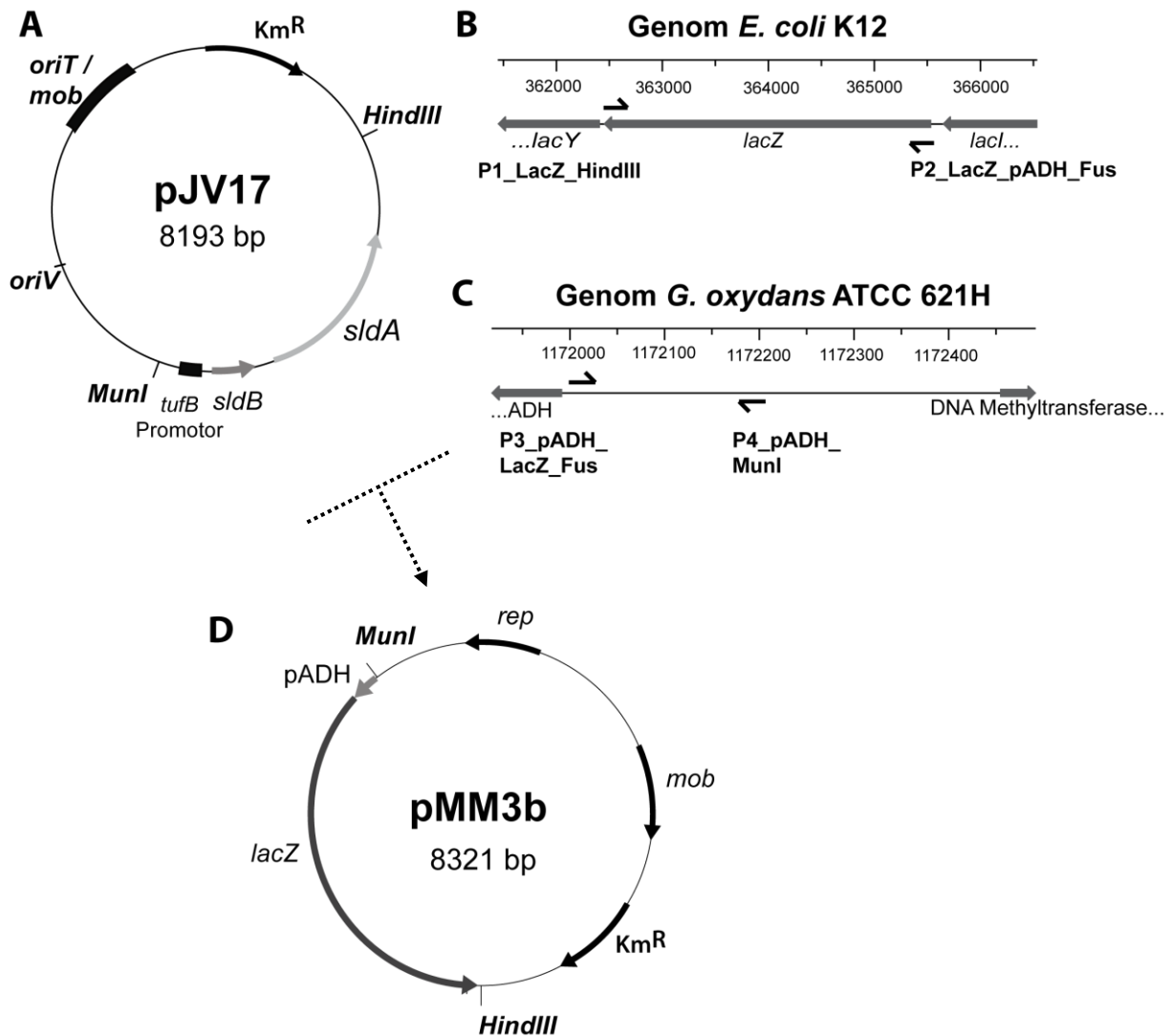


Abbildung 45: Darstellung des mittels RLM Race bestimmten Transkriptionsstartpunkts der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (GOX 1068) in der Genomsequenz von *G. oxydans* ATCC 621H auf Position 1.172.127. Die eingetragenen Promotorbereiche (-10 Region bzw. -30 Region) sind rein putativ und wurden nicht experimentell bestimmt. N.B. Das Gen ist auf dem minus Strang codiert, die zwei Pfeile (<) kennzeichnen die Leserichtung in der Grafik.

Da es kaum Untersuchungen zu Promotoren von Essigsäurebakterien gibt und dementsprechend keine Daten zu speziellen Promotor-Sequenzmotiven vorliegen, wurde der Promotorbereich mit den bekannten Sequenzmotiven aus *E. coli* Promotoren verglichen. In einem Bereich von etwa zehn Basen vor dem Startpunkt konnte eine „T-A“ reiche Region gefunden werden, die in etwa der Pribnow-Box von *E. coli* entspricht. Die ebenfalls aus *E. coli* bekannte -35 Region, mit dem Sequenzmotiv TTGACA, konnte nicht ausgemacht werden, wurde aber als putative Region etwa 35 Basen nach dem Start eingetragen. In Abbildung 45 sind sowohl der ermittelte Transkriptionsstart wie auch die putativen Promotorregionen in der Genomsequenz von ATCC 621H eingetragen und dargestellt.

#### 4.4 Konstruktion eines Expressionsvektors mit ADH Promotor

Für die Konstruktion eines Expressionsvektors für membranständige Dehydrogenasen wurde das Rückgrat des Vektors pJV17 und der experimentell bestimmte Promotorbereich der Alkohol Dehydrogenase (GOX 1068) aus *G. oxydans* ATCC 621H verwendet. Um die Promotoraktivität zu überprüfen wurde *lacZ* als Reportergen unmittelbar nach dem ADH Promotor eingesetzt. Die Konstruktion des Vektors wurde von Markus Mientus ausgeführt. Um den Promotor nicht zu beschädigen wurde ein Bereich von 250 bp vor dem Transkriptionsstart mit den Primern P3\_pADH\_LacZ\_Fus und P4\_pADH\_MunI mit genomischer DNA von ATCC 621H als Matrize amplifiziert (Abbildung 46 C). Die Schnittstelle *MunI* wurde für die spätere Ligation in das Rückgrat von pJV17 eingefügt, Primer P3 enthielt einen 20 bp langen zu *lacZ* komplementären Überhang für eine spätere Fusion von Promotor und Reporter. Die Amplifikation von *lacZ* erfolgte mit den Primern P1\_LacZ\_HindIII und P2\_LacZ\_pADH\_Fus mit genomischer DNA von *E. coli* K12 als Matrize, das Produkt hatte eine Größe von 3105 bp (Abbildung 46 B). Die Schnittstelle *HindIII* war für die Ligation in das Rückgrat des Vektors pJV17 vorgesehen, der 20 bp Überhang diente der Fusion mit dem ADH Promotor. Die Fusionierung von Reporter und Promotor erfolgte durch LFH-PCR mit den Primern P1\_LacZ\_HindIII und P4\_pADH\_MunI. Das aus Gel extrahierte und gereinigte Fusionsprodukt sowie pJV17 wurden mit *HindIII* und *MunI* hydrolysiert. Nach der Dephosphorylierung des Vektors erfolgte die Ligation ÜN und anschließend die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen. Die Überprüfung der korrekten Insertion wurde mit den Primern pMM3b\_check1.for und pMM3\_uni2.rev in Form einer Kolonie-PCR durchgeführt. Der im Anschluss aus *E. coli* isolierte Vektor pMM3b hatte eine Größe von 8321 bp (Abbildung 46 D), die Sequenzierung (Primer pMM3b\_check1.for und pMM3\_uni2.rev) bestätigte die korrekte Basenabfolge der Promotor-Reporter Insertion.



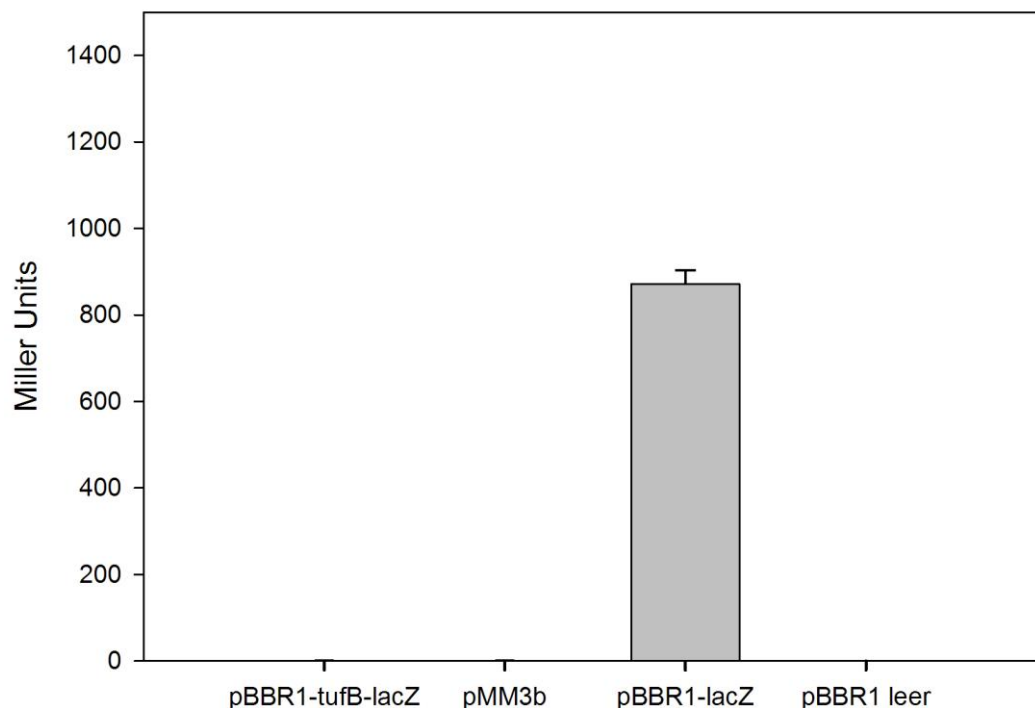
**Abbildung 46:** Übersicht der Konstruktion des Expressionsvektors pMM3b mit Promotorbereich der ADH. Über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *MunI* wurden das Reportergen (B) und der ADH Promotorbereich (C) in das Rückgrat von pJV17 (A) ligiert. Der resultierende Vektor wurde als pMM3b bezeichnet (D)

#### 4.5 Überprüfung des Expressionssystems mittels $\beta$ -Galaktosidase Assay

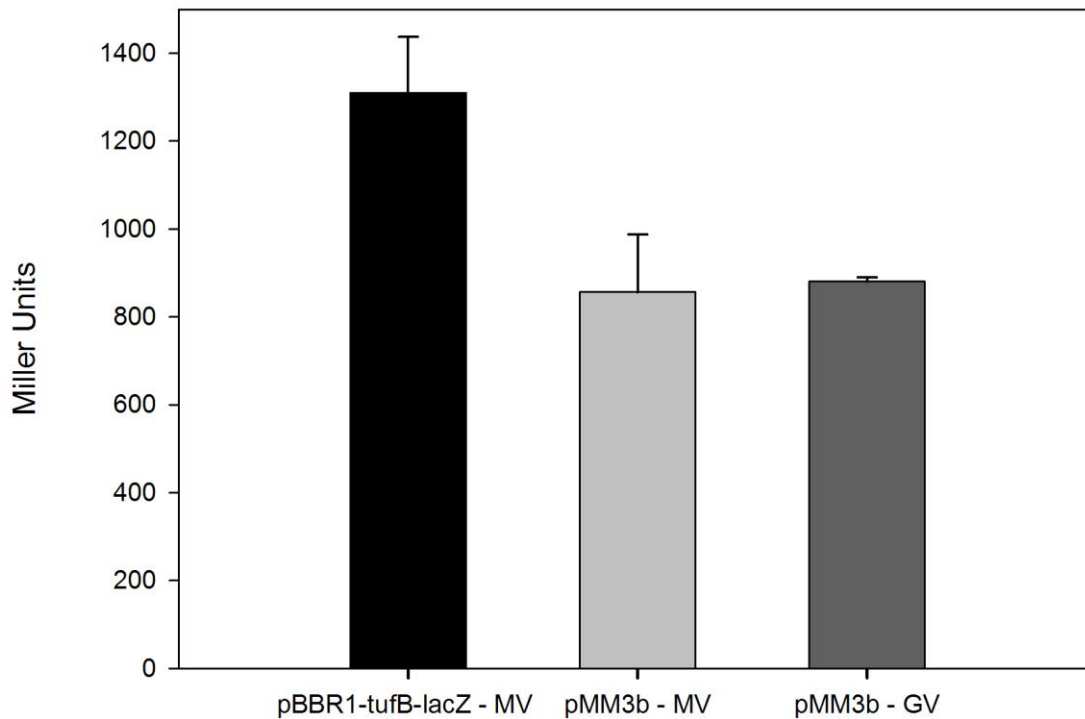
Zur Erprobung des neuen Expressionsvektors pMM3b und zur Überprüfung der Aktivität des eingesetzten Promotors der membranständigen ADH (GOX 1068) wurden mit Hilfe von Markus Mientus  $\beta$ -Galaktosidase Assays in *E. coli* und *G. oxydans* durchgeführt (II.6). Der Expressionsvektor wurde hierzu in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 und in elektrokompente *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta upp \Delta 2567$  Zellen (Deletionsstamm des Typ I Restriktionssystems, III.3.3) transferiert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und wie unter II.6 beschrieben für die Aktivitätstests vorbereitet. Zunächst wurden die Assays in *E. coli* durchgeführt. Die relative Promotorstärke für die Zellen mit der Promotor-Reporterfusion pADH-lacZ (pMM3b) betrug  $0,36 \pm 0,02$  MU. Als Negativkontrolle für den Assay wurden Zellen mit dem Leervektor pBBR1 (*MunI* und *HindIII* hydrolysiertes und religiertes pJV17)

sowie pBBR1-*tufB-lacZ* (mit *XbaI* und *HindIII* geschnittener pJV17, *lacZ* wurde mit denselben Schnittstellen unmittelbar nach dem *G. oxydans* spezifischen *tufB* Promotor inseriert) verwendet. Die Aktivität bei den Negativkontrollen betrug stets 0.0 MU. Für die Positivkontrolle wurde pBBR1-*lacZ* verwendet, dafür wurde pJV17 mit *MunI* und *HindIII* geschnitten, *lacZ* wurde inklusive des *lacZ* eigenen Promotors mit denselben Schnittstellen in den Vektor inseriert, die gemessene Aktivität war wie erwartet wesentlich höher und betrug hier  $871 \pm 31.62$  MU. Um die Promotorstärken im eigentlichen Zielorganismus *G. oxydans* zu ermitteln wurden die  $\beta$ -Galaktosidase Assays mit Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase von ATCC 621H durchgeführt. Die Zellen wurden auf MV (50 mM Mannitol) angezogen. Die gemessene Promotoraktivität in *G. oxydans* ATCC 621H  $\Delta_{upp} \Delta_{2567}$  betrug für pMM3b  $805,29 \pm 203,3$  MU, für pBBR1-*tufB-lacZ*  $1310,03 \pm 127,28$  (Abbildung 48) und für pBBR1-*lacZ*  $2817,65 \pm 813,35$  (Daten nicht dargestellt). Der Vektor pMM3b mit dem Promotor der ADH wurde auch in auf GV kultivierten Zellen getestet und erreichte eine Aktivität von  $880.19 \pm 1.15$  MU.

#### $\beta$ -Galaktosidase Assays in *E. coli*



**Abbildung 47: Darstellung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität des Expressionsvektors pMM3b (mit ADH Promotor) in *E. coli*.** Als Negativkontrolle wurde pBBR1-*tufB-lacZ* bzw. der Leervektor pBBR1 verwendet, als Positivkontrolle wurden Zellen mit pBBR1-*lacZ* (*lacZ* Reporter unter Kontrolle des *lac* Promotors) eingesetzt. Der ADH Promotor in pMM3b zeigte in *E. coli* nahezu keine Aktivität.

$\beta$ -Galaktosidase Assays in *G. oxydans*

**Abbildung 48:** Darstellung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität des Expressionsvektors pMM3b (mit ADH Promotor) sowie pBBR1-*tufB-lacZ* (Kontrolle) in *G. oxydans* ATCC 621H $\Delta$ upp  $\Delta$ 2567. Der ADH Promotor in pMM3b zeigt in *G. oxydans* im Gegensatz zu den Messungen in *E. coli* starke Aktivität. Dasselbe gilt für den *tufB* Promotor, der außerdem deutlich stärker als der ADH Promotor ist.

Der Enzym Assay zeigte somit, dass der ADH Promotor in *E. coli* inaktiv, aber beim Einsatz des Vektors in *G. oxydans* starke Aktivität messbar war. Die Aktivität lag dabei aber deutlich unter der des *tufB* oder *lacZ* Promotors.

Die Ergebnisse belegen die Funktionalität des Expressionsvektors und des experimentell bestimmten ADH Promotors in *G. oxydans*. Die Anwendbarkeit des Systems für die Expression von membranständigen Dehydrogenasen konnte außerdem experimentell, durch die von Markus Mientus durchgeführte Komplementierung der Polyol Dehydrogenase (*sldAB*) mit dem Plasmid pADH-*sldAB* (pMM3b mit entferntem *lacZ* und eingefügtem *sldAB*) in einem ATCC 621H  $\Delta$ *sldAB* Stamm, belegt werden. Der ATCC 621H  $\Delta$ *sldAB* pADH-*sldAB* Stamm war durch das Einbringen von *sldAB* unter der Kontrolle des ADH Promotors wieder zum Wachstum auf mannitolhaltigem Medium befähigt (Daten nicht gezeigt).



## IV. Diskussion

Essigsäurebakterien werden aufgrund ihrer Fähigkeiten unvollständige Oxidationsprodukte regio- und stereospezifisch mit hohen Geschwindigkeiten umzusetzen vielfach biotechnologisch eingesetzt (De Muynck *et al.* 2007, Deppenmeier *et al.* 2002). Enorme Potentiale liegen im Bereich der Exopolysaccharide aufgrund der von manchen Arten gebildeten hochkristallinen äußerst reinen Zellulose (Hornung *et al.* 2006, Sunagawa *et al.* 2013). Zur Nutzung dieser Potentiale sind effiziente molekularbiologische Werkzeuge zur Erforschung der metabolischen biosynthetischen Prozesse erforderlich, deshalb war es Ziel dieser Arbeit ein allgemein anwendbares Deletionssystem für die Familie der Acetobacteraceae zu entwickeln. Damit zusammenhängend wurde die Bedeutung von Restriktionssystemen für die Transformationseffizienzen von *G. oxydans* untersucht. Dies erfolgte vor dem Hintergrund speziell bei schwer modifizierbaren Stämmen Möglichkeiten zu finden, um molekularbiologische Veränderungen durchzuführen.

Die niedrige Biomasseproduktion mancher biotechnologisch relevanter Essigsäurebakterien stellt einen Nachteil für Produktivität und Rentabilität vieler Produktionsprozesse dar (Krajewski 2008), deshalb wurden die Gründe für die höheren Wachstumsraten mancher Stämme näher untersucht. Durch die Verfügbarkeit des neuen Deletionssystems konnte der aufgrund seines hohen Biomasseertrags interessante aber bisher nicht genetisch modifizierbare *G. oxydans* Stamm DSM 3504 ausgiebig untersucht und mit ATCC 621H verglichen werden. Der Einsatz membranständiger Dehydrogenasen in oxidativen Fermentationen, die durch klassische chemische Synthesen gar nicht möglich, oder nur mit großem technischen, energetischen und finanziellen Aufwand umsetzbar sind, ist von großem industriellen Interesse (Deppenmeier *et al.* 2002). Daher wurde in dieser Arbeit neben den anderen molekularbiologischen Werkzeugen auch ein spezielles Expressionssystem zur Untersuchung und Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien entwickelt.

### 1. Etablierung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems

#### 1.1 Auswahl des *cod* Operons als Gegenselektionsmarker

Das von Peters *et al.* (2013) publizierte auf einer Gegenselektion basierende Deletionssystem hat trotz des hohen Nutzwertes und der Effizienz einen entscheidenden Nachteil: Der Einsatz in WT Stämmen ist nicht möglich. Die vorhergehende Deletion der Uracil Phosphoribosyl Transferase (*upp*) ist erforderlich, um die Grundlage für die Anwendbarkeit zu schaffen. Dieser

Deletionsschritt könnte die Physiologie des Ausgangsstamms verändern, außerdem ist er zeit- aufwändig und in manchen Stämmen nicht durchführbar. So war es etwa nicht möglich das System in *G. oxydans* DSM 3504 zu etablieren. Der entscheidende Schritt bei der Entwicklung eines alternativen Deletionssystems war daher die Auswahl eines geeigneteren und verlässli- cheren gegenselektierbaren Markergens. Um das vormalige Einführen von Deletionen in den WT Stämmen zu vermeiden, war es essentiell ein Gen zu finden, welches als Marker bei Ge- genselektionen funktioniert aber in *G. oxydans* und möglichst auch in anderen Essigsäurebak- terien nicht natürlich vorkommt. Das *codA* Gen aus *E. coli* K12 wies diese Eigenschaft, im Gegensatz zu anderen in Betracht gezogenen potentiellen Markergenen, auf. Das Gen kodiert für eine Cytosin Deaminase und ist zusammen mit *codB*, welches für eine Cytosin Permease codiert, in einem Operon angeordnet (Danielsen *et al.* 1992). Der erste Anwendungsversuch von *codA* in einem Deletionssystem wurde von Duraisingh *et al.* (2002) in *Plasmodium falciparum* ausgeführt. Unglücklicherweise entwickelte der Organismus eine Resistenz gegen FC, trotz der nachgewiesenen Expression von *codA* in den Zellen. Einige Jahre später wurde das System mit einer Cytosin Deaminase aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich etabliert (Orr *et al.* 2012). Funktionierende Deletionssysteme die auf der *E. coli* eigenen Cytosin Deaminase *codA* basieren wurden in der Gattung *Rhodococcus* (van der Geize *et al.* 2008) und *Streptomyces* (Dubeau *et al.* 2009) etabliert, dabei wurde auch die Möglichkeit einer generellen Anwend- barkeit in *Actinobacteria* experimentell überprüft.

Wie die *in silico* durgeführten Untersuchungen zeigten, konnte in DSM 3504 eine Cytosin De- aminase (GLS\_c08830) gefunden werden, die aber nur eine geringe Ähnlichkeit zum *codA* aus *E. coli*, mit einer max. Identität von 8/27 AS (30%) aufwies (II.1.1 und Tabelle 8). Durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von FC in DSM 3504 konnte endgültig ge- zeigt werden, dass die *Gluconobacter* eigene Cytosin Deaminase keinen Einfluss auf die Wir- kung von FC als Selektionsmittel hat. Das Wachstum des Stammes war selbst bei Konzentra- tionen von 500 µg / ml FC nicht beeinträchtigt. Im WT-Stamm kommt es demzufolge zu keiner- lei Umsetzung von FC zu toxischem FU, dies ist eine essentielle Grundlage für die Gegense- lektion nach der zweiten Rekombination, um Zellen ohne den *codA* enthaltende Deletionsvek- tor zu selektieren. Die Cytosin Deaminase aus DSM 3504 scheint substratspezifischer zu funk- tionieren als die von *E. coli* K12, das fluoridierte Analogon FC wird nicht zum toxischem Produkt FU umgesetzt. Im Stamm *G. oxydans* ATCC 621H konnte keine natürlich vorkommende Cy- tosin Deaminase gefunden werden.

Die toxische Wirkung des Pyrimidinanalogons FU, welches von der Uracil Phosphoribosyl Transferase (*upp*) über F-UMP zu 5-Fluorodesoxyureidinmonophosphat umgesetzt wird und

dadurch die DNA Reparatur- und Replikationsmaschinerie hemmt (Neuhard 1982), zeigt sich bereits bei sehr geringen Konzentrationen von 30 µg / ml. Die hohe Sensitivität gegen FU ermöglicht eine besonders effektive Gegenselektion, da Zellen mit integriertem Deletionsvektor, der durch *codA* FC zu FU umgesetzt, praktisch nicht überleben können.

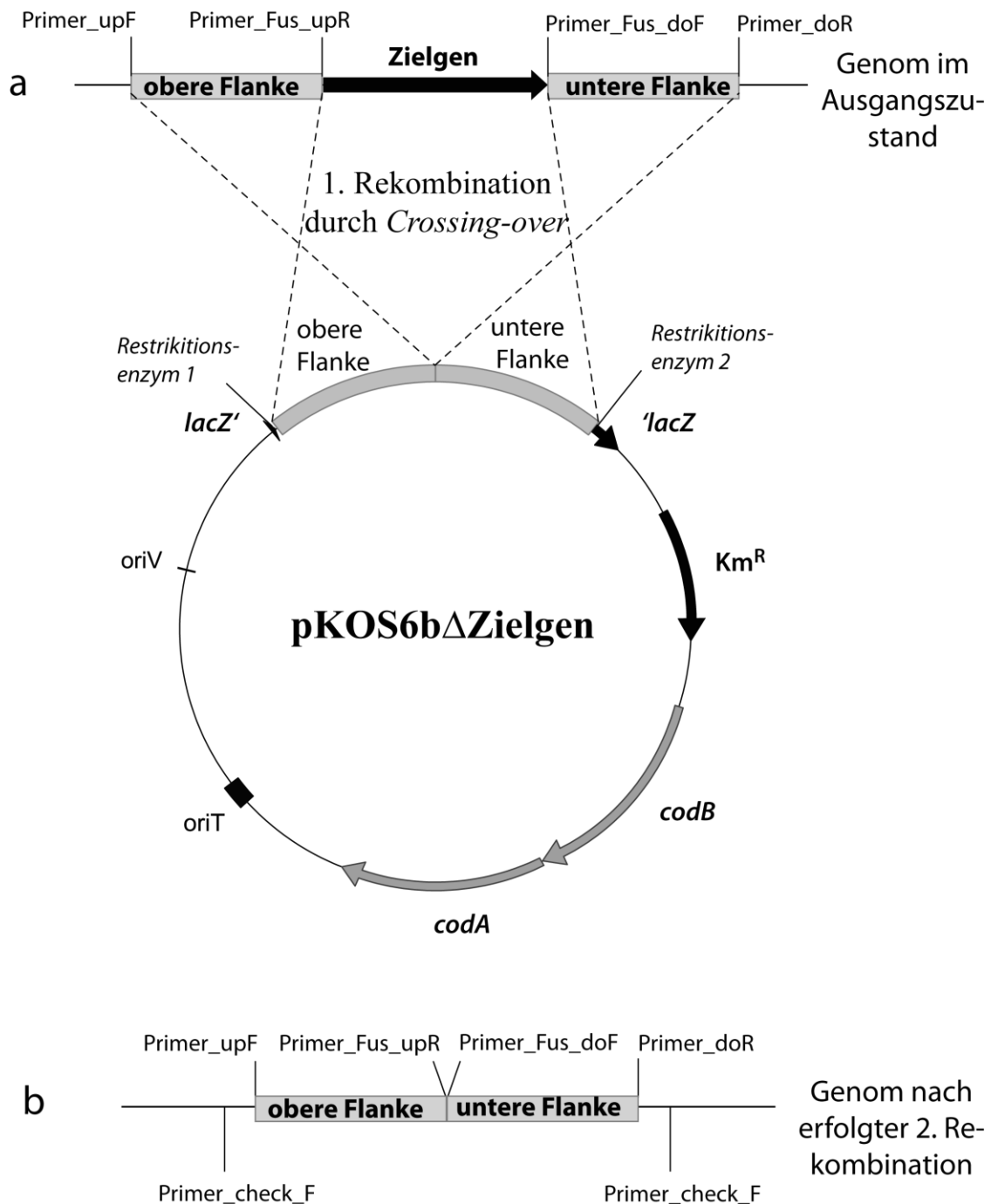
### 1.2 Etablierung des *cod* Deletionssystems in *G. oxydans*

Anhand der Deletion der Levansucrase (GLS\_c09570) konnte die erfolgreiche Etablierung des *cod* Deletionssystem in DSM 3504 demonstriert werden (III.1.3). Dies stellte gleichzeitig auch die erste beschriebene Deletion in diesem Stamm dar, da bisherige Deletionsstrategien nicht zielführend waren. Der in Abbildung 9 dargestellte Prozentsatz (beinahe 50%) an nachgewiesenen Mutanten im Vergleich zu Wildtypen (Revertanten zum Wildtyp) nach der erfolgten 2. Rekombination entsprach den theoretischen Erwartungen. Dieses Verhältnis sollte in der Theorie stets 50 % betragen, wenn die obere und untere homologe Flanke dieselbe Länge besitzen. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Vektor bei der Rekombination aus dem Genom heraus das Zielgen zwischen den homologen Flanken mitnimmt bzw. wieder über die homologen fusionierten Flanken ohne Zielgen herausrekombiniert, ist in etwa gleich groß. Es ist davon auszugehen, dass sich das Verhältnis zwischen Mutanten und Revertanten bei Genen, die für den Organismus eine geringere Bedeutung haben in etwa 50 % nähert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei Genen mit vermutlich stärkerem Einfluss auf die Physiologie des Organismus (z.B. Typ I Restriktionssystem in DSM 3504), deutlich geringere Prozentsätze bei den erhaltenen Mutanten beobachtet. Die Deletion der Levansucrase hatte keine messbaren Auswirkungen auf Morphologie oder Wachstumsverhalten des Stammes, es handelt sich um ein nicht essentielles Gen und war auch deshalb ausgewählt worden, um das neu entwickelte Deletionssystem zu testen.

Die Etablierung des *cod* Deletionssystems in ATCC 621H funktionierte problemlos. Hierfür wurde die Polyol Dehydrogenase (*sldAB*) als Zielgen gewählt, um neben der über *Southern Blot* nachgewiesenen Deletion auch eine physiologische Auswirkung sichtbar zu machen. Durch die Deletion ist der Stamm nicht mehr befähigt Mannitol als C-Quelle zu nutzen, da es keine alternativen, aktiven Enzyme gibt, die diese Rolle übernehmen können (Peters *et al.* 2013).

Die erfolgreiche Erzeugung einer weiteren Deletionsmutante in ATCC 621H weist auf die einfache Anwendbarkeit des Systems in anderen Stämmen hin. Im Gegensatz zu den häufig für einen bestimmten Stamm entwickelten Methoden handelt sich hierbei um ein Deletionssystem mit breiteren Anwendungsmöglichkeiten. Neben den Vorteilen der Anwendung in verschiedenen, teils zuvor unmodifizierbaren Stämmen vereint das System noch verschiedene weitere

Vorzüge. Durch die markerfreie Deletion wird die Gefahr von entstehenden polaren Effekten grundsätzlich vermieden. Die Konstruktion von Mehrfachmutanten ist möglich, da die begrenzte Anzahl an Resistenzkassetten bedeutungslos ist. Ein Schema der allgemeinen Funktionsweise ist in Abbildung 49 dargestellt.



**Abbildung 49: Schematische Darstellung der allgemeinen Funktionsweise des *cod* Deletionssystems.** Der Deletionsvektor pKOS6bΔZielgen enthält die obere und untere Flanke des zu deletierenden Bereichs. Nach erfolgreicher Integration des Vektors über homologe Rekombination ins Zielgenom (a) wird durch das Gegenselektionsmittel FC auf Mutanten selektiert bei denen der Deletionsvektor erneut das Genom verlassen hat. Durch Kolonie PCR wird dabei zwischen Revertanten zum Wildtyp und den tatsächlichen Mutanten (b), bei denen das Zielgen durch die zweite Rekombination entfernt wurde, unterschieden.

### 1.3 Einfluss von *codB* auf das *cod* Deletionssystem

In allen bisher entwickelten Deletionssystemen, welche die *E. coli* K12 Cytosin Deaminase als Gegenselektionsmarker nutzen, wurde die Cytosin Permease (*codB*) niemals in die Deletionsvektoren miteingebaut (Dubeau *et al.* 2009, Orr *et al.* 2012, van der Geize *et al.* 2008). Die Rolle von *codB* im Zusammenhang mit der Wirkung von FC als Gegenselektionsmittel wurde vor dieser Studie interessanterweise nie näher analysiert. Eine Untersuchung in der humanpathogenen Hefe *Candida lusitanae* führte eine auftretende Resistenz gegen das Antimycotikum FC auf eine defekte Purin- Cytosin Permease zurück (Noel *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Einbeziehung von *codB* als entscheidend für die Funktionalität des Deletionssystems in Essigsäurebakterien. Die Konstruktion von zwei fast identischen integrierenden Vektoren, einer mit der gesamten *cod* Kasette, der zweite nur mit *codA*, ermöglichte es die Wirksamkeit von FC als Gegenselektionsmittel im direkten Vergleich zu testen. Wie in Tabelle 6 ersichtlich gab es enorme Unterschiede zwischen den zwei Vektoren. Die minimale Hemmkonzentration von FC stieg in den Zellen mit dem integrierten, *codB* freien Vektor beinahe um das zehnfache an. Die *codB* kodierte Cytosin Permease erleichtert offensichtlich die Aufnahme von FC in die Zelle. Die Cytosin Permease aus *E. coli* spielt daher wohl eine ähnliche Rolle wie in Hefen, wo sie für den aktiven Transport von Cytosin in die Zelle zuständig ist (Wagner *et al.* 2001). Die bei 500 µg / ml FC einsetzende wachstumshemmende Wirkung in den Zellen mit *codB* freiem Vektor, weist auf eine Permeabilität der Membranen für FC erst bei relativ hohen Konzentrationen hin. Der Einbezug von *codB* ins System drückte die MHK auf Werte unter 60 µg / ml und erleichterte die Gegenselektion dadurch entscheidend. Durch die Expression von *codB* in Kombination mit *codA* wird die Anwendung der FC-Gegenselektion damit in einer Vielzahl von weiteren Bakterien möglich. Die Nutzung des Gegenselektionsmittels FC war bisher, vor allem in Mikroorganismen mit schwachen Cytosin Transportsystemen, die trotz integriertem Vektor eine FC Resistenz bis zu höheren Konzentrationen aufwiesen, nur schwer möglich. Diese Einblicke können zur Lösung dieses Problems beitragen und bereits funktionierende Systeme durch den Einbezug von *codB* verbessern, sowie ihre Effizienz deutlich steigern.

### 1.4 Einfluss des Suizidvektors auf die Funktionalität des Deletionssystems

Die Verwendbarkeit eines replizierenden Plasmids erhöht die Transformationseffizienz für einen Vektor stark, da es nicht erst zu einem Rekombinationsereignis mit Integration ins Genom kommen muss, um die Persistenz des Plasmids in der Zelle zu gewährleisten. Die Idee war also ein Plasmid zu schaffen, welches leicht transformierbar ist, sich in der Zelle vervielfacht und

dann in eine der homologen Flanken über Rekombination integriert. Der in den Experimenten eingesetzte replizierende Vektor pKOS7b war keinem hohen Druck ausgesetzt ins Genom zu integrieren, um in der Zelle zu überleben. Aufgrund der hohen Anzahl an Replikaten des Vektors sollte es aber trotzdem relativ leicht zu einer Integration ins Genom kommen. Die in Abbildung 18 gezeigten PCR Banden lassen allerdings auf mehrfache Rekombinationsereignisse der Vektoren in die homologen Bereiche des Genoms schließen. Das Einleiten einer zweiten Rekombination war unter diesen Bedingungen nicht möglich. Alle Versuche eine Zelle zu selektieren, in der kein Vektor mehr enthalten war und somit keine Sensitivität für FC bestand, schlugen fehl. Die Verwendung eines replizierenden Vektors für das *cod*-Deletionssystem brachte daher keine Steigerung der Effizienz mit sich, eine Deletion war nicht durchführbar. Aus diesen Gründen war die Wahl von pAJ63a als parentalen Vektor des Deletionsvektors pKOS6b für das Deletionssystem optimal, da es sich um ein Plasmid handelt, das in *G. oxydans* nicht zur Replikation befähigt ist (Daten nicht gezeigt). Wie schon in anderen Studien gezeigt wurde (van der Geize *et al.* 2008), ist ein solcher Suizidvektor dem starken Druck ausgesetzt sich sofort ins Genom zu integrieren, falls homologe Flanken dafür vorhanden sind. Mehrfache Rekombinationen von pKOS6b wurden nie beobachtet, daher konnte davon ausgegangen werden, dass immer nur ein Plasmid pro Zelle in den Integrierten vorhanden ist. Dadurch war es möglich das zweite Rekombinationsereignis, die erneute Exzision des Vektors mit oder ohne Zielgen, mit dem Gegenselektionsmittel problemlos nachzuweisen. Demzufolge ist der Einsatz eines Suizidvektors für die Funktionalität des Deletionssystems fundamental.

### 1.5 Etablierungsmöglichkeiten in weiteren Essigsäurebakterien

Die erfolgreichen Konstruktion von Deletionsmutanten in den beiden *G. oxydans* Stämmen stellt eine vielversprechende Grundlage für eine Anwendung in weiteren Essigsäurebakterien dar. Die entscheidende genetische Grundvoraussetzung ist hierbei das Vorhandensein einer Uracil Phosphoribosyl Transferase (*upp*) und das Fehlen einer *codA* ähnlichen Cytosin Deaminase. Diese Überprüfung konnte in einem ersten Schritt anhand vorhandener Sequenzdaten erfolgen und wurde nach der Vorauswahl geeigneter Stämme in einem Testansatz zur Bestimmung der MHK von FC bestätigt. Wie die durchgeführten Versuche zeigten, schließt das Vorhandensein einer Cytosin Deaminase per se noch nicht die Anwendbarkeit des Systems aus. Die in den getesteten Essigsäurebakterien nachgewiesene Cytosin Deaminase wies eine sehr geringe Ähnlichkeit zu der aus *E. coli* K12 auf (Tabelle 8) und führte auch bei höheren Konzentrationen FC zu keiner messbaren Wachstumshemmung (Tabelle 9). Die aus *E. coli* bekannte Cytosin Deaminase (*codA*) schien, im Gegensatz zu der in einigen Essigsäurebakterien

vorkommenden Cytosin Deaminase, eine sehr hohe Affinität zum eingesetzten FC Analogon zu besitzen. Dies deutete vermutlich auf eine geringere Substratspezifität der in *codA* codierten Cytosin Deaminase hin.

Das Vorhandensein des *upp* Gens ist hingegen unabdingbar für das Deletionssystem. Dieses Gen scheint in Essigsäurebakterien in konservierter Form vorzuliegen, in allen getesteten Stämmen konnte es nachgewiesen werden und wies stets eine hohe Ähnlichkeit zum als Referenz verwendeten *upp* aus *G. oxydans* ATCC 621H auf (Tabelle 7). Die in Tabelle 10 aufgeführten minimalen Hemmkonzentrationen für FU bestätigten zudem die effiziente Umsetzung des eingesetzten fluorierten Analogons FU. Diese Ergebnisse weisen auf eine breite Applikationsmöglichkeit des Systems nicht nur innerhalb der Gattung *Gluconobacter*, sondern innerhalb der gesamten Familie der Acetobacteraceae hin. Neben der Kerngruppe der Essigsäurebakterien, zu denen *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia* und *Granulibacter* (Greenberg *et al.* 2006, Sievers & Swings 2005) zählen, könnte das System auch in von der Kerngruppe weiter abseits stehenden Gattungen wie *Acidiphilium* eingesetzt werden (Abbildung 19).

Im Rahmen der Arbeit konnte somit ein neues *codA* / *codB* basiertes markerfreies Deletionssystem für Acetobacteraceae entwickelt werden, welches für die gezielte Genommodifikation (Deletionen ohne Einfluss auf den Leserahmen, Genaustausch bzw. Geninsertionen) in den WT Stämmen verschiedener Gattungen eingesetzt werden kann. Im Hinblick auf die stark zunehmende Anzahl sequenzierten Genomen aus der Familie der Acetobacteraceae sowie auf die wachsende biotechnologische Bedeutung der Gruppe, eröffnet dieses effiziente Deletionssystem eine Vielzahl an neuen Forschungsmöglichkeiten sowie Möglichkeiten zur Modifikation von Genomen zur Verbesserung biotechnologischer Anwendungen.

## 2. Untersuchung der Wachstumscharakteristiken von *G. oxydans* DSM 3504

Wie bereits Junker (2009) zeigen konnte, handelt es sich bei *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 3504 genotypisch betrachtet, um sehr ähnliche Stämme. Phänotypisch unterscheiden sie sich allerdings erheblich in Bezug auf die gebildete Biomasse; während ATCC 621H nur sehr geringe Biomassemengen produziert, erreicht DSM 3504 mehr als doppelt so hohe Werte (Elfari *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurde deshalb nach den Gründen für diese eklatanten Unterschiede zwischen den zwei Stämmen gesucht. In den 345 ORF's, die ausschließlich in DSM 3504 vorkommen, wurden einige Gene untersucht, die in mehreren Kopien im Genom vorliegen und von denen man theoretisch eine Beeinflussung der Wachstumsrate erwarten konnte.

### 2.1 Einfluss der *ndh* Deletion auf das Wachstum von *G. oxydans*

Das in der DSM 3504 Mutante deletierte Gen *ndh* (GLS\_c05650) kodiert für eine zusätzliche Klasse II NADH Dehydrogenase (NDH-2). Das Enzym katalysiert die Konversion von NADH zu NAD<sup>+</sup> und transferiert hierbei Elektronen von NADH auf Ubichinon (Friedrich & Scheide 2000, Jaworowski *et al.* 1981). Klasse II NADH Dehydrogenasen spielen eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Elektronen für die Atmungskette, die letztendlich zur ATP Synthese führen. Die Klasse II Enzyme besitzen keine protonenpumpenden Eigenschaften, es wird daher kein Protonengradient wie bei den Klasse I Enzymen aufgebaut (Cava *et al.* 2004).

Sämtliche durchgeführten Untersuchungen wiesen auf einen deutlichen Rückgang der Biomasseproduktion im  $\Delta ndh$  Stamm im Vergleich zum WT hin (III.2.7 und 2.8). Alle Parameter, darunter OD<sub>600</sub>, Streulicht, OTR / CTR, NADH / FAD sowie die Mannitol- / Fruktoseverbrauchsrate verzeichneten signifikante Rückgänge (Abbildung 27 und Abbildung 28), was auf einen eindeutigen Einfluss der zusätzlichen NADH Dehydrogenase (NDH-2) auf das Wachstumsverhalten hinweist. Das Fehlen des Enzyms wurde offenbar nicht vollständig von der zweiten, noch vorhandenen Klasse II NADH Dehydrogenase (GLS\_c17910) im Genom kompensiert. Vergleiche mit anderen Organismen zeigen, dass eine Vielzahl an Prokaryoten zwei NADH Dehydrogenasen in ihren Genomen besitzen (Calhoun & Gennis 1993, Leif *et al.* 1995), die Hintergründe und der Nutzen dieser Tatsache sind allerdings bisher nicht näher untersucht worden.

Die NADH Dehydrogenase kann in *Gluconobacter* als eine von mehreren Eintrittsstellen der Elektronen in die Atmungskette gesehen werden, alternativ dazu werden Elektronen über die zahlreichen membranständigen Dehydrogenasen in die Elektronentransportkette geschleust



(Ehrenreich *et al.* 2005, Matsushita *et al.* 1987). Das in den Versuchen verwendete Substrat Mannitol wird wie Peters *et al.* (2013) für ATCC 621H zeigen konnte, mit großer Wahrscheinlichkeit auch im Stamm DSM 3504 ausschließlich über die aus zwei Untereinheiten bestehende membrangebundene Polyol Dehydrogenase (GLS\_c09380 / GLS\_c09390) zu Fruktose verstoffwechselt. O<sub>2</sub> wird wegen des Elektronenflusses in die Atmungskette dabei verbraucht, aber CO<sub>2</sub> wird in diesem Schritt keines gebildet. Dieser Effekt ist etwa in Abbildung 27 dafür verantwortlich, dass die OTR in den ersten 7 h der Kultur größer ist als die CTR. Die CTR gibt dabei die Geschwindigkeit der CO<sub>2</sub> Bildung, die OTR die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs der Zellen an. Es kommt bei der Oxidation von Mannitol durch die membranständige Polyol-DH zu keiner Assimilation von Kohlenstoff. Die Oxidation des Substrats liefert ausschließlich Elektronen für die Energieproduktion. Zellmasse wird hierbei nicht gebildet. Erst die in diesem Schritt gebildete Fruktose wird als Substrat aufgenommen und dient nun unter CO<sub>2</sub>- und Acetatbildung auch der Produktion von Zellmasse (Peters *et al.* 2013, Voss *et al.* 2010). Nach dem Verbrauch des Mannitols ist dies ausschließlich der Fall, was ab diesem Zeitpunkt (gestrichelte vertikale Linie in Abb. 26) zu einer Übereinstimmung von OTR und CTR führt. Die Verwertung von Fruktose kann bei *Gluconobacter* nicht über den EMP ablaufen, da dem Organismus ein essentielles Enzym, die Phosphofruktokinase, fehlt (Junker 2009). Ein Fruktose verwertendes, membrangebundenes Enzym konnte bisher nicht aufgefunden werden, der Abbau der Fruktose muss deshalb in DSM 3504 über den nicht oxidativen Teil des PPP erfolgen.

Es zeichnen sich daher zwei Stoffwechselabschnitte in den Ergebnissen der Studie ab: Mannitol wird unter O<sub>2</sub> Verbrauch und ohne CO<sub>2</sub> Bildung durch die membranständige Polyol Dehydrogenase zu Fruktose umgesetzt, bis es aufgebraucht ist. Im Anschluss beginnt der zweite Abschnitt mit der Assimilation der gebildeten Fruktose unter O<sub>2</sub> Verbrauch und CO<sub>2</sub> Bildung, die letztendlich zur Synthese von Zellmasse führt (siehe starken Anstieg in Streulichtmessungen Abbildung 27). Die Bildung von Zellmasse wäre durch die alleinige Aktivität der Polyol Dehydrogenase nicht möglich, da dadurch nur die Elektronenübertragung vom Substrat über die Transportkette auf den terminalen Akzeptor O<sub>2</sub> stattfindet. Durch die Metabolisierung der Fruktose wird NADH gebildet und dieses wird über die NADH Dehydrogenasen wieder zu NAD<sup>+</sup> oxidiert, es kommt dadurch auch hier zu einem Elektronenfluss in die Atmungskette. Der Übergang zwischen den beiden Stoffwechselabschnitten wurde in den Abbildungen zur Veranschaulichung mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet (III.2.8). Zur Vereinfachung wird nachfolgend die Bezeichnung Abschnitt 1 für den Zeitraum der Mannitolverwertung und Abschnitt 2 für den Zeitraum nach dem Umschalten auf eine Fruktose Assimilation verwendet.

Der Sauerstoffverbrauch in DSM 3504 WT (Abbildung 27) steigt zusammen mit der Zellmasse kontinuierlich an. Die OTR ist in Abschnitt 1 höher als die CTR, im Vergleich zu Abschnitt 2 ist der OTR Wert allerdings verhältnismäßig niedrig. Dies zeigt, dass der Hauptteil der Elektronen über NADH in die Elektronentransportkette geschleust wird, die Polyol Dehydrogenase trägt nur in geringem Maße zum Gesamtflux durch die Transportkette bei (die integrale OTR steigt erst in Abschnitt 2 stark an). Sobald Mannitol verbraucht ist, steigen sowohl OTR wie CTR stark an, es gibt aber keine Differenz mehr zwischen den Werten wie in Abschnitt 1. Die hohe CO<sub>2</sub> Bildung weist auf die verstärkte Bildung von Biomasse hin, was auch anhand der Streulichtmessungen sichtbar wird. Nach etwa 13 h scheint der Hauptteil der Fruktose verbraucht zu sein, CO<sub>2</sub> Bildung und O<sub>2</sub> Verbrauch brechen ein, der Elektronenfluss durch die Atmungskette versiegt (integrale OTR bleibt konstant). Der starke Anstieg der Biomasse in Abschnitt 2 verlangsamt sich deutlich, Zellbestandteile wie NADH / FAD nehmen nicht mehr zu, der weitere, leichte Anstieg in der Streulichtmessung ist eventuell auf eine Veränderung der Zellmorphologie zurückzuführen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der lösliche Stoffwechsel in DSM 3504 zwar in beiden Abschnitten aktiv ist, wenngleich die Aktivität in Abschnitt 2 stark zunimmt. Große Mengen an NADH werden durch die starke Oxidation der Fruktose über den löslichen Stoffwechsel gebildet, die NADH Dehydrogenasen können dadurch große Mengen an Elektronen in die Atmungskette leiten. Die wichtige Rolle der NADH Dehydrogenasen im Zusammenhang mit einer hohen Biomassebildung liegt demnach auf der Hand.

Der Stamm ATCC 621H bildet im Vergleich zu DSM 3504 deutlich weniger Zellmasse (Abbildung 32 A, B, C), auch Zellbestandteile wie NADH / FAD nehmen nur langsam zu. In Abschnitt 1 wird sehr viel mehr O<sub>2</sub> verbraucht als CO<sub>2</sub> gebildet, die Polyol Dehydrogenase ist also sehr aktiv. Der Fluss durch die Elektronentransportkette nimmt während der Inkubationszeit langsam, aber stetig zu (integrale OTR). Der Elektronenfluss steigt aber in Abschnitt 2 weniger an, dies zeigt, dass die meisten Elektronen von der Polyol Dehydrogenase in die Atmungskette fließen und nur wenige von NADH und der NDH kommen. In Abschnitt 2 beginnt die Metabolisierung der Fruktose über den löslichen Stoffwechsel, OTR und CTR laufen wieder gleich, sinken aber auf ein niedrigeres Niveau als in Abschnitt 1. Fruktose wird hier also nur sehr langsam vom löslichen Stoffwechsel verwertet, auch nach dem Abflachen der Wachstumskurve enthält das Medium noch eine hohe Konzentration an nicht verwerteter Fruktose. Der Stamm kann die Fruktose nicht sehr effizient umsetzen, die Biomasse bleibt gering, da sie vor allem durch den löslichen Stoffwechsel aufgebaut wird, der wie in Abschnitt 2 ersichtlich nicht sehr viel Substrat umsetzt. Dies deckt sich auch mit bereits bekannten Beobachtungen der geringen

Biomasseproduktion von ATCC 621H, die sich, wie schon Prust *et al.* (2005) postuliert hatte, aufgrund der äußerst aktiven membranständigen Dehydrogenasen ergibt.

In DSM 3504  $\Delta ndh$  (Abbildung 28) ist die Differenz zwischen  $O_2$  Verbrauch und  $CO_2$  Bildung größer als im WT. Das lässt sich damit erklären, dass bedingt durch die Deletion einer der beiden NDH mehr Elektronen über die Polyol DH in die Atmungskette geschleust werden. Die membranständige Polyol Dehydrogenase und die NDH scheinen um die Einspeisung von Elektronen in die Atmungskette zu kompetieren und durch den Verlust einer NDH kommt es daher zu einer verstärkten Aktivität der Polyol DH. Die Biomasse und der Fluss durch die Elektronentransportkette nehmen gleichmäßig zu, in Abschnitt 2 gleichen sich OTR und CTR wieder aneinander an, sie erreichen aber bei weitem nicht die Werte des WT. Der schwächere Elektronenfluss (integrale OTR) über die NDH geht einher mit einem geringeren Verbrauch an Fruktose. Weniger Zellbestandteile (NADH / FAD) wie auch Zellmasse werden gebildet. Der Stamm kann also, durch den Verlust einer NDH, Fruktose wesentlich schlechter über seine cytoplasmatischen Enzymsysteme oxidieren. Das gebildete NADH wird langsamer oxidiert. Die Elektronen können also von der verbleibenden NDH nicht so effizient in die Elektronentransportkette eingeschleust werden. Die um die Elektronentransportkette konkurrierende Polyol DH kann hingegen aktiver sein, solange Mannitol verfügbar ist. Besonders gut verdeutlicht wird dieses Prinzip durch ATCC 621H mit seinen hochaktiven membranständigen Dehydrogenasen und nur einer, offensichtlich nicht sehr aktiven NDH. Der Besitz einer zweiten NDH ermöglicht einem *Gluconobacter* Stamm daher besser mit den membrangebundenen DH zu konkurrieren und eine effizientere Nutzung vom anfallenden NADH für den Energiegewinn wird ermöglicht. Das  $NAD^+$  Recycling ermöglicht außerdem, dass die Assimilation von Fruktose mit hoher Effizienz erfolgen kann, woraus letztendlich die Zellmasse gebildet wird. Ergänzend zu den Daten der  $\Delta ndh$  Mutante und der WT Stämme liefert auch die Überexpression einer zweiten NDH in ATCC 621H interessante Einblicke (Abbildung 32 D, E, F).  $O_2$  Verbrauch und  $CO_2$  Bildung laufen hier bereits in Abschnitt 1 parallel mit höheren Werten als im WT. Der hohe Flux an Elektronen durch die Transportkette entsteht wahrscheinlich durch ein starkes einschleusen von Elektronen aus NADH in die Elektronentransportkette. Es kommt zu einer starken Zellmassebildung und hohen NADH / FAD Werten (Zellbestandteile). Fruktose wird mit enormer Geschwindigkeit assimiliert, es kommt zu keinerlei messbarer zwischenzeitlicher Akkumulation im Medium. Das limitierende Enzym ist wahrscheinlich die Polyol DH, die in Anbetracht der hohen NDH Aktivität ihre Elektronen nicht so effizient in die Elektronentransportkette einschleusen kann. Aus diesem Grund wird Mannitol bis zum Ende der Messung nicht vollständig verbraucht. Auch hier zeigt sich also, je besser die Elektronen über NADH in

die Atmungskette geleitet werden, desto geringer ist die Aktivität der Polyol DH, die ihre Elektronen durch die Konkurrenz vergleichsweise langsamer einschleusen kann. Die effizientere NADH Regeneration beschleunigt außerdem die Verwertung von Fruktose und führt zu einer stärkeren Bildung von Biomasse.

Das Wachstum auf Glucose wird von der *ndh* Deletion, wie in Abbildung 26 ersichtlich, weniger stark beeinflusst. Es gibt kaum Unterschiede in der OD<sub>600</sub> am Ende der 30 h Inkubationszeit. Auffallend ist der kurze Abfall der OD Werte in allen DSM 3504 Stämmen nach 6 h Inkubationszeit. *Gluconobacter* besitzt verschiedene Möglichkeiten zur Assimilation von Glucose: Die membranständige Glucose DH, die Glucose direkt zu Gluconat umsetzt und die cytoplasmatische NADP<sup>+</sup> abhängige Glucose Dehydrogenase, die ebenfalls Gluconat bildet (Voss 2009). Das im löslichen Stoffwechsel produzierte Gluconat kann in der Folge nach der Phosphorylierung in den PPP bzw. EDP eingespeist werden. Das periplasmatisch gebildete Gluconat kann dagegen von einer Reihe weiterer membranständiger DH weiteroxidiert werden (Matsushita *et al.* 2003, Matsushita *et al.* 1994). Wie Krajewski *et al.* (2010) für *G. oxydans* N44-1 zeigen konnte, wird nur ein geringer Teil der Glucose über den löslichen Stoffwechsel assimiliert. Hohe Konzentrationen an Gluconat häufen sich an, dies führt zu einem starken pH Abfall im Medium und zu einer Hemmung des Zellwachstums. Die meisten Elektronen laufen von den membranständigen DH in die Atmungskette, wobei allerdings keine Biomasse gebildet wird. Ein weiterer Grund für die allgemein geringere Biomassebildung auf Glucose könnte die höhere Oxidationsstufe im Vergleich zu Mannitol sein. Der kurzzeitige Abfall der OD<sub>600</sub> bei den DSM 3504 Stämmen könnte mit einer vorübergehend stärkeren Akkumulation von Gluconat mit entsprechenden negativen Auswirkungen auf das Wachstum erklärt werden. Elfari *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Stämme mit hoher Gluconat Akkumulation eine signifikant geringere Biomasse erreichen, als Stämme mit einer geringen Akkumulation. Offenbar sind im Falle der Gluconatverwertung die membranständigen DH wesentlich aktiver und die zusätzliche NDH reicht nicht aus, um mehr Elektronen über NADH in die Atmungskette zu leiten, wie es bei der Mannitolverwertung der Fall war. Die Situation ändert sich allerdings in der ATCC 621H NDH-2 Überexpressionsmutante (Abbildung 33). Durch die höhere Kopienanzahl von  $26 \pm 6$  (Kallnik *et al.* 2010) des Plasmids mit dem *ndh* Gen und der daraus folgenden stärkeren Expression der NDH-2, können diese nun deutlich besser um die Elektronentransportkette konkurrieren und schaffen es mehr Elektronen einzuspeisen. Die signifikant höhere Biomasseproduktion weist auf eine stärkere Assimilation der Glucose über den löslichen Stoffwechsel hin. Auch hier wird deutlich, dass eine starke Erhöhung der NDH Aktivität wahrscheinlich eine Substratoxidation durch die membranständigen Enzyme reduziert, so dass mehr

Glucose über den löslichen Stoffwechsel abgebaut werden kann und zur Biomassebildung führt. In Abbildung 50 ist eine Übersicht des Zentralstoffwechsels am Beispiel ATCC 621H, zur besseren Veranschaulichung dargestellt.

Durch die Studie konnte gezeigt werden, dass eine oder mehrere zusätzliche NADH Dehydrogenasen einen förderlichen Effekt auf die Bildung von Zellmasse haben. Dies war beim Wachstum auf Mannitol besonders deutlich erkennbar. Auch beim Wachstum auf Glucose wird der Effekt bei der Überexpressionsmutante sichtbar. Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund interessant, dass eine Untersuchung in *Corynebacterium glutamicum* gezeigt hat, dass die Überexpression von NDH einen negativen Effekt auf das Wachstum hatten (Nantapong *et al.* 2004). Diese Einblicke können bei den Versuchen die Biomasseproduktion in *Gluconobacter* und anderen Essigsäurebakterien zu steigern, von großem Nutzen sein. Die industrielle Anwendung vieler Essigsäurebakterien ist vor allem durch das Problem der geringen Produktion von Zellmasse, die sich direkt auf die Rentabilität vieler Prozesse auswirkt, stark eingeschränkt. Es wäre denkbar die Überexpression der NDH nicht nur durch einen Expressionsvektor durchzuführen, sondern auch durch Geninsertionen an verschiedenen Stellen im Genom. Damit könnte auch das Problem der Antibiotikaselektion von Stämmen mit Expressionsvektoren umgangen, sowie eine übermäßige Expression der NDH vermieden werden. Der Grat zwischen einer Steigerung der Biomasse und dem Aufrechterhalten der hohen Aktivität der membranständigen DH ist vermutlich sehr schmal. Es ist denkbar, dass eine übertriebene Steigerung des löslichen Stoffwechsels, der zu mehr Zellmasse führt, auf der anderen Seite die Aktivität membrangebundener DH herabsetzt. Andererseits kann eine wesentlich höhere Zellmasse insgesamt auch mehr Substrat umsetzen und in der Summe trotzdem mehr vom gewünschten Produkt erzeugen, als ein Stamm mit sehr geringer Zellmasse und etwas höherer Aktivität von membranständigen DH. Der Einsatz zusätzlicher NDH mit entsprechender Steigerung der Biomasseproduktion ist daher vom jeweiligen Anwendungsbereich abhängig und sollte individuell für jeden Prozess abgewogen und untersucht werden. Nichtsdestotrotz stellen die Ergebnisse der Studie einen weiteren wichtigen Schritt zum Verständnis des komplexen Verhältnisses zwischen löslichem und membranlokalisiertem Stoffwechsel in *G. oxydans* dar.

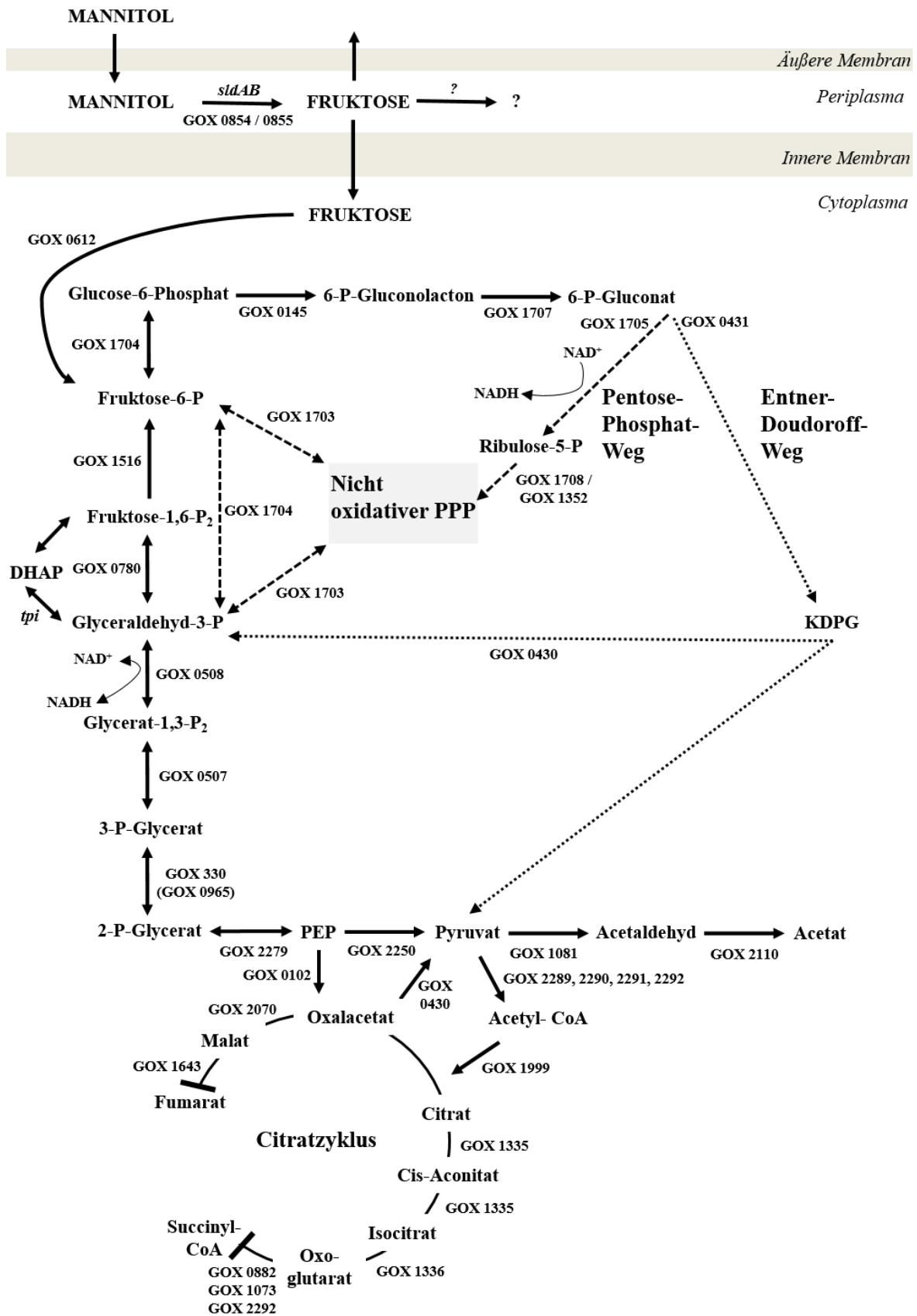
## **2.2 Einfluss der *tpiA* Deletion auf das Wachstum von DSM 3504**

Das Gen *tpiA* kodiert für eine Triosephosphat Isomerase (TPI), die in DSM 3504 zusammen mit zwei weiteren TPI vorkommt. Die TPI ist ein glycolytisches Enzym, welches die reversible Konversion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerinaldehyd 3-phosphat (GAP) ka-

talysiert (Knowles 1991). Aufgrund der Tatsache, dass die TPI als sehr effizientes und hochaktives Enzym gilt (Rose *et al.* 1990), erscheint es erstaunlich, dass das Gen in drei Kopien in der Zelle vorkommt.

Die Wachstumsleistung des DSM 3504  $\Delta tpiA$  Stamms lag unter den Werten des WT (III.2.9). Die OTR und CTR verhält sich wie beim WT allerdings auf leicht niedrigerem Level. Ebenso wird weniger Zellmasse als im WT gebildet. Das langsamere Wachstum deutet auf einen Engpass beim Kohlenstofffluss durch den löslichen Stoffwechsel an der TPI hin. Der exakte Grund dafür ist aufgrund der hohen Effizienz der TPI allerdings unklar. Möglicherweise erleichtern mehrere TPI die Reaktion von DHAP zu GAP. Es ist anzunehmen, dass Fruktose 1,6-bisphosphat aufgrund der fehlenden Phosphofruktokinase aus GAP gebildet wird, dies dient möglicherweise biosynthetischen Zwecken. Aus thermodynamischer Sicht liegt das Gleichgewicht der Reaktion von Fruktose 1,6-bisphosphat zurück zu DHAP und GAP zwar in einem Verhältnis von 20:1 bei DHAP, allerdings läuft die Konversion über die TPI mit hoher Geschwindigkeit ab, die einzige Limitierung stellt dabei die Substrat Diffusionsrate dar. Denkbar wäre deshalb, dass es sich um ein Regulationsphänomen der Isoenzyme handelt. Eine weitere Möglichkeit, welche die verschiedenen TPI erklären könnte wäre eine leicht abweichende Substratspezifität der unterschiedlichen TPI Isoenzyme im Organismus.

Eine Doppelmutante mit Deletionen der *ndh* und *tpiA* wurde erzeugt, um die kombinierten Effekte der einzelnen Mutationen in einem einzigen Stamm zu untersuchen. In allen gemessenen wachstumsrelevanten Parametern war ein leichter Rückgang im Vergleich zum  $\Delta ndh$  Stamm feststellbar. Der kombinierte Effekt der *ndh* und *tpiA* Deletion im Vergleich zu den WT und Einfachmutanten konnte deutlich sichtbar gemacht werden (III.2.10). Dies widerlegte nebenbei auch die vorher nicht erklärbare Diskrepanz der Biomassewerte aus der Streulichtmessung und der OD<sub>600</sub> des DSM 3504  $\Delta tpiA$  Stamms (Abbildung 31 C). Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine Kontamination in einer der BioLector-Kulturen gewesen sein. Bei den Messdaten in der Doppelmutante waren keine Unstimmigkeiten zwischen Streulicht und OD<sub>600</sub> feststellbar. Trotzdem ist der Einfluss der *tpiA* auf die Produktion von Biomasse insgesamt als eher gering zu werten, auch eine von Junker (2009) durchgeführte Studie zur Überexpression der *tpiA* aus DSM 3504 in *G. oxydans* ATCC 621H führte zu keiner messbaren Steigerung der gebildeten Zellmasse.



**Abbildung 50:** Vereinfachter schematischer Überblick des Zentralstoffwechsels von *G. oxydans* ATCC 621H. Die in dieser Studie als besonders relevant erachteten Enzyme sind an entsprechender Stelle eingezeichnet. Die Abbildung ist an das von Richhardt *et al.* (2012) publizierte Schema zum Mannitolstoffwechsel in *G. oxydans* angelehnt.

### 3. Untersuchung von Restriktionssystemen in *G. oxydans*

In dieser Arbeit wurde in den Genomen von *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 3504 nach potentiellen Restriktionssystemen gesucht, welche u. U. die Transformation und Konjugation der Zellen erschweren und damit die Effizienz der entwickelten Deletionssysteme beeinträchtigen. Die Transformation von Bakterien mittels Elektroporation ist eine schnelle und einfache Methode, um Plasmide in Zielorganismen zu transferieren. Die zellulären Restriktionssysteme können hierbei ein beträchtliches Hindernis darstellen und die Effizienz der Methode so stark herabsetzen, dass keine Transformation möglich ist. Aus nicht näher untersuchten Gründen scheint die Konjugation weniger stark vom Vorhandensein aktiver Restriktionssysteme beeinflusst zu werden als es bei der Elektroporation der Fall ist (Daten nicht gezeigt). Es konnte bisher für verschiedene Stämme von Mikroorganismen gezeigt werden, dass der Verlust von Restriktionssystemen die Transformationseffizienz durch Elektroporation stark erhöht (Liebl *et al.* 1989, O'Callaghan & Charbit 1990). Vor allem die Deletion der Typ I Restriktionssysteme erwies sich als besonders vorteilhaft, die Transformationseffizienz durch Elektroporation konnte z.T. bis zu 1000-fach erhöht werden (Keller *et al.* 2009, Waldron & Lindsay 2006, Waschkau *et al.* 2008).

In Essigsäurebakterien wurden vor dieser Studie kaum Untersuchungen zum Einfluss von Restriktionssystemen auf Transformationseffizienzen durchgeführt, obwohl in den Gensequenzen der meisten Arten mindestens ein Typ I System bzw. Typ II System oder auch beide gefunden werden können (Daten nicht gezeigt). Nach dem Auffinden der potentiellen Restriktionssysteme in den *G. oxydans* Stämmen ATCC 621H und DSM 3504 mittels ReBase wurden deshalb sowohl die Typ I wie Typ II Systeme ausgeschaltet und die Auswirkungen eingehend untersucht.

#### 3.3 Auswirkungen der Inaktivierung des Typ II Restriktionssystems in ATCC 621H

Die Deletion des Gens GOX 1507 (putative Restriktionsendonuklease), das zusammen mit GOX 1505 (putatives Modifikationsenzym) für ein potentielles Typ II Restriktion kodiert, wirkte sich nicht in signifikanter Form auf die Transformationseffizienz bzw. -frequenz des Stammes aus (III.3.5). Die Transformationseffizienz sagt aus, wie viele Transformanten pro eingesetzter Menge DNA aus einer Elektroporation hervorgehen, während die Transformationsfrequenz die Anzahl der Transformanten pro eingesetzter Zelle angibt. Es ist wichtig beide Werte zu bestimmen, da dadurch Aussagen zur eingesetzten Zellzahl sowie zur Fähigkeit der DNA Aufnahme generell möglich werden. So kann beispielsweise eine hohe Effizienz bei einer



geringen Frequenz zwar auf eine effiziente DNA Aufnahme hinweisen, allerdings muss dabei eine sehr hohe Zellzahl eingesetzt werden.

Wie in Tabelle 14 dargestellt, nahm die Effizienz um 6 % zu und die Frequenz um 11 % ab, diese Abweichungen bewegen sich im Rahmen der üblichen Standardabweichungen verschiedener Versuchsansätze. Auch in Abbildung 40 und Abbildung 41 wird deutlich, dass die Deletion kaum messbare Auswirkungen auf das Transformationsverhalten hat. Diese Tatsache ist verwunderlich, da auch bei den Typ II Systemen die Hauptfunktion darin liegt, die Zelle vor fremder DNA zu verteidigen (Pingoud & Jeltsch 2001). Eine mögliche Erklärung dafür könnte im verwendeten Testplasmid liegen. Wenn die spezifische Erkennungssequenz, die für das Restriktionssystem aus ATCC 621H gegenwärtig unbekannt ist, auf dem Plasmid nicht vorkommt, können Unterschiede zwischen Mutante und WT auch nicht festgestellt werden. Unter Umständen ist daher die verwendete Methode zur Bestimmung der Transformationseigenschaften an der Stelle zu ungenau. Andererseits würde ein Restriktionssystem mit einem eher seltenen Erkennungsmotiv ohnehin kaum Schwierigkeiten bei Transformationen mit sich bringen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Typ II System nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird, die in den Zellen nach der Elektroporation nicht gegeben waren. Aus der Literatur sind jedenfalls kaum Studien bekannt, in denen Deletionen eines Typ II Restriktionssystems sich förderlich auf die Transformationseigenschaften ausgewirkt haben. Der exakte Grund dafür bleibt vorerst ungeklärt.

Das Experiment konnte nicht in DSM 3504 durchgeführt werden, da in diesem Stamm kein Typ II System vorkommt.

### **3.4 Auswirkungen der Inaktivierung des Typ I Restriktionssystems in *G. oxydans***

Das auf dem chromosomalen Plasmid pGOX1 lokalisierte und aus den Genen GOX 2567, 2568, 2569 bestehende Restriktionssystem im Stamm ATCC 621H lässt sich aufgrund der drei vorhandenen Untereinheiten (R, M, S) dem Typ I zuordnen. Die Deletion führt sowohl zu einer Steigerung der Transformationseffizienz wie auch der Transformationsfrequenz (III.3.5). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei einer zeitgleich durchgeführten Studie von S. Bringer-Meyer am Forschungszentrum Jülich GmbH (persönliche Kommunikation) in einem Stamm mit einer alleinigen Deletion von GOX 2567 erzielt. Wie in Tabelle 14 dargestellt steigt die Effizienz um 78 % und die Frequenz um 61 % an. Trotz der messbaren Steigerung relativiert die hohe Standardabweichung bei der für den Deletionsstamm bestimmten Transformationseffizienz (Abbildung 40) das Ergebnis etwas. Eine Zunahme der Frequenz ist aber auch bei Einbezug der Standardabweichung signifikant. Die Steigerung ist allerdings im Vergleich zu der von Keller *et al.*

(2009) für *Desulfovibrio vulgaris* dokumentierten bis zu 1000 fachen Zunahme der Transformationseffizienz nur gering. Allerdings ist die Effizienz der Transformation in ATCC 621H im WT mit beinahe  $1 \times 10^3$  Transformanten / ng bereits relativ hoch, vermutlich sind die Restriktionssysteme in diesem Stamm von Grund auf nicht sehr aktiv. Dafür spricht auch die bisherige problemlose Verwendung des Stammes, auch ohne das vorherige Ausschalten von Restriktionssystemen konnte eine Vielzahl an Deletionen erfolgreich durchgeführt werden (Junker 2009, Peters *et al.* 2013).

Der stärkste Effekt auf das Transformationsverhalten konnte nach der Deletion der *hsdR* Untereinheit eines putativen Typ I Restriktionssystems in DSM 3504 beobachtet werden. Die Transformationseffizienz stieg in der Mutante um beinahe 400 % an, ebenso konnte bei der Frequenz der Transformation eine Zunahme von knapp 300 % beobachtet werden (Tabelle 14). Auffallend ist die in DSM 3504 WT wesentlich geringere Transformationseffizienz als in ATCC 621H WT. Offensichtlich ist das Restriktionssystem in DSM 3504 wesentlich aktiver, dies erklärt auch die Schwierigkeit den Stamm gentechnisch zu manipulieren. Vor der Etablierung des in dieser Arbeit entwickelten Deletionssystems war es nicht gelungen, Deletionen in diesem Stamm zu erzeugen. Auch bei der Anwendung des *cod* Deletionssystems konnte beobachtet werden, dass die Transformation des Stammes im Vergleich zu ATCC 621H allgemein schwieriger war (Daten nicht gezeigt). Durch die Deletion von *hsdR* erreicht DSM 3504 in etwa die Effizienzwerte von ATCC 621H WT, bei der Transformationsfrequenz wurden diese Werte sogar überschritten.

Der Einfluss der Typ I Restriktionssysteme auf die Transformationseigenschaften scheint je nach Stamm und Aktivität der Systeme unterschiedlich groß zu sein. Ein förderlicher Effekt der Inaktivierung der Typ I Systeme konnte allerdings bei beiden untersuchten Stämmen beobachtet werden. Der Grund für den wesentlich stärkeren Einfluss der Typ I Restriktionssysteme auf die Transformationseigenschaften der Stämme bleibt ungeklärt. Eine eventuelle Erklärung könnte in den unterschiedlichen Erkennungssequenzen der Systeme liegen. Die Typ I Systeme sind zudem dafür bekannt auch in relativ kurzen Zeitabschnitten neue Spezifitäten zu entwickeln, dies unterscheidet sie von den viel statischeren Typ II Systemen (Murray 2000). Diese Tatsache könnte zu einer höheren Anzahl an Restriktionen durch das Typ I System führen, die sich dann vermutlich auch durch einen stärkeren Einfluss auf die Transformationseffizienz bemerkbar machen.

Restriktionssysteme sowohl des Typs I wie auch des Typs II sind in Essigsäurebakterien weit verbreitet. In Anbetracht der Schwierigkeiten manche Stämme zu transformieren und molekular

larbiologisch zu bearbeiten sollte in Betracht gezogen werden, in einem ersten Schritt die vorhandenen Typ I Restriktionssysteme auszuschalten. Dadurch könnte zukünftig die Bearbeitung von bisher schwer zugänglichen Stämmen aus der Gruppe der Essigsäurebakterien erheblich erleichtert werden.

## 4. Etablierung eines Vektorbasierten Expressionssystems in *G. oxydans*

### 4.5 Konstruktion und Auswahl des Shuttlevektors

Die Anwendung des in dieser Arbeit konstruierten Vektors pKOS4beta als Shuttlevektor war trotz mehrfacher Versuche nicht möglich. Die Rekombination des *Gluconobacter ori*-Bereichs mit dem *ori* von pGOX3 war unvermeidbar und wurde mehrfach über einen Restriktionsverdau des in *E. coli* retransformierten und isolierten Hybrids nachgewiesen (Abbildung 43). Aus diesem Grund konnte der Vektor pKOS4beta auch ohne selektiven Druck nach mehrfachen antibiotikafreien Passagen noch problemlos nachgewiesen werden, das Hybrid aus pGOX3 und pKOS4beta scheint in derselben stabilen Form im Genom von ATCC 621H vorzukommen wie pGOX3 allein. Zhang *et al.* (2010) war es gelungen mit dem *ori* eines kryptischen Plasmids aus dem Genom *G. oxydans* DSM 2003 und pUC18 als Rückgrat, einen replizierenden *E. coli* – *Gluconobacter* Shuttlevektor zu konstruieren und ihn zur Expression eines Reporterproteins einzusetzen. Weshalb es in diesem Fall anscheinend zu keiner Rekombination mit dem kryptischen Plasmid kam, ist unbekannt. Möglicherweise ist das kryptische Plasmid des in dieser Arbeit verwendeten Stammes DSM 2003 weniger stabil und wurde in den zur Transformation verwendeten Zellen nicht repliziert. Der Versuch in ATCC 621H über eine Deletion des *par-rep* Bereichs den Verlust von pGOX3 zu forcieren schlug fehl. Die Funktionen des chromosomalen Plasmid sind weitgehend unbekannt, scheinen aber in diesem Stamm unter den getesteten Bedingungen essentiell für das Überleben zu sein. Der Versuch pKOS4beta in DSM 3504 zu transformieren, ein Stamm der über keine chromosomalen Plasmide verfügt, blieb erfolglos. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der eingesetzte Ori aus pGOX3 sehr stammspezifisch ist und zum anderen am aktiveren Restriktionssystem in DSM 3504. Nichtsdestotrotz konnte in der Arbeit erstmals ein chromosomales Plasmid von *G. oxydans* nach dem Einbau des pUC *ori* in *E. coli* replizieren und daraus isoliert werden. Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Untersuchung und Modifikation der kryptischen Plasmide. Es ist denkbar, dass das Hybrid mithilfe des kompletten pGOX3 *ori* auch in Stämmen repliziert, in denen keine kryptischen Plasmide natürlich vorkommen. Möglich wären daher auch Studien zum Transfer des isolierten Hybrids in weitere Essigsäurebakterien mit entsprechender Dokumentation der phänotypischen Veränderungen. Dies könnte zur Aufklärung der noch weitgehend unbekanntenen Funktion der chromosomalen Plasmide beitragen.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Anwendung von pKOS4beta wurde schließlich ein alternativer Shuttlevektor für die Funktion als Expressionsvektor konstruiert. Das bereits erfolgreich

für Expressionen in *Gluconobacter* eingesetzte Plasmid pJV17 (Voss 2009), ein pEXGOX Derivat (Schleyer *et al.* 2008), wurde als Rückgrat verwendet. Mit einer Kopienanzahl von  $23 \pm 6$  (Kallnik *et al.* 2010) liegt das Plasmid nur im mittleren Bereich. Um eine zu hohe Expression zu verhindern wurde der native Promotor der membranengebundenen ADH bestimmt und eingesetzt. Eine zu starke Expression membranständiger Proteine führte beispielsweise in einer Studie von Nannenga & Baneyx (2011) zu einem toxischen Effekt in *E. coli*. Die Maschinerie für den Export und die Insertion der Proteine in die Zellmembran schien ab einem gewissen Punkt überlastet zu sein. Durch die Bildung von *inclusion bodies* entstand schließlich der cytotoxische Effekt. Der Einsatz eines schwächeren Promotors bei der Expression konnte dieses Problem in dieser Studie schließlich lösen. Die bisherigen für *Gluconobacter* entwickelten Vektorsysteme nutzen meist Promotoren aus *E. coli* wie *tufB*, *tac* oder PL (Saito *et al.* 1997) bzw. den vielfach verwendeten *lac* Promotor (Tonouchi *et al.* 2003). Einige *Gluconobacter* eigene Promotoren wie der zu *E. coli* homologe *tufB* Promotor (Schleyer *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2010) oder der GDH Promotor (Merfort *et al.* 2006) wurden ebenso zur Überexpression von Proteinen in *G. oxydans* eingesetzt. Beide Promotoren sind allerdings bisher verhältnismäßig wenig untersucht worden. In einer Studie von Kallnik *et al.* (2010) wurden Promotoren von ribosomalen Genen (GOX 0264 und GOX 0452) in Expressionsvektoren zur Proteinproduktion eingesetzt. Im Gegensatz zu den vorherigen Arbeiten wurden hierbei auch die Promotorstärken näher charakterisiert. Der exakte Transkriptionsstartpunkt mit putativen Promotorbereichen wurde allerdings, wie bei den meisten bisher eingesetzten Promotoren, nicht näher experimentell bestimmt. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Kombination aus einem experimentell bestimmten nativen Promotor einer membranständigen DH und einem Plasmid mit geringer Kopienanzahl stellt daher eine vielversprechende Möglichkeit dar, um membranständige Dehydrogenasen zu produzieren und dabei zu hohe Expressionsraten zu vermeiden.

Es gibt bisher keine exakten Studien zu Sigma Faktoren und dazugehörigen Konsensussequenzen in *G. oxydans*, deshalb ist es nicht möglich nähere Aussagen zu Promotorregionen des in dieser Arbeit bestimmten ADH Promotors zu machen. Die meisten in *E. coli* vorkommenden Promotoren sind auf die -10 und -35 Region angewiesen, an diese Konsensussequenzen bindet der an die RNA Polymerase gebundene Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  (Singh *et al.* 2011). Eine TA-reiche Region in der -10 Region vor dem Transkriptionsstart konnte im ADH Promotor ausgemacht werden, die -35 Region wurde zwar eingetragen, entsprach aber nicht dem bekannten Motiv aus *E. coli* (Abbildung 45). Um detailliertere Aussagen zu Promotorregionen machen zu können, sind weitere Studien und Daten zu Promotoren in *G. oxydans* nötig.

#### 4.6 Erprobung des Expressionssystems

Wie die Auswertung der  $\beta$ -Galaktosidase Assays in Abbildung 47 zeigt, ist der native ADH Promotor in *E. coli* praktisch nicht aktiv. Diese Eigenschaft ist für ein Expressionssystem äußerst vorteilhaft, da die Aktivität in *E. coli* und die damit verbundene Expression membranständiger Proteine zu toxischen Effekten führen kann (Saida 2007). Die Klonierung kann somit problemlos in *E. coli* erfolgen. Der bereits vielfach verwendete Promotor von *tufB* aus *G. oxydans* zeigte ebenso keine Aktivität und wurde im Versuch zusammen mit einem Leervektor als Kontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle enthielt den nativen *lac* Promotor und zeigte wie erwartet sehr starke Aktivität im Assay. Beim Einsatz des Konstrukts mit dem ADH Promotor in *G. oxydans* wurden starke Aktivitäten sowohl auf Mannitol wie auch Glucose nachgewiesen. Dies deutet auf eine konstitutive Expression des Promotors auch bei verschiedenen Kohlenstoffquellen hin. Diese Ergebnisse belegen die Aktivität des experimentell bestimmten Promotors und die Funktionalität des für das System konstruierten Expressionsvektors. Die ebenso getesteten *tufB* und *lacZ* Promotor liegen in ihrer Aktivität erwartungsgemäß deutlich über dem ADH Promotor und sind dadurch für die geplante, möglichst native Expression membranständiger DH weniger geeignet.

Zur endgültigen Erprobung des Funktionsprinzips war allerdings die nachweisbare Expression einer membranständigen DH nötig. Dieser Nachweis wurde schließlich durch das von Markus Mientus durchgeführte Experiment der Komplementierung von *sldAB* in einem Multideletionsstamm erbracht. Der in dieser Arbeit bestimmte ADH Promotor in Kombination mit dem Expressionsvektor ist demzufolge bestens für die Expression membranständige DH in *G. oxydans* geeignet. Das Klonieren wird zudem durch die nicht nachweisbare Aktivität in *E. coli* erheblich erleichtert. In Anbetracht zahlreicher membranständiger Dehydrogenasen mit undefinierten Substratspektren im Metagenom von Essigsäurebakterien eröffnet die Methode eine effiziente Charakterisierungsmöglichkeit. Speziell in Kombination mit der von Peters *et al.* (2013) entwickelten Technik des ganz-Zell Aktivitäts-Assays kann nun eine Vielzahl an unbekanntem membranständigen DH auf einfache und kostengünstige Weise untersucht werden.

## V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte ein neuartiges, markerfreies Deletionssystem für *Gluconobacter oxydans* entwickelt und in mehreren Stämmen erfolgreich etabliert werden. Das Funktionsprinzip basiert auf der Verwendung des gegenselektierbaren Markergens *codA* aus *E. coli* auf einem ins Genom integrierenden Deletionsvektor. Damit die Integration des Vektors stattfindet, erwies es sich als essentiell, dass der eingesetzte Vektor im Zielorganismus nicht repliziert wird, also ein Suizidvektor ist. Erstmals konnte in der Studie die Rolle von *codB* für ein Deletionssystem dieser Art aufgeklärt werden. Die von *codB* kodierte Cytosin Permease ist für die Funktionalität des Deletionssystems bei niedrigen FC Konzentrationen essentiell. Vektoren, die nur *codA* enthielten hatten eine um 10-fach höhere minimale Hemmkonzentration gegenüber FC, als jene mit dem kompletten *cod* Operon. Die allgemeine Verbreitung des *upp* Gens bei gleichzeitigem Fehlen des *cod* Operons in allen in dieser Arbeit untersuchten Stämmen aus der Familie der Acetobacteraceae ermöglicht den Einsatz des Systems in einer Vielzahl von Essigsäurebakterien. Der herausragende Vorteil dabei ist, dass vorab keinerlei genetische Modifikationen in den Zielorganismen eingebracht werden müssen, das System kann unmittelbar in den WT Stämmen eingesetzt werden.

Die Studie zum Einfluss von Restriktionssystemen auf die Transformierbarkeit von *G. oxydans* Stämmen zeigte, dass vor allem die Typ I Restriktionssysteme erheblichen Einfluss auf die Effizienz und Frequenz der Transformation durch Elektroporation haben. Der stärkste Einfluss konnte dabei im Stamm DSM 3504 dokumentiert werden, der dafür bekannt ist nicht konjugierbar und schlecht transformierbar zu sein. Der schwächere Einfluss der Deletion eines Typ I Systems in ATCC 621H ist eventuell darauf zurückzuführen, dass der Stamm relativ inaktive Restriktionssysteme besitzt, was ihn über die Jahre auch zu einem beliebten Laborstamm gemacht hat. Nichtsdestotrotz konnte die Effizienz auch in diesem Stamm durch die Deletion eines Typ I Restriktionssystems gesteigert werden.

Bei der Untersuchung der abweichenden Wachstumscharakteristika zwischen *G. oxydans* ATCC 621H und DSM 3504, vor allem bezüglich der gebildeten Biomasse, erwies sich das Vorhandensein einer zusätzlichen NADH Dehydrogenase als entscheidend. Dies konnte sowohl durch Deletionen in dem bisher kaum untersuchten Stamm DSM 3504 wie auch durch eine Überexpression des Enzyms in ATCC 621H gezeigt werden. Beim Wachstum auf Mannitol kommt es zu einer wesentlich effizienteren Verwertung der Fruktose, da das in großen Mengen gebildete NADH durch die zusätzliche NDH schneller umgesetzt werden kann. Die lösli-

chen und membranständigen DH stehen in permanenter Konkurrenz um die Elektronentransportkette. Durch die zusätzliche NDH werden mehr Elektronen über den löslichen Stoffwechsel in die Atmungskette geschleust und mehr Biomasse kann gebildet werden. Auch bei Glucose zeigt sich dieser Effekt, allerdings erst bei einer Überexpression der NDH. Die NDH hat sich demzufolge als wichtiges Enzym bei der Konkurrenz von löslichem Stoffwechsel und membranständigen Dehydrogenasen um die Elektronentransportkette erwiesen. Außerdem könnte es für das Recycling von NADH entscheidend sein und kann dadurch den Stoffwechsel und das Verhältnis an gebildeter Biomasse empfindlich beeinflussen.

Des Weiteren war es im Rahmen dieser Arbeit möglich ein vektorbasiertes Expressionssystem für membranständige Dehydrogenasen zu entwickeln. Dabei wurde besonders auf eine native Expressionsrate wertgelegt, um keine toxischen oder störenden Effekte bei der Proteinbildung zu generieren. Das System baut auf einem experimentell bestimmten, nativen ADH Promotor und einem *Gluconobacter* Expressionsvektor mit niedriger Kopienanzahl auf. Die Aktivität des eingesetzten Promotors und die Eignung des Vektors wurde in  $\beta$ -Galaktosidase Assays bestätigt und das System schließlich in einem Komplementierungsversuch mit einer membranständigen DH erfolgreich getestet.



## VI. Literaturverzeichnis

**Adachi, O., Moonmangmee, D., Shinagawa, E., Toyama, H., Yamada, M., Matsushita, K.** (2003) New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647**: 10-7

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-402

**Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J.** (2004) Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* **17**: 187-194

**Attwood, M. M., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T.** (1991) Glucose Metabolism and Gluconic Acid Production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **72**: 101-105

**Boeke, J. D., LaCroute, F., Fink, G. R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular and General Genetics* **197**: 345-6

**Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. R.** (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* **154**: 164-75

**Boros, I., Posfai, G., Venetianer, P.** (1984) High-copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322. *Gene* **30**: 257-60

**Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D.** (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **41**: 459-72

**Calhoun, M. W., Gennis, R. B.** (1993) Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **175**: 3013-9

**Cava, F., Zafra, O., Magalon, A., Blasco, F., Berenguer, J.** (2004) A new type of NADH dehydrogenase specific for nitrate respiration in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 45369-78

**Danielsen, S., Kilstrup, M., Barilla, K., Jochimsen, B., Neuhard, J.** (1992) Characterization of the *Escherichia coli codBA* operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Molecular Microbiology* **6**: 1335-44

**De Ley, J.** (1961) Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *Journal of General Microbiology* **24**: 31-50

**De Ley, J., Swings, J., Gossele, F.** (1984) The genus *Gluconobacter*. In: H. J. Krieg N (Hsg.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, S. 267-278

**De Muynck, C., Pereira, C. S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W., Vandamme, E. J.** (2007) The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **27**: 147-71

**Deppenmeier, U., Ehrenreich, A.** (2009) Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**: 69-80

**Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C.** (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 233-42

**Dubeau, M. P., Ghinet, M. G., Jacques, P. E., Clermont, N., Beaulieu, C., Brzezinski, R.** (2009) Cytosine deaminase as a negative selection marker for gene disruption and replacement in the genus *Streptomyces* and other Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1211-4

**Duraisingh, M. T., Triglia, T., Cowman, A. F.** (2002) Negative selection of *Plasmodium falciparum* reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *International Journal for Parasitology* **32**: 81-9

**Ehrenreich, A., Prust, C., Gottschalk, G., Deppenmeier, U.** (2005) Überleben im Überfluss: Das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans*. *GenomXPres* **2**: 18 - 20

**Elfari, M., Ha, S. W., Bremus, C., Merfort, M., Khodaverdi, V., Herrmann, U., Sahm, H., Gorisch, H.** (2005) A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 668-74

**Fabret, C., Ehrlich, S. D., Noirot, P.** (2002) A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **46**: 25-36

**Figurski, D. H., Helinski, D. R.** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 1648-52

**Friedrich, T., Scheide, D.** (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Letters* **479**: 1-5

**Frohman, M. A.** (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods in Enzymology* **218**: 340-56

**Fu, Y. H., Tsai, M. M., Luo, Y. N., Deonier, R. C.** (1991) Deletion analysis of the F plasmid *oriT* locus. *Journal of Bacteriology* **173**: 1012-20

**Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., Kado, C. I.** (1985) Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **164**: 918-21

**Gillis, M.** (1980) Intra- and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter* [proceedings]. *Antonie van Leeuwenhoek* **44**: 117-8

**Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., de Ley, J.** (1983) Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electropherograms of *Gluconobacter Asai* 1935 emend. mut. char. Asai, Iizuka, and Komagata 1964. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 65-81

**Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., Pauwels, P., de Ley, J.** (1983) Numerical Analysis of Phenotypic Features and Protein Gel Electrophoregrams of a Wide Variety of *Acetobacter strains*. Proposals for the improvement of the taxonomy of the genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 338-368

**Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., Holland, S. M., Zelazny, A. M.** (2006) *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2609-16

**Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., Kumar, A.** (2001) *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3**: 445-56

**Hall, P. E., Anderson, S. M., Johnston, D. M., Cannon, R. E.** (1992) Transformation of *Acetobacter xylinum* with plasmid DNA by electroporation. *Plasmid* **28**: 194-200

**Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-80

**Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F. R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* **204**: 63-113

**Hölscher, T., Görisch, H.** (2006) Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Bacteriology* **188**: 7668-76

**Hölscher, T., Weinert-Sepalage, D., Görisch, H.** (2007) Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* **153**: 499-506

**Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., Schmauder, H.-P.** (2006) Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1). *Engineering in Life Sciences* **No. 6**: 537–545

**Huber, R., Palmen, T. G., Ryk, N., Hillmer, A. K., Luft, K., Kensy, F., Buchs, J.** (2010) Replication methods and tools in high-throughput cultivation processes - recognizing potential variations of growth and product formation by on-line monitoring. *BMC Biotechnology* **10**: 22

**Jaworowski, A., Campbell, H. D., Poulis, M. I., Young, I. G.** (1981) Genetic identification and purification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20**: 2041-7

**Junker, A.** (2009) Untersuchung des Zentralstoffwechsels von *Gluconobacter oxydans* durch die Etablierung eines markerfreien Deletionssystems. Dissertation, Technische Universität München

**Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U., Schweiger, P.** (2010) Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Biotechnology* **150**: 460-5

**Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K.** (2001) *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 559-63

**Katzen, F., Becker, A., Ielmini, M. V., Oddo, C. G., Ielpi, L.** (1999) New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *gum* operon. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 278-82

**Keller, K. L., Bender, K. S., Wall, J. D.** (2009) Development of a markerless genetic exchange system for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and its use in generating a strain with increased transformation efficiency. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7682-91

**Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R. K., Buchs, J.** (2009) Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microbial Cell Factories* **8**: 31

**Knowles, J. R.** (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**: 121-4

**Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd, Peterson, K. M.** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-6

**Krajewski, V.** (2008) Modifikation des Glucosestoffwechsels in *Gluconobacter oxydans*. Dissertation, Forschungszentrums Jülich

**Krajewski, V., Simic, P., Mouncey, N. J., Bringer, S., Sahm, H., Bott, M.** (2010) Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4369-76

**Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., Friedrich, T.** (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **230**: 538-48

**Leisinger, T.** (1965) Studies on the systematics and metabolism of acetic acid bacteria. *Zentralblatt Bakteriologischer Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* **119**: 329-76

**Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., Schleifer, K. H.** (1989) High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiology Letters* **53**: 299-303

**Liu, X., Gorovsky, M. A.** (1993) Mapping the 5' and 3' ends of Tetrahymena thermophila mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). *Nucleic Acids Research* **21**: 4954-60

**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, A. W., 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., Schleifer, K. H.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-71

**Luttik, M., Van Spanning, R., Schipper, D., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T.** (1997) The Low Biomass Yields of the Acetic Acid Bacterium *Acetobacter pasteurianus* Are Due to a Low Stoichiometry of Respiration-Coupled Proton Translocation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3345-51

**Martinussen, J., Hammer, K.** (1994) Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **176**: 6457-63

**Mason, L. M., Claus, G. W.** (1989) Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., emend *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 174-184

- Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T., Adachi, O.** (2003) 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1959-66
- Matsushita, K., Ohnishi, T., Kaback, H. R.** (1987) NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry* **26**: 7732-7
- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O.** (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **36**: 247-301
- Merfort, M., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H.** (2006) High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**: 443-51
- Miller, J.** (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F.** (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**: 1215
- Mostafa, H. E., Heller, K. J., Geis, A.** (2002) Cloning of *Escherichia coli* *lacZ* and *lacY* genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2619-23
- Motizuki, K., Takarazuka, I., Kanzaki, T.** (1966) Method for producing 2-keto-L-gulonic acid. United States of America Patent,
- Mullis, K. B., Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-50
- Murray, N. E.** (2000) Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 412-34
- Nannenga, B. L., Baneyx, F.** (2011) Enhanced expression of membrane proteins in *E. coli* with a P(BAD) promoter mutant: synergies with chaperone pathway engineering strategies. *Microbial Cell Factories* **10**: 105
- Nantapong, N., Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K.** (2004) Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 187-93

**Neuhard, J.** (1982) Utilization of preformed pyrimidine bases and nucleosides. In: Munch-Peterson (Hsg.) Metabolism of nucleotides nucleosides and nucleobases in microorganisms. Academic, London, S. 95-148

**Noel, T., Francois, F., Paumard, P., Chastin, C., Brethes, D., Villard, J.** (2003) Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient *Candida lusitanae* clinical isolates: indirect evidence of a fluconazole uptake transporter. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**: 1275-84

**O'Callaghan, D., Charbit, A.** (1990) High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. Molecular and General Genetics **223**: 156-8

**Orr, R. Y., Philip, N., Waters, A. P.** (2012) Improved negative selection protocol for *Plasmodium berghei* in the rodent malarial model. Malaria Journal **11**: 103

**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 **97**: 2521-30

**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 multideletion strains. Applied Microbiology and Biotechnology:

**Pingoud, A., Jeltsch, A.** (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucleic Acids Research **29**: 3705-27

**Pritchett, M. A., Zhang, J. K., Metcalf, W. W.** (2004) Development of a markerless genetic exchange method for *Methanosarcina acetivorans* C2A and its use in construction of new genetic tools for methanogenic archaea. Applied and Environmental Microbiology **70**: 1425-33

**Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U.** (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. Nature Biotechnology **23**: 195-200

**Raspor, P., Goranovic, D.** (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. Critical Reviews in Biotechnology **28**: 101-24

**Richhardt, J., Bringer, S., Bott, M.** (2012) Mutational analysis of the pentose phosphate and Entner-Doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a Deltaedd Deltaeda mutant on mannitol. Applied and Environmental Microbiology **78**: 6975-86

**Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D.** (2010) REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research* **38**: D234-6

**Rose, I. A., Fung, W. J., Warms, J. V.** (1990) Proton diffusion in the active site of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **29**: 4312-7

**Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J. M.** (2000) Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 6**: 1981-7

**Saida, F.** (2007) Overview on the expression of toxic gene products in *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science* **Kapitel 5**: Unit 5 19

**Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosoda, J., Shimomura, K.** (1997) Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 454-60

**Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

**Schleyer, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H.** (2008) An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. *International Journal of Food Microbiology* **125**: 91-5

**Sievers, M., Swings, J.** (2005) Family II Acetobacteraceae. In: G. M. Garraty, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley (eds) *The Proteobacteria, Part C a, b, d, e - Proteobacteria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Science + Business, New York, S. 41 - 95

**Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R., Grainger, D. C.** (2011) *Escherichia coli* sigma(7)(0) senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucleic Acids Research* **39**: 5109-18

**Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-17

**Sunagawa, N., Fujiwara, T., Yoda, T., Kawano, S., Satoh, Y., Yao, M., Tajima, K., Dairi, T.** (2013) Cellulose complementing factor (Ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*:

**Tillett, D., Neilan, B. A.** (1999) Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites. *Nucleic Acids Research* **27**: e26



**Tonouchi, N., Sugiyama, M., Yokozeki, K.** (2003) Construction of a vector plasmid for use in *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**: 211-3

**Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K.-I.** (1989) *Acidomonas* gen. nov., Incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 50-55

**van der Geize, R., de Jong, W., Hessels, G. I., Grommen, A. W., Jacobs, A. A., Dijkhuizen, L.** (2008) A novel method to generate unmarked gene deletions in the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* using 5-fluorocytosine conditional lethality. *Nucleic Acids Research* **36**: e151

**Voss, J.** (2009) Auswirkungen der Deletion membranständiger Dehydrogenasen auf *Gluconobacter oxydans* DSM 7145. Georg-August Universität zu Göttingen

**Voss, J., Ehrenreich, A., 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* **156**: 1890-9

**Wach, A.** (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-65

**Wagner, M., van Wolferen, M., Wagner, A., Lassak, K., Meyer, B. H., Reimann, J., Albers, S. V.** (2012) Versatile Genetic Tool Box for the Crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Microbiology* **3**: 214

**Wagner, R., Straub, M. L., Souciet, J. L., Potier, S., de Montigny, J.** (2001) New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine-cytosine permease affinity mutants. *Journal of Bacteriology* **183**: 4386-8

**Wakao, N., Nagasawa, N., Matsuura, T., Matsukura, H., Matsumoto, T., Hiraishi, A., Sakurai, Y., Shiota, H.** (1994) *Acidophilum multivorum* sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage. *Journal of General and Applied Microbiology* **40**: 143-159

**Waldron, D. E., Lindsay, J. A.** (2006) SauI: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *Journal of Bacteriology* **188**: 5578-85

**Waschkau, B., Waldeck, J., Wieland, S., Eichstadt, R., Meinhardt, F.** (2008) Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**: 181-8

**Wei, G., Yang, X., Gan, T., Zhou, W., Lin, J., Wei, D.** (2009) High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**: 1029-34

**Wilson, G. G.** (1991) Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research* **19**: 2539-66

**Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T.** (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**: 1244-51

**Yamashita, S., Uchimura, T., Komagata, K.** (2004) Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 865-70

**Zhang, L., Lin, J., Ma, Y., Wei, D., Sun, M.** (2010) Construction of a novel shuttle vector for use in *Gluconobacter oxydans*. *Molecular Biotechnology* **46**: 227-33

## Anhang

### Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primer

Name	Sequenz	Beschreibung
0478_Check_F	CCTGTGCAGAGGCGTCTC	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>g2dh</i> in DSM 3504
0478_Check_R2	CATTGTAGCAGACAACGGC	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>g2dh</i> in DSM 3504
0478_Fus_F	CGGGTGAACAAACCGTACTTTCTTGCTCCAAT-GACAAACA	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>g2dh</i> in DSM3504
0478_Fus_R	TTTGTCAATTGGAGCAAGAAAGTACGGTTTGTT-CACCCG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>g2dh</i> in DSM3504
0478_Kpn_F	CATGGTACCTGATGAGGCTGCAAGGAG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>g2dh</i> in DSM3504
0478_Xbal_R	CATAGATCTAGATCGGAGAGGTTCTCCAG	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>g2dh</i> in DSM3504
0541_check_F	ATGATGCGGACGTGCGAAAAG	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>ndh</i> in DSM 3504
0541_check_R	TCGGGCATTATTACTGGAATGTG	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>ndh</i> in DSM 3504
0541_F_doFUS	CTTGCCTCCGATTTTGGCGCACCA-TCCGCGCCTGAG	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>ndh</i> in DSM3504
0541_F_Kpn_up	CATGGTACCTCAGGTCTGCGTTTCGG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>ndh</i> in DSM3504
0541_HindF	GCTAAGCTTTCAGGTCTGCGTTTCGG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>ndh</i> in DSM3504 mit pKOS7b
0541_R_upFUS	TGCTCAGGCGCGGATGGTGCCGGTTTTCA-GGCCTCCG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>ndh</i> in DSM3504

Name	Sequenz	Beschreibung
0541_R_xbaDO	GACTCTAGAGCTGTGTTTCGGCGATGA	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>ndh</i> in DSM3504
0541_SalR	CTAGTCGACGCTGTGTTTCGGCGATGA	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>ndh</i> in DSM3504 mit pKOS7b
0548_check_F	CAACGCTTGAGGACCAGAC	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>tpiA</i>
0548_check_R	CCCTCGATGACGAAAAGCG	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>tpiA</i>
0548_FUS_F	CACGAGCACGGCATTTCATTAACCTC- CGACAGGGTTTC	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>tpiA</i>
0548_FUS_R	GAAACCCTGTCGTGAGGTTAATGAAT- GCCGTGCTCGTG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>tpiA</i>
0548_Kpn_F	TGAGGTACCGGAAGTCTCGGTACATTCTG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>tpiA</i>
0548_sonde_F	CAGCATTGCGGCGTAAG	Amplifikation der Sonde zur Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>tpiA</i>
0548_sonde_R	TTGACTATGTCACGGAGCG	Amplifikation der Sonde zur Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>tpiA</i>
0548_xba_R	ACGTCTAGACGATGCAGCAGCTCTGT	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>tpiA</i>
0922_F_kpn	TCAGGTACCCTTGCTGCCGCTTACATCG	Amplifikation der <i>upstream</i> Flanke der Levansucrase
0922_FUSF	GAGAGGGCAAATCGGCTCCCGTAACT- GAAAATGAAAAAG	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke der Levansucrase
0922_FUSR	CTTTTTCATTTTCAGTTACGGGAGCCGATTT- GCCCTCTC	Amplifikation der <i>upstream</i> Flanke der Levansucrase
0922_xba_R	CAGTCTAGATGCGGGTCTGAGTTTCAAG	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke der Levansucrase

Name	Sequenz	Beschreibung
0922check_F	CCATCATGACCCTGCGTAAG	Überprüfung von 1. Bzw. 2. Rekombination im Genbereich GLS_c09570
0922check_R	CCTGACTGTTCCGTCTTTCC	Überprüfung von 1. Bzw. 2. Rekombination im Genbereich GLS_c09570
0922sondeF	CCCTCCTATGGTCTCAGCAC	Amplifikation der Sonde zur Überprüfung der GLS_c09570 Dele- tion
0922sondeR	GGCCAAGAACTGTATCAGCG	Amplifikation der Sonde zur Überprüfung der GLS_c09570 Dele- tion
100K	GGTTACCTTCTTACGACTT	Bindeposition: 1510- 1492 im 16S rRNS-Gen von <i>E. coli</i> (Rückwärts- primer)
1068_Race1F	CTGTGCCGGTATCTTCTCTG	Genspezifischer Primer für innere PCR (Start- punktbestimmung von GOX 1068)
1068_Race2F	GTAGCGCTGCTCGGAATA	Genspezifischer Primer für äußere PCR (Start- punktbestimmung von GOX 1068)
1068_Race3R	AGGCCATGAACAACTGATCC	Funktionsscheck der Primer 1068_Race1F und 1068_Race2F
1263_F	TCCAGCGTGACCTCATCCATATC	Amplifikation des Haus- haltsgens GOX 1263 für RT PCR
1263_R	TTATCTGGTGGGCTTCACGCTGTC	Amplifikation des Haus- haltsgens GOX 1263 für RT PCR
1507_f_ECORI	AGCGAATTCTGCCGACGTGACGAATTG	Amplifikation der obern Flanke für Deletion von GOX 1507
1507_F_genomCHECK	TCATCTTTCGGGACAGGCAAACC	Überprüfung der Dele- tion von GOX 1507
1507_FUS_F	GGGTAGATCTCTGACGTTCTGGGCTTTCAT- GACCGTCATTTTGG	Amplifikation der unte- ren Flanke für Deletion von GOX 1507

Name	Sequenz	Beschreibung
1507_FUS_R	CCAAAATGACGGTCATGAAAGCCCAGAACGT-CAGAGATCTACCCTGAAAAG	Amplifikation der oberen Flanke für Deletion von GOX 1507
1507_HIND_R	AAGCTTACGCTCAATCACCGCAGAC	Amplifikation der unteren Flanke für Deletion von GOX 1507
1507_R_CHECKgenom	ATCGGGCCGGTTCTGTCATCAC	Überprüfung der Deletion von GOX 1507
1507NEW_SEQ	CATGGGCTGGAAGTAGATGC	Überprüfung der Deletion von GOX 1507 durch Sequenzierung
1507NEW_SEQ_R	GTACCGCAGGTTGTCTGTG	Überprüfung der Deletion von GOX 1507 durch Sequenzierung
2567_F_ECO	AGCGAATTCACCGTGACGGTTATCATCC	Amplifikation der <i>upstream</i> Flanke zur Deletion von GOX 2567-2569
2567_FUSION_F	GAGAAGGGGTTTCTTCCATGCGAACTCA-AATCCTGTTTCAAACATGTGAGAAATATC	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke zur Deletion von GOX 2567-2569
2567_FUSION_R	GTTTTGAAACAGGATTTGAGTTCGCATG-GAAGAAACCCCTTCTCGCGTTC	Amplifikation der <i>upstream</i> Flanke zur Deletion von GOX 2567-2569
2567_R_CHECKgenom	CCATTGAACAGGACAGGCAGCTCTC	Überprüfung der erfolgten Deletion der Gene GOX 2567-2569
2567_R_XBAI	TCATCTAGATCCCGGCCATCAGGCTC	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke zur Deletion von GOX 2567-2569
2567_SEQ_F	ACAGCGTTGTGGGAAGGAGAG	Überprüfung der erfolgten Deletion von GOX 2567 – GOX 2569 durch Sequenzierung
2567_Seq_R	GGATGTGCTGCCGGCTTATCTG	Überprüfung der erfolgten Deletion der Gene GOX 2567-2569 durch Sequenzierung
5'RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTT-GATG	Adapterspezifischer innerer Primer aus RLM Race Kit

Name	Sequenz	Beschreibung
5'RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	Adapterspezifischer äußerer Primer aus RLM Race Kit
616v_alt	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Bindeposition: 8-27 im 16S rRNS-Gen von <i>E. coli</i> (Vorwärtsprimer)
codBA_F	AAACAGCAAAAAGGGGGAAT	Amplifikation von <i>cod</i> Kasette aus <i>E. coli</i> K12
codBA_F_ov	TTCCGGAGAACCAAACAGCAAAAAGGGGGAAT	Amplifikation von <i>cod</i> Kasette aus <i>E. coli</i> K12 mit 5' Überhang
codBA_F_xhoI	GCACTCGAGAAACAGCAAAAAGGGGGAAT	Primer for amplification of <i>cod</i> BA operon with xhoI restriction side
codBA_R	ATCCGGCATAAACTAAGCTC	Amplifikation von <i>cod</i> Kasette aus <i>E. coli</i> K12
codBA_R_ov	GCGCCAGGAGAGATCCGGCATAAACTAAGCTC	Amplifikation von <i>cod</i> Kasette aus <i>E. coli</i> K12 mit 3' Überhang
codBAcheckF	TATCGCCTTCTTGACGAGTTC	Überprüfung der <i>cod</i> -Insertion in pKOS6b
codBAcheckR	ATTCCCGAGGCTGTAGC	Überprüfung der <i>cod</i> -Insertion in pKOS6b
do_sldB_fwd	AGTTCTGGAGGCTTTCACCA-GAAAGCGGGGGCTGAGGCCG	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke zur Deletion von <i>sldAB</i> in ATCC 621H
do_sldB_rev	TCAGAATTCGGTGCAGGTTCCAGCGAAAC	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke zur Deletion von <i>sldAB</i> in ATCC 621H
dUPP_checkF	GCGGAAGTTTCAGCACAC	Nachweis von <i>upp</i> Deletion
dUPP_checkR	GGGACTTCGTTACTGCATGA	Nachweis von <i>upp</i> Deletion
hsdr_checkF	TCTTGAAGATCAGGGGAAAGG	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>hsdR</i> in DSM 3504
hsdr_checkR	GTTCTGCACTACCTCTG	Überprüfung der erfolgten Deletion von <i>hsdR</i> in DSM 3504

Name	Sequenz	Beschreibung
hsdr_F_xba	CAGTCTAGAAGGCAAACGTCCTGTCAG	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>hsdR</i> in DSM 3504
hsdr_fus_F	GGGCACGCTTCAATTCATTGGGCGTTGCTTCAAATGAGT	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>hsdR</i> in DSM 3504
hsdr_fusR	ACTCATTTGAAAGCAACGCCCAATGAATTGAAGCGTGCC	Amplifikation der oberen Flanke zur Deletion von <i>hsdR</i> in DSM 3504
hsdr_pstI_R	ACTCTGCAGCGGCAGAACCTCTCATACG	Amplifikation der unteren Flanke zur Deletion von <i>hsdR</i> in DSM 3504
P1_LacZ_HindIII	CCGGAAGCTTTTATTTTTGACACCAG	Amplifikation von <i>LacZ</i> für pMM3b ( <i>HindIII</i> Schnittstelle für Ligation in pJV17 Rückgrat)
P2_LacZ_pADH_Fus	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGACCATGATTACGGATTC	Amplifikation von <i>LacZ</i> für pMM3b (Überhang für Fusion mit ADH Promotor)
P3_pADH_LacZ_Fus	GAATCCG-TAATCATGGTCATGATCCAACCTGCCTTTTTGT	Amplifikation des ADH Promotors (Überhang für Fusion mit <i>LacZ</i> )
P4_pADH_MunI	GTGACAATTGTCCCGCCCGGTTTCG	Amplifikation des ADH Promotors ( <i>MunI</i> Schnittstelle für Ligation in Rückgrat von pJV17)
pAJdUPP_F	ACCATCGTCGGCTACAG	Amplifikation von pAJ zur Entfernung des <i>upp</i> Gens
pAJdUPP_F_ov	CTCTCCTGGCGCACCATCGTCGGCTACAG	Amplifikation von pAJ zur Entfernung des <i>upp</i> Gens mit 5' Überhang
pAJdUPP_R	AATCTGAAAGGCGTCTTCTG	Amplifikation von pAJ zur Entfernung des <i>upp</i> Gens
pAJdUPP_R_ov	GGTTCTCCGGAAAATCTGAAAGGCGTCTTCTG	Amplifikation von pAJ zur Entfernung des <i>upp</i> Gens mit 3' Überhang
par_repF	GACTCTAGAGCCGTTGAATATGGGTTG	Amplifikation der <i>par rep</i> Bereiche für <i>ori</i> von pKOS4beta



Name	Sequenz	Beschreibung
par_repR	AGCCCATGGCTGTCGTCTTGTGAATCC	Amplifikation der <i>par rep</i> Bereiche für <i>ori</i> von pKOS4beta
pBRredF	AGCTCTAGATGCGGAGAACTGTGAATGC	Amplifikation des Rückgrats von pKOS4beta
pBRredR	CGACCATGGGCACCTGTCCTACGAGTTG	Amplifikation des Rückgrats von pKOS4beta
pGOX3checkF	GGAGGGAAAGCTCCCATGTC	Nachweise von pGOX3
pGOX3checkR	AGATTGCGAATAACCACAGAG	Nachweise von pGOX3
pK18_Kan_xhoI_R	TCACTCGAGCGATCCTCTAGCGAACCC	Amplifikation der Km Resistenzkassette aus pK18mobsacB
pK18KAN_notIF	TGAGCGGCCGCGCGGTTTTATGGACAGC	Amplifikation der Km Resistenzkassette aus pK18mobsacB
pk18MCS_2R	CAGCTGGCAATTCCGGTTC	Checkprimer, für MCS Bereich aller pAJ63a basierten Vektoren
pk18MCS_F	TTCCGGCTCGTATGTTGTG	Checkprimer, für MCS Bereich aller pAJ63a basierten Vektoren
pk18MCS_R	GGCCTCTTCGCTATTACG	Checkprimer, für MCS Bereich aller pAJ63a basierten Vektoren
pKOS4delAmpnotIF	TGAGCGGCCGCGTATCACGAGGCCCTTTC	Amplifikation des Rückgrats von pKOS4 ohne Ampicilin Kasette
pKOS4delAmpxhoIR	TCACTCGAGGTTTTCGTTCCACTGAGCG	Amplifikation des Rückgrats von pKOS4 ohne Ampicilin Kasette
pKOS4checkF	AGCCTTCAACCCAGTCAG	Überprüfung von pKOS4beta
pKOS4checkR	CGCGATGGATATGTTCTGC	Überprüfung von pKOS4beta
pKOS6aAMP_R	AATCTGAAAGGCGTCTTCTG	Amplifikation von pKOS6a (Vektor ohne <i>codB</i> )
pKos6AmpFxho	AGCCTCGAGATGTGGAGGCTAACAGTGTC	Amplifikation von pKOS6a (Vektor ohne <i>codB</i> )

Name	Sequenz	Beschreibung
pKOS6SEQ1	AGTTGCGCAGCCTGAATG	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ2	GATGGAAGCCGGTCTTGTC	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ3	TCATCGGTAATCTTCTCCTCGG	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ4	GCTGGTTGACCTTCCTTTTCG	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ5	GGGCGATTCCGCATTTTG	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ6	AAATGACCGACCAAGCGAC	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ7	TCTGCGAAGTGATCTTCCG	Sequenzierung von pKOS6b
pKOS6SEQ8	GCGGAGCCTATGGAAAACG	Sequenzierung von pKOS6b
pKOSreducR	TATCCAGAACGGGAGTGC	pKOS7b spezifischer Primer
pMM3b_check1.for	TTCCCAGTCACGCAATTGTC	Überprüfung / Sequenzierung von pMM3b
pMM3_uni2.rev	CTGGACGAAGAGCATCAG	Überprüfung / Sequenzierung von pMM3b
sldAB_ecoR	TCAGAATTCGGTGCAGGTTCCAGCGAAAC	Amplifikation der <i>downstream</i> Flanke zur Deletion von sldAB in ATCC 621H
sldAB_xbaF	AGCTCTAGAATATGCCGAGAACGTGGTCC	Amplifikation der <i>upstream</i> Flanke zur Deletion von sldAB in ATCC 621H
sldABseq_F	CCATCATCTGCGCTTCCACC	Überprüfung der sldAB Deletion
sldABseq_R	AGCCCGACCTTCACCTATCAG	Überprüfung der sldAB Deletion
sonde_0541nF	GATCTGCATGGACTGATCCG	Amplifikation der Sonde für Überprüfung von erfolgter Deletion von <i>ndh</i>
sonde_0541nR	GCAGGACAGCCATGTCAG	Amplifikation der Sonde für Überprüfung von erfolgter Deletion von <i>ndh</i>

Name	Sequenz	Beschreibung
sonde_sldAB_F	GAACGCCCTGCCCTTCC	Amplifikation von Sonde zur Überprüfung der <i>sldAB</i> Deletion
sonde_sldAB_R	TTCCGGGGCCGTTTTTCC	Amplifikation von Sonde zur Überprüfung der <i>sldAB</i> Deletion
up_sldA_rev	CGGCCTCAGCCCCGCTTTCTGGT- GAAAGCCTCCAGAACT	Amplifikation der <i>up-stream</i> Flanke zur Deletion von <i>sldAB</i> in ATCC 621H

**Auflistung der verwendeten Internetdienste**

---

URL	Anbieter	Verwendungszweck
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA	Literaturrecherche Sequenzanalyse
<a href="http://scholar.google.de/">http://scholar.google.de/</a>	Google Inc., Mountain View, USA	Literaturrecherche
<a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a>	Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, U.K.	Proteinanalyse
<a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro/">http://www.ebi.ac.uk/interpro/</a>	European Bioinformatics Institute, Cambridge, U.K.	Proteinanalyse
<a href="http://www.straininfo.net/">http://www.straininfo.net/</a>	Department of Applied Mathematics and Computer Science, Ghent University, Gent, Belgien	Stammrecherche
<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>	New England Biolabs, Ipswich, USA	Recherche nach Restriktionssystemen

---

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. W. Liebl für die Bereitstellung des Themas und das Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken

Dr. Armin Ehrenreich sei für die Betreuung der Arbeit, für die unzähligen Ideen und Impulse bei den Besprechungen sowie für die angenehme Zusammenarbeit gedankt.

Herrn Prof. Dr. Rudi Vogel danke ich für die Übernahme der Rolle des Zweitprüfers.

Prof. Dr. Ralph Hückelhoven danke ich für die Übernahme der Rolle des Prüfungsvorsitzenden.

Ein großer Dank gilt allen meinen Mitstreitern der AG Ehrenreich, besonders Claudia, Melanie, Daniel, Angi, Steffi, Justyna, Michael, Hedwig, Xu, Liu und nicht zu vergessen unserer TA Helga, für das angenehme Arbeitsklima, für den freundschaftlichen Umgang und für die breite Unterstützung.

Meinen Bachelor / Masterstudentinnen Katharina, Stefanie, Katharina und Lisa danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die Unterstützung beim Produzieren von Ergebnissen.

Besonders bedanken möchte ich mich beim *Gluconobacter* Team, Markus für die Beantwortung der tausenden kleineren und größeren Fragen praktischer Natur und Björn für die Geduld bei den Fragen zur Theorie. Es hat Spaß gemacht, ich hab wirklich gerne mit euch zusammengearbeitet!

Milad danke ich für die vielen Gespräche und die zahlreichen praktischen Tipps. Angel für die Antworten wenn wirklich kein anderer mehr einen Lösungsvorschlag parat hatte, Vladimir danke ich für die vielen spaßigen Momente beim Besuch in den Labors der AG Schwarz.

Ein riesen Dankeschön gebührt Arne für das penible Korrekturlesen der Arbeit in kürzester Zeit!

Beni sei für die fachlichen aber auch vielen privaten Gespräche, sowie die gemeinsamen spontanen Roadtrips, Freizeitunternehmungen und die guade Zeit gedankt!

Der größte Dank gebührt meiner Familie:

Meinen Eltern für die tatkräftige Unterstützung und das warme Zuhause in all den Studienjahren.

Meiner Großmutter Maria, für die zahlreichen Postkarten von Wahlfahrtsorten und die vielen Kerzen die über die Jahre für den Abschluss der Promotion angezündet worden sind.

Meiner Freundin Patricia für das Anhören der vielen Vorträge, das Korrekturlesen und für die Geduld an den häufigen Abenden als es mal wieder später wurde.

## Lebenslauf

25.01.1984	Geburt in Bozen / Südtirol (I)
1990 - 1998	Grund und Mittelschule in St. Ulrich / Gröden (I)
1998 - 2003	Naturwissenschaftlich – mathematisches Gymnasium in Brixen (I)
2003 - 2007	Bachelorstudium der Biologie an der Leopold Franzens Universität Innsbruck (AUT)
2007 - 2009	Masterstudium mit Schwerpunkt Mikrobiologie an der TU München (D)
April - November 2009	Masterarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Liebl mit dem Titel: „Funktionelle Analyse des Carotenoidgenclusters von <i>Thermus thermophilus</i> “
Januar 2010	Beginn mit der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation

