



Technische Universität München

TUM School of Life Sciences

**Genetische Analyse der Celluloseproduktion in
Essigsäurebakterien**

Martin Thomas Bimmer

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Kay Heinrich Schneitz

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Prof. Dr. Johann Philipp Benz

Die Dissertation wurde am 04.01.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 13.03.2023 angenommen.

Für meine Familie

Abkürzungsverzeichnis

5-FC	5-Fluorocytosin
5-FU	5-Fluorouracil
AS	Aminosäure
BayBioMs	Bavarian Center for Biomolecular Mass spectrometry
BC	Bakterielle Cellulose
<i>bcsAB</i>	Bakterielle Cellulosesynthase Untereinheit A und B
<i>bcsC</i>	Bakterielle Cellulosesynthase Kanalprotein
<i>bcsD</i>	Bakterielle Cellulosesynthase Untereinheit D
<i>bcsX</i>	Uncharakterisiertes Protein der SGNH/GDSL Hydrolase Familie
<i>bcsY</i>	Acetyltransferase
<i>bglxA</i>	β -Glucosidase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaar
c-di-GMP	Cyclisches di-Guanosin Monophosphat
<i>ccpAx</i>	Cellulose komplementierendes Protein
Cef	Cefoxitin
CI	Kristallinitätsindex
<i>cmcAx</i>	Carboxymethyl Cellulase
CS	Cellulosesynthase
DGC	Diguanylate Cyclase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP _{mod}	Modifiziertes Elektroporations-Medium
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
FTIR	Fourier-Transform Infrarotspektrometrie
gDNA	Genomische DNA
GMP	Guanosine Monophosphate (Guanylat)

Abkürzungsverzeichnis

GOI	<i>Gene of interest</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
iBAQ	Intensitäts-basierte absolute Quantifizierung (<i>intensity-based absolute quantification</i>)
Kan	Kanamycin
LB	Lysogenic Broth
LCSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (<i>laser confocal scanning microscopy</i>)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
nfEPS	Nicht-fibrilläre EPS (<i>non-fibrous EPS</i>)
NMR	Kernspinresonanz
nt	Nucleotide
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PDE	Phosphodiesterase
RI-Detektor	Brechungsindexdetektor (<i>refractive index detector</i>)
RT-qPCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardfehler; Berechnung mit STABW.S in Excel
SLiCE	<i>Seamless Ligation Cloning Extract</i>
TFA	Trifluoressigsäure
WAR	Wasserbindefähigkeit (<i>Water absorption ratio</i>)
XRD	Röntgendiffraktion (<i>X-ray diffraction</i>)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Danksagung	XIII
Abstract	XV
Zusammenfassung	XVII
Publikationen.....	XXI
Beiträge zu Fachtagungen	XXII
Angeleitete Abschlussarbeiten	XXIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Biologie von Essigsäurebakterien.....	1
1.2 Exopolysaccharide in Essigsäurebakterien.....	6
1.3 Cellulose – ein besonderes Polymer aus Pflanzen und Bakterien	7
1.4 Synthese Bakterieller Cellulose.....	9
1.4.1 Einführung.....	9
1.4.2 Metabolismus der Cellulosesynthese	10
1.4.3 Der Cellulosesynthase-Komplex.....	12
1.5 Regulation der Cellulosesynthese.....	15
1.6 Vergleich von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und ATCC 53582.....	17
1.7 Ziele dieser Arbeit	19
2. Material & Methoden.....	22
2.1 Chemikalien.....	22
2.2 Mikrobiologische Methoden	22
2.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen.....	22
2.2.2 Biofilm Bildung.....	24
2.2.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	25

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Transformation von <i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 53582	25
2.2.5	Konjugation von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	26
2.2.6	Markerfreie Gendeletion	26
2.2.7	Insertion von Fluoreszenzmarkern	29
2.3	Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1	Isolierung von Plasmid DNA	30
2.3.2	Isolierung von genomischer DNA	30
2.3.3	Isolierung von RNA	30
2.3.4	Messung der Konzentration von Nukleinsäuren	31
2.3.5	Agarosegel-Electrophorese	31
2.3.6	Polymerase Kettenreaktion.....	32
2.3.6.1	DNA-Fragment Synthese durch PCR.....	32
2.3.6.2	Analytische PCR.....	33
2.3.7	Restriktionsverdau	34
2.3.8	Klonierung mittels SLiCE (<i>Seamless Ligation Cloning Extract</i>).....	35
2.3.9	Sequenzierung	35
2.3.10	Reverse Transkription	36
2.4	Analytische Methoden	37
2.4.1	Quantifizierung der Cellulose in <i>K. hansenii</i>	37
2.4.1.1	Anthron Assay	37
2.4.1.2	Trockengewicht.....	38
2.4.2	Physikochemische Charakterisierung Bakterieller Cellulose.....	38
2.4.3	Messung des Elastizitätsmoduls	39
2.4.4	RT-qPCR.....	40
2.4.4.1	Relative Quantifizierung.....	41
2.4.4.2	Absolute Quantifizierung	41

Inhaltsverzeichnis

2.4.5	Proteomik.....	42
2.4.5.1	Probenvorbereitung.....	42
2.4.5.2	Analyse des Proteoms	43
2.4.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LCSM).....	45
2.4.7	Rasterelektronenmikroskopie bakterieller Cellulose.....	47
2.4.8	Bestimmung des Schwimm- und Schwarmverhaltens.....	48
2.4.9	Bioinformatik.....	48
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Bioinformatischer Vergleich von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	52
3.1.1	Phylogenetische Einordnung innerhalb des Genus <i>Komagataeibacter</i>	52
3.1.2	Vergleich der <i>bcsABCD</i> Cellulosesynthese-Operons.....	54
3.2	Weiterentwicklung eines markerfreien Deletionssystems für Celluloseproduzierende Essigsäurebakterien	59
3.2.1	Konstruktion der Deletionsplasmide.....	59
3.2.2	Transformation von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	62
3.2.3	Transformation von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.....	63
3.2.4	Deletion der Zielgene.....	65
3.3	Charakterisierung Bakterieller Cellulose	67
3.3.1	Phänotypische Charakterisierung der Cellulosebiofilme	67
3.3.1.1	Biofilmbildung in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	69
3.3.1.2	Cellulosebiofilm in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	71
3.3.2	Weiterentwicklung eines kolorimetrischen Assays zur Quantifizierung von Cellulose in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	73
3.3.3	Quantifizierung der Cellulosebildung in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	75
3.3.4	Gravimetrische Quantifizierung der von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 gebildeten Cellulose.....	77

Inhaltsverzeichnis

3.3.5	Vergleich unterschiedlicher Färbemethoden zum Nachweis von BC..	79
3.3.6	Charakterisierung physikochemischer Eigenschaften.....	80
3.3.6.1	Identifikation bakterieller Cellulose mittels FTIR	80
3.3.6.2	Kristallinität bakterieller Cellulose	81
3.3.6.3	Bestimmung des Elastizitätsmoduls	83
3.3.6.4	Bestimmung der Wasserbindefähigkeit der von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 gebildeten Cellulose.....	86
3.4	Räumliche Auflösung des Cellulose Netzwerks.....	87
3.4.1	Elektronenmikroskopische Darstellung zur Charakterisierung des Cellulose Netzwerks.....	87
3.4.1.1	Etablierung eines Prozederes zur Probenvorbereitung.....	87
3.4.1.2	Elektronenmikroskopische Darstellung des Biofilms von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 im verbesserten Präparationsprotokoll.....	91
3.4.1.3	Elektronenmikroskopische Darstellung des Biofilms von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 im verbesserten Präparationsprotokoll.....	93
3.4.2	Nachweis der unterschiedlichen Lokalisierung der Proteinsynthese der CS-Gene in Biofilmen von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	97
3.5	Expression der CS-Gene – RT-qPCR	101
3.5.1	Relative Bestimmung der Expression in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769....	102
3.5.2	Absolute Quantifizierung der Transkription der CS-Gene in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	105
3.6	Proteomik-Analyse unterschiedlicher, mit der Cellulosesynthese assoziierter Proteine.....	107
3.6.1	Quantifizierung der Proteine der Cellulosesynthase-Gencluster	108
3.6.1.1	In Operon 1 (BcsAB1) kodierte Proteine	108
3.6.1.2	In Gencluster 2 (BcsAB2) kodierte Proteine.....	110
3.6.1.3	In Gencluster 3 (BcsAB3) kodierte Proteine.....	111

Inhaltsverzeichnis

3.6.1.4	Vergleich der Proteinmengen der Cellulosesynthasen.....	112
3.6.2	Detektion der an der Aktivierung der Glucose beteiligten Proteine...	113
3.6.3	Produktion der regulatorischen Diguanylatcyclasen	114
3.6.4	Identifizierung weiterer Proteine mit signifikant unterschiedlichen Abundanzen	115
3.7	Einfluss von cyclischem di-GMP auf die Motilität der Zellen.....	118
4.	Diskussion.....	122
4.1	Einführung in die Thematik	122
4.2	Bioinformatische Charakterisierung der <i>K. hansenii</i> Genome	124
4.2.1	Vergleich des Gesamtgenoms.....	124
4.2.2	ATCC 23769 und ATCC 53582 unterscheiden sich nur durch wenige AS-Austausche innerhalb der Haupt-Cellulosesynthase	125
4.3	Charakterisierung der Celluloseproduktion.....	129
4.3.1	Auswahl geeigneter Methoden zur Charakterisierung bakterieller Cellulose.....	129
4.3.2	Phänotypischer Vergleich – <i>bcsAB1</i> in beiden Stämmen nötig zur Synthese kristalliner Cellulose.....	130
4.3.3	Entwicklung angepasster Quantifizierungstechniken	132
4.4	Synthese zusätzlicher nicht-fibrillärer Exopolysaccharide in <i>Komagataeibacter hansenii</i>	134
4.4.1	Räumliche Auflösung des Cellulosebiofilms zur Identifikation zusätzlicher Polysaccharide (nfEPS) in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	134
4.4.2	BcsAB2 und BcsAB3 wirken modulierend auf die von BcsAB1 gebildeten Cellulosefasern in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	138
4.4.3	Räumliche Verteilung der CS-Genexpression zeigt Lokalisation von BcsAB2 und BcsAB3 an Medium-zugewandter Seite des Biofilms in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	141
4.4.4	Physikochemische Eigenschaften Bakterieller Cellulose.....	142

Inhaltsverzeichnis

4.4.4.1	Beitrag der Cellulosesynthesen zur Kristallinität	142
4.4.4.2	Deletion von <i>bcsAB2</i> bewirkt die Steigerung des Elastizitätsmoduls in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	144
4.4.5	Celluloseacetat als natürlich vorkommendes, mögliches Cellulosederivat in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	145
4.5	Translation des Cellulosesynthase-Komplexes in <i>K. hansenii</i>	148
4.5.1	Von den Transkriptiondaten zur Analyse der Translation	148
4.5.2	Akzessorische Proteine des Haupt-Cellulosesynthase-Operons zeichnen sich durch besonders erhöhte Proteinsynthese aus.....	149
4.5.3	BcsD als zentrales Protein des Haupt-Cellulosesynthase-Operons .	152
4.5.4	Hierarchie der drei Cellulosesynthase-Gencluster	153
4.5.5	Beitrag des zweiten Cellulosesynthase-Clusters und Auswirkungen der Deletionen auf dessen Proteinsynthese	154
4.5.6	Auswirkung der Deletionen der Cellulosesynthesen auf die Abundanzen weiterer Proteine	155
4.6	Regulation der Cellulosesynthese – cyclisches di-GMP	157
5.	Fazit und Ausblick	161
6.	Literaturverzeichnis	164
7.	Anhang	XV
7.1	Abbildungsverzeichnis	XV
7.2	Tabellenverzeichnis	XVII
7.3	Tabellen.....	XIX
7.4	Abbildungen	XXVII

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Liebl bedanken, dass ich meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchführen durfte sowie für die interessanten und motivierenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Kay Schneitz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitz, wie auch Herrn Prof. Dr. J. Philipp Benz dafür, dass er diese Arbeit als mein Zweitprüfer kontrolliert.

Dr. Armin Ehrenreich danke ich für die gute Betreuung während meiner Zeit am Lehrstuhl, für die vielen Diskussionen und Denkanstöße während der Besprechungen und für die Durchsicht meiner Dissertation.

Diese Arbeit wäre ohne eine Zusammenarbeit und großer Hilfsbereitschaft an anderen Lehrstühlen nicht möglich gewesen. Darum möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas Klingl, Jennifer Grünert und Conny Niemann (Pflanzliche Entwicklungsbiologie, LMU) für die wundervolle Visualisierung der Cellulosenetze im Rasterelektronenmikroskop danken. Prof. Dr. Tina Ludwig (BayBioMS) danke ich für die Proteomikmessungen und die bereichernden Diskussionen, vor allem wenn es mal schnell gehen musste. Prof. Dr. Cordt Zollfrank und Martin Reimer (Lehrstuhl Biogene Polymere, TUM Campus Straubing) danke ich für die Durchführung der physiokochemischen Charakterisierung der Cellulose. Bei Thekla Alpers (Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, TUM) bedanke ich mich sehr für jede Unterstützung bei den rheologischen Messungen. Ich bedanke mich außerdem bei allen, die mir die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Cellulose ermöglicht haben, das sind: Prof. Dr. Illona Grunwald Kadow, Anja Friedrich und Heidi Miller-Mommerskamp (Professur für Neuronale Kontrolle des Metabolismus, TUM); Prof. Ramon Torres Ruiz und Katrin Wassmer (CALM/ Center for Advanced Light Microscopy, TUM).

Ein besonderer Dank geht an Helga und Sibylle für ihre technische und organisatorische Unterstützung im Laboralltag, ohne die schon längst alles im Chaos versunken wäre. Josef „Sepp“ Reischenbeck danke ich sehr für sämtliche feinmechanischen Lösungen, die dazu beigetragen haben feuchte Celluloseproben für die Messungen zu bändigen. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Melli

Danksagung

bedanken, wir haben uns damals gemeinsam auf den Weg der Dissertation begeben, viel zusammen gelacht, uns unterstützt und manchmal auch geschimpft.

Mein Dank gilt auch allen weiteren ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Ehrenreich und des Lehrstuhls für Mikrobiologie für alle lustigen Gespräche und die schöne und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte an dieser Stelle auch allen meinen ehemaligen Studentinnen und Studenten, Tarik, Johannes, Andreas, Patrick, Kathi, Tanja, Riema, Max und Sonja (ihr habt es gleich zweimal mit mir ausgehalten), Judith, Niels und Betti, danken. Es hat viel Spaß gemacht mit euch zusammen zu arbeiten und ich wünsche euch weiterhin viel Erfolg bei euren eingeschlagenen Lebenswegen.

Da das Leben nicht nur aus Arbeit besteht möchte ich mich hier auch kurz bei meinen Freunden für ihre Unterstützung und die immer spaßige Zeit zusammen bedanken! Insbesondere bei dir, Sophie, vielen Dank für die Geduld, das gute Zureden und jede Unterstützung in den letzten Jahren. Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, bedanken. Danke, dass ihr immer hinter mir gestanden und mich bei allem unterstützt habt!

Abstract

Bacterial cellulose is a natural form of cellulose which is formed by various bacterial species and represents a major constituent of the 'mother of vinegar' of acetic acid bacteria. The bacterial cellulose offers a multitude of possible applications, spanning biotechnology, biomedicine, and food technology. Due to the high degree of homology to the cellulose synthase complex of plants, the bacterial cellulose synthesis serves as a model to study the general enzymology of cellulose synthesis. Especially, cellulose synthesis in acetic acid bacteria like *Komagataeibacter hansenii* strains is often used for this purpose. *K. hansenii* strains are well-characterized high-cellulose-producing bacteria and were of special interest during this study. Though sharing a homologous genetic organization of their three cellulose synthesis operons, respectively gene clusters with associated genes for accessory proteins, which have different size and complexity, the strains *K. hansenii* ATCC 23769 and *K. hansenii* ATCC 53582 differ strongly in the speed of cellulose formation and in the amount of cellulose synthesized. To analyze the contribution of each of the three cellulose synthase genes, and to overcome the drawbacks of previously established transposon mutants, the *codBA*-counterselection system was used to construct markerless in-frame deletions of *bcsAB1*, *bcsAB2* and *bcsAB3*. Single as well as double deletions were used to assess the individual contribution of the remaining cellulose synthase genes and their combined function. Moreover, the effects of the acetyl transferase *bcsY* – encoded within the second cellulose synthase gene cluster – on cellulose modification as well as the contribution of the regulatory diguanylate cyclases *dgcA* and *dgcB* on biofilm formation were assessed.

For the first time, this work was able to show that the main cellulose synthase BcsAB1 is the only cellulose synthase required the formation of microcrystalline cellulose fibers of *K. hansenii* ATCC 23769 and the high-producing *K. hansenii* ATCC 53582. The single expression of either BcsAB2 or BcsAB3 in *K. hansenii* ATCC 23769 resulted in synthesis of a not yet identified, probably non-fibrous extracellular polymeric substance (nfEPS) that was observed on the surface of the culture broth after static cultivation and in scanning electron microscopy analysis, and modifies the cellulose network. On the other hand, the single expression of *bcsAB2* or *bcsAB3* in

Abstract

K. hansenii ATCC 53582 did not show any visible EPS after static cultivation. Nevertheless, the contribution of the two additional cellulose synthases in altering the fiber appearance was apparent in scanning electron microscopy. This phenotype suggests these additional cellulose synthase genes *bcsAB2* and *bcsAB3* to contribute to a 'binder-like' substance affecting the density of the cellulose fiber network.

The genetics of cellulose synthesis were analyzed in more detail by additional transcription analysis and proteomic measurements. Both methods affirmed a different contribution of the three cellulose synthase genes respectively for both strains. On the one hand, all cellulose synthase genes were transcribed continuously over the incubation time in *K. hansenii* ATCC 23769 even showing a slightly higher relative transcription level of *bcsAB2* than *bcsAB1* and *bcsAB3*. On the other hand, *bcsAB1* of the high-producing *K. hansenii* ATCC 53582 was characterized by the significantly highest absolute transcription level of the cellulose synthase genes. However, the genes of the second gene cluster seem to increase the tensile strength of the synthesized cellulose sheets. These results were supported by the proteomic analysis. A remarkably low protein expression level of BcsAB3 was observed. Despite the observed transcription of the corresponding gene, no peptide was detected for both strains by the mass spectrometry measurements. Interestingly, the proteomic data suggested an extraordinary contribution of the accessory proteins of the main cellulose synthase (CmcAx, CcpAx and BglxA) and of BcsD on cellulose synthesis for both strains. Moreover, the characterization of the regulation of cellulose synthesis by the second messenger cyclic di-GMP could be linked to the expression of *dgcB* in both strains. While the diguanylate cyclase A showed no effect on cellulose formation in *K. hansenii* ATCC 23769, the deletion of its gene led to a significant reduction of cellulose synthesis in *K. hansenii* ATCC 53582. The results described in this thesis provide novel targets for rational tailoring of bacterial cellulose properties for future applications in biotechnology, biomedicine, and food technology.

Zusammenfassung

Bakterielle Cellulose ist eine natürlich vorkommende Form der Cellulose, welche von verschiedenen Bakterienarten gebildet wird. Sie ist ein Hauptbestandteil der von Essigsäurebakterien gebildeten Essigmutter. Bakterielle Cellulose bietet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, die von der Biotechnologie über die Biomedizin bis hin zur Lebensmitteltechnologie reichen. Aufgrund der hohen Homologie zum pflanzlichen Cellulosesynthase-Komplex dient die bakterielle Cellulosesynthese als Modell für die Untersuchung der allgemeinen Enzymologie der Cellulosesynthese. Hierfür wird insbesondere die Cellulosesynthese in Essigsäurebakterien wie in *Komagataeibacter hansenii*-Stämmen verwendet. *K. hansenii*-Stämme, die gut charakterisiert sind und sich durch eine besonders große Menge an gebildeter Cellulose auszeichnen, standen im Zentrum dieser Arbeit. Trotz eines homologen genetischen Aufbaus ihrer drei Cellulosesynthase-Operons bzw. -Genclustern mit zugehörigen Genen für akzessorische Proteine, die sich hinsichtlich ihrer Größe und Komplexität unterscheiden, unterscheiden sich die Stämme *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 deutlich in der Geschwindigkeit der Cellulosebildung und in der Menge der synthetisierten Cellulose. Um die spezifischen Aufgaben jedes der drei Cellulosesynthase-Gene zu analysieren und um die Nachteile früherer Studien mit Transposon-Mutanten zu überwinden, wurden mit Hilfe des *codBA*-Gegenselektionssystems markerfreie *in-frame* Deletionen von *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* hergestellt. Sowohl Einzel- als auch Doppeldelationen der Cellulosesynthase-Gene wurden verwendet, um den individuellen Beitrag des/der verbliebenen Gens/Gene sowie deren kombinierte Funktion zu ermitteln. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen der Acetyltransferase BcsY, die im zweiten Cellulosesynthase-Gencluster kodiert wird, auf die Cellulose-Modifikation sowie der Beitrag der regulatorischen Diguanylatcyclasen DgcA und DgcB zur Biofilmbildung untersucht.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sowohl in *K. hansenii* ATCC 23769, als auch im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 die Haupt-Cellulosesynthase *bcsAB1* die einzige Cellulosesynthase ist, die für die Bildung der Cellulosefasern verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu führt die alleinige Expression von *bcsAB2* oder von *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCC 23769 gemäß

Zusammenfassung

elektronenmikroskopischer Analyse zu einem scheinbar nicht-faserigen Phänotyp. Die freigesetzte, noch genauer zu charakterisierende, nicht-fibrilläre extrazelluläre polymere Substanz (nfEPS), die nach unbewegter, statischer Kultivierung an der Mediumsoberfläche und in rasterelektronenmikroskopischen Analysen sichtbar ist, wirkt sich modifizierend auf das Cellulose-Netzwerk aus. Dagegen führt die alleinige Expression von *bcsAB2* oder *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCC 53582 nach stehender Kultivierung zu keiner sichtbaren extrazellulären polymeren Substanz (EPS). Dennoch konnte der Beitrag der zusätzlichen Cellulosesynthasen (*bcsAB2*, *bcsAB3*) zur Modifikation des Faseraufbaus aus einzelnen Mikrofibrillen aufgrund der Aufnahmen durch Rasterelektronenmikroskopie dargestellt werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass diese zusätzlichen CS-Gene eine ‚bindemittelähnliche‘ Substanz bilden, die die Dichte des Cellulose-Faser-Netzwerks beeinflusst.

Die Genetik der Cellulosesynthese wurde durch zusätzliche Transkriptionsanalysen und eine relative Quantifizierung des Proteoms im Detail analysiert. Beides bekräftigte den unterschiedlichen Beitrag der drei Cellulosesynthase-Gene in beiden Stämmen. In *K. hansenii* ATCC 23769 wurden alle Cellulosesynthase-Gene über die Inkubationszeit hinweg kontinuierlich transkribiert, wobei die Transkription von *bcsAB2* sogar etwas stärker war als die von *bcsAB1* und *bcsAB3*. Andererseits war *bcsAB1* im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 durch die signifikant höchste Transkription und Proteinbildung aller Cellulosesynthase-Gene gekennzeichnet. Die Gene des zweiten Clusters scheinen jedoch die Zugfestigkeit der synthetisierten Cellulosefasern zu erhöhen. Die Proteinsynthese von BcsAB3 war erstaunlich niedrig, denn trotz festgestellter Transkription des Gens in beiden Stämmen konnte kein Peptid in den massenspektrometrischen Messungen detektiert werden. Interessanterweise weisen die Proteomdaten für beide Stämme auf einen bemerkenswerten Beitrag der akzessorischen Proteine der Haupt-Cellulosesynthase (CmcAx, CcpAx und BglxA) sowie von BcsD zur Cellulosesynthese hin. Darüber hinaus konnte die Charakterisierung der durch den Botenstoff cyclisches di-GMP induzierten Regulation der Cellulosesynthese in beiden Stämmen mit der Expression von *dgcB* in Verbindung gebracht werden. Während die Diguanylatcyclase A keine Auswirkungen auf die Cellulosebildung in *K. hansenii* ATCC 23769 hatte, zeigte deren Deletion eine signifikante Reduktion der Cellulosesynthese in *K. hansenii* ATCC XVIII

Zusammenfassung

53582. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse können zukünftig für die zielgenaue Modifikation von bakterieller Cellulose eingesetzt werden, um so neue Anwendungen in der Biotechnologie, Biomedizin und Lebensmitteltechnologie zu ermöglichen.

Publikationen

Peer-reviewed Zeitschriften

Martin Bimmer, Markus Mientus, Andreas Klingl, Armin Ehrenreich, Wolfgang Liebl (2022). The Role of the Various Cellulose Biosynthesis Operons in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. *Applied and Environmental Microbiology* 88(7):e0246021. Doi: 10.1128/aem.02460-21 (Ausgewählt als ‚Spotlight‘ Artikel der Ausgabe)

Martin Bimmer, Martin Reimer, Andreas Klingl, Christina Ludwig, Wolfgang Liebl, Armin Ehrenreich (2023). Analysis of cellulose synthesis in a high-producing acetic acid bacterium *Komagataeibacter hansenii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 107, 2947–2967 (2023). Doi: 10.1007/s00253-023-12461-z

Weitere Publikationen

Martin Bimmer, Wolfgang Liebl, Armin Ehrenreich (2023). Bakterielle Cellulose – ein Netzwerk gestaltet von drei Cellulosesynthesen. *BIOspektrum* 29(2):218-220. Doi:10.1007/s12268-023-1908-9

Beiträge zu Fachtagungen

Vorträge

Martin Bimmer, Genetic analysis of cellulose synthesis in acetic acid bacteria. 5th International Conference on Acetic Acid Bacteria, Freising, Germany, 4th – 7th September 2018.

Martin Bimmer, Gerhard Wanner, Wolfgang Liebl, Armin Ehrenreich, Genetic analysis of cellulose synthesis in acetic acid bacteria, Annual Meeting 2020 – Association for General and Applied Microbiology, Leipzig, Germany, 8th – 11th March 2020.

Poster-Beiträge

Martin Bimmer, Wolfgang Liebl, Armin Ehrenreich, Genetic analysis of cellulose synthesis in acetic acid bacteria, Annual Meeting 2019 – Association for General and Applied Microbiology, Mainz, Germany, 17th – 19th March 2019.

Martin Bimmer, Simone Gruber, Wolfgang Liebl, Armin Ehrenreich, Acetic acid bacteria strain library screening for best oxidizers of different antibiotic classes, Annual Meeting 2020 – Association for General and Applied Microbiology, Leipzig, Germany, 8th – 11th March 2020.

Martin Bimmer, Christina Ludwig, Andreas Klingl, Wolfgang Liebl, Armin Ehrenreich, Characterization of the cellulose synthesis genes of two *Komagataeibacter hansenii* strains, Annual Meeting 2022 – Association for General and Applied Microbiology, Düsseldorf, Germany, 20th – 23rd February 2022, online.

Angeleitete Abschlussarbeiten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die folgenden Abschlussarbeiten geplant, angeleitet und ausgewertet und sind somit ein relevanter Teil-Aspekt des Promotions-Projekts. Die Arbeiten sind entsprechend ihrer zeitlichen Entstehung geordnet.

Name	Art	Titel
Johannes Heipke	Bachelor	Konstruktion von restriktionsnegativen Mutanten Cellulose produzierender Essigsäurebakterien
Tanja Quadt	Bachelor	Charakterisierung des Promotors des Gens für Cellulosesynthese von <i>Komagataeibacter hansenii</i>
Riema Shareef	Master	Characterization of the Oxidation of Several Antibiotics by Membrane- Bound Dehydrogenases (eng.)
Judith Bauer	Bachelor	Deletion der Kanalproteine des Cellulosesynthese Komplex in <i>Komagataeibacter hansenii</i>
Maximilian Ebert	Master	Analysis of Cellulose Synthase Operon Expression in Strains of <i>Komagataeibacter</i> (eng.)
Sonja Magosch	Master	Oxidation of Antibiotics by Acetic Acid Bacteria (eng.)
Niels Tephö	Bachelor	Einfluss zusätzlicher Kanalproteine auf den Biofilm in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 – Konstruktion von Deletionsmutanten
Bettina Dietmair	Bachelor	Effekt membranständiger Acetyltransferasen in cellulosebildenden Essigsäurebakterien auf Produktmodifikation bzw. Enzymregulation

1. Einleitung

1.1 Die Biologie von Essigsäurebakterien

Essigsäurebakterien werden systematisch zu den Alphaproteobacteria innerhalb der Ordnung der *Rhodospirillales* eingeordnet (Sievers and Swings 2005). Die Familie *Acetobacteraceae* umfasst derzeit 47 Gattungen entsprechend der ‚*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)*‘ (aufgerufen am 06.05.2022; Parte et al. (2020)). Die den jeweiligen Gattungen zugeordnete Anzahl an erfassten Arten variiert stark und zeichnet die große Vielfalt der Merkmale der *Acetobacteraceae* aus. Allen Vertretern gemein ist die stäbchenförmige Zellform, eine strikt aerobe Lebensweise und eine Gram-negative Zellwand (Kerstens et al. 2006). Darüber hinaus setzen die meisten Essigsäurebakterien (außer *Asaia*) nach der Oxidation von Ethanol Essigsäure frei und akkumulieren diese im Kulturmedium. Die Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten ist ein besonderer Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterienarten, die um dieselben Nährstoffe konkurrieren. Stämme von u. a. *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* und *Acidomonas* sind in der Lage, Ethanol durch Umwandlung von Acetat in CO₂ und H₂O zu ‚überoxidieren‘. Bei *Gluconobacter* ist diese Fähigkeit jedoch nicht vorhanden, und bei *Asaia* und *Kozakia* ist diese Aktivität relativ schwach ausgeprägt (Deppenmeier and Ehrenreich 2009). Alle Vertreter der *Acetobacteraceae* können durch den Besitz von *Ubichinon-10* charakterisiert werden, außer Mitglieder der Gattung *Acetobacter*, die *Ubichinon-9* verwenden (Kerstens et al. 2006).

Die Lebensräume der *Acetobacteraceae* lassen sich in Nischen mit hohem Zuckergehalt wie vergorene Früchte, Blütennektar bzw. mit hohem Alkoholgehalt wie Bier, Wein und Sake und als Symbionten mit Honigbienen einteilen (Crotti et al. 2010; Gupta et al. 2001; Kerstens et al. 2006). Im Jahr 2006 wurde *Granulibacter bethesdensis* (Greenberg et al. 2006a; Greenberg et al. 2006b) aus Patienten mit chronischer granulomatöser Erkrankung isoliert. Dieser Organismus scheint gegen mehrere Mechanismen der angeborenen Immunantwort resistent zu sein (Zarembek et al. 2012). Eine spezifische strukturelle Zusammensetzung des Lipid-A-Glykolipids könnte eine Immunumgehung bewirken und die Resistenz gegen antimikrobielle

Einleitung

Peptide verstärken (Muszyński et al. 2021). Während alle anderen Vertreter der *Acetobacteraceae* bisher als nicht-pathogen eingestuft wurden, scheint dieser Stamm das einzige pathogene Mitglied der Familie zu sein. Ein weiterer interessanter Aspekt von Essigsäurebakterien ist, dass einzelne Vertreter einiger Gattungen (*Gluconacetobacter*, *Swaminathania* und *Acetobacter*) Stickstoff fixieren können und für das Wachstum von Pflanzen wie Zuckerrohr, Kaffee oder Reis von Nutzen sein können (Pedraza 2008; Reis and Teixeira 2015).

Essigsäurebakterien zeichnen sich durch eine besondere Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen von Essigsäure und Ethanol in der Umgebung aus. Während das Wachstum vieler Bakterien bei einer Essigsäurekonzentration von 0,5% gehemmt wird, können viele Essigsäurebakterien unter diesen Bedingungen noch wachsen. Die hohe Essigsäuretoleranz ist ein wichtiger ökologischer Vorteil in ihrer Nische gegenüber konkurrierenden Arten (Conner and Kotrola 1995; Trček and Barja 2015). Verschiedene Mechanismen für die Toleranz gegenüber Essigsäure werden diskutiert, z. B. durch die Erhöhung der Enzyme für die Assimilation der Essigsäure oder von Transportmechanismen sowie durch eine Umgestaltung der Zellmembranzusammensetzung und der Zellmorphologie (Nakano and Fukaya 2008; Wang et al. 2015).

Die klassische Taxonomie, welche Stämme nach morphologischen und physiologischen Merkmalen einordnet, wurde durch die Einführung der 16S rRNA-Sequenzierung weiterentwickelt und führte zu mehreren Umstrukturierungen innerhalb der *Acetobacteraceae*. Die Anzahl der Gattungen innerhalb der Familie *Acetobacteraceae* ist in weniger als 15 Jahren von 10 im Jahr 2008 (Yamada and Yukphan 2008) auf 47 im Jahr 2022 (LPSN, aufgerufen am 06.05.2022; Parte et al. (2020)) erheblich gestiegen. Insbesondere die Gattung der beiden Stämme, die in dieser Arbeit analysiert werden, war häufiger Gegenstand von Umbenennungen. Im Jahr 2008 war die Gattung *Gluconacetobacter* eine der 10 benannten Gattungen und wurde phylogenetisch in die folgenden zwei Gruppen unterteilt: *Gluconacetobacter liquefaciens* und *Gluconacetobacter xylinus* (Yamada and Yukphan 2008). Eine weitere Bewertung der 16S rRNA-Sequenzen der beiden Gruppen ergab jedoch, dass die beiden Gruppen weniger identisch sind als die in anderen Gattungen

Einleitung

zusammengefassten Mitglieder. Die Bootstrap-Werte waren relativ niedrig, unabhängig davon, ob sie nach den ‚Neighbor Joining‘-Algorithmen, dem ‚Maximum Parsimony‘-Verfahren oder der ‚Maximum Likelihood‘-Methode berechnet wurden (70, 74 bzw. 60 %) (Yamada and Yukphan 2008) und deuteten bereits auf eine Trennung der Gattungen hin. Im Jahr 2012 wurde die neue Gattung *Komagatabacter* (sic!) eingeführt (Yamada et al. 2012b), die die zuvor genannte Gruppe *Gluconacetobacter xylinus* enthält, dagegen *Gluconacetobacter liquefaciens* in der Gattung *Gluconacetobacter* belässt. Die Hauptkriterien für die Unterscheidung von *Gluconacetobacter xylinus* waren neben der geringen Clusterbildung (siehe oben) nicht-motile Zellen, keine Produktion eines wasserlöslichen braunen Pigments, keine strikte Pflanzenassoziation, die Produktion von Essigsäure aus Ethanol und die Überoxidation von Acetat (Yamada et al. 2012b). Eine Verfeinerung der Gattung zu *Komagataeibacter* wurde kurz darauf vorgenommen (Yamada et al. 2012a). Neben der 16S-23S rRNA-Sequenzierungstechnik wurde die MALDI-TOF-MS von Proteinen für die Identifizierung neuer Stämme aus verschiedenen Lebensräumen relevant (Trček and Barja 2015). Vor kurzem wurde die Reklassifizierung des Genus zu *Novacetimonas hansenii* vorgeschlagen (Brandão et al. 2022).

Essigsäurebakterien können zur Herstellung von Lebensmitteln und Getränken wie dem philippinischen Nachtisch *Nata de Coco* oder dem immer größere Beliebtheit erreichenden Kombucha verwendet werden. Sie sind allerdings auch Verderber von Bier und Wein und verursachen einen unerwünschten Essiggeschmack (Bartowsky and Henschke 2008; Bernardo et al. 1998; Raspor and Goranovič 2008). Die Verwendung von Essigsäurebakterien in der so genannten Essigmutter zur Essigherstellung hat eine lange Geschichte, die sich über Jahrtausende zurückverfolgen lässt. Die Babylonier stellten etwa 3.000 v. Chr. durch Fermentation der Früchte und des Saftes der Dattelpalme Essig her und nutzten unbewusst die Vorteile der Ansäuerung durch Essigsäurebakterien (Bourgeois and Barja 2009). Die Essigbildung ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels von Hefen, die Zucker in Alkohol umwandeln (z. B. Traubensaft zu Wein), und *Acetobacteraceae*, die anschließend Ethanol zu Essigsäure oxidieren (Raspor and Goranovič 2008). Die erste Identifizierung von Essigsäurebakterien als Hauptorganismen in der Essigmutter und ihrer Zusammensetzung aus Cellulose erfolgte jedoch erst im späten 19. Jahrhundert

Einleitung

durch Pasteur und Brown (Brown 1886; Pasteur 1864). Die Bildung des Biofilms, der Essigmutter, an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche im traditionellen Produktionsprozess (Orléans-Acetator) wird heutzutage nur noch selten verwendet und ist meist auf hochwertige Essige beschränkt, die sich auf die organoleptische Komplexität konzentrieren (Mas et al. 2014). Meistens wurde diese Methode durch schnelle Produktionsverfahren ersetzt, wie die submerse Fermentation in einem Frings-Acetator. Luftblasen, welche durch eine Turbine erzeugt werden, schaffen so eine besonders große Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, um den hohen Sauerstoffbedarf von Essigsäurebakterien zu decken. Durch den beschriebenen technischen Fortschritt konnte die durchschnittliche Produktionszeit für Essig von mehreren Monaten auf Tage reduziert (Bourgeois and Barja 2009) und die Essigsäurekonzentration auf bis zu 25 % erhöht werden (Mas et al. 2014). Das Erreichen derart hoher Konzentrationen von Essigsäure in diesen biotechnologischen Prozessen demonstriert eindrücklich die außergewöhnliche Essigsäureresistenz der eingesetzten Stämme von Essigsäurebakterien.

Biotechnologische Anwendung von Essigsäurebakterien

Essigsäurebakterien stellen sehr attraktive Organismen für biotechnologische Anwendungen dar, insbesondere aufgrund ihrer hohen regio- und stereospezifischen unvollständigen Oxidationsaktivität für verschiedene Substrate wie Zucker, Polyole und Alkohole sowie einige verwandte Verbindungen (Deppenmeier and Ehrenreich 2009; Sievers and Swings 2005). Dabei bieten sie eine besonders günstige Alternative zu klassischen chemischen Reaktionen, welche durch eine geringere Spezifität und Effizienz bei Modifikation der genannten Stoffklassen gekennzeichnet sind (Deppenmeier et al. 2002; Gupta et al. 2001). Ihre geringe Biomassebildung bei gleichzeitig hoher Oxidationsaktivität ihrer membrangebundenen Dehydrogenasen, sowie ihre sehr hohe Osmotoleranz führt dazu, dass *Gluconobacter oxydans*-Stämme in der Biotechnologie häufig für die umweltfreundliche Produktion verschiedener auf Zuckern basierter Verbindungen eingesetzt werden, z. B. für die Vitamin-C-Synthese, die Produktion kalorienarmer Süßstoffe und die Herstellung von Gluconsäure (Deppenmeier et al. 2002; García-García et al. 2017; Raspor and Goranovič 2008). Membrangebundene Dehydrogenasen mit einem zum Periplasma hin gerichteten

Einleitung

katalytischen Zentrum sind die Schlüsselenzyme der beschriebenen schnellen Oxidationsreaktionen (Deppenmeier et al. 2002). Im Genom von *Gluconobacter oxydans* 621H, einem in unserer Arbeitsgruppe intensiv untersuchten Stamm, sind acht solcher Dehydrogenasen mit einem charakterisierten Substratspektrum kodiert, und zwei weitere membranständige Dehydrogenasen mit noch unbekannter Funktion (Burger et al. 2019; Mientus et al. 2017; Peters et al. 2013).

1.2 Exopolysaccharide in Essigsäurebakterien

Die Familie der *Acetobacteraceae* zeichnet sich durch die Synthese verschiedener Exopolysaccharide aus. Diese EPS (extrazellulären polymeren Substanzen) sind auf unterschiedliche Art und Weise zusammengesetzt, basieren auf Homo- oder Heteropolymeren und gehen meist auf das Vorkommen von Essigsäurebakterien in ihrer ökologischen Nische, der Oberfläche u. a. von Früchten, zurück. Da Essigsäurebakterien strikt aerobe Bakterien sind, ist die Biofilmbildung ein wichtiger Mechanismus, um durch die Anhaftung an der Oberfläche die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu verbessern. Andere Eigenschaften, wie der Schutz der Zellen vor Strahlung (UV-Licht), Chemikalien und Austrocknung werden bei der Bewertung der unterschiedlichen Lebensräume ebenfalls deutlich. Darüber hinaus verbessert die Ansammlung der Zellen in einem Biofilm den Zell-Zell-Kontakt und das Quorum Sensing des Konsortiums (Jayaraman and Wood 2008; Tonouchi 2016). Eine Analyse von unter Laborbedingungen spontan entstandenen Mutationen untermauert die Notwendigkeit der Biofilmbildung im natürlichen Lebensraum. Die unter Laborbedingungen entstandenen Mutationen führen zum Verlust der EPS-Bildung, aber nicht zu einer Verschlechterung des bakteriellen Wachstums (Tonouchi 2016).

Bei freigesetztem EPS kann es sich um eine Vielzahl an Polymeren handeln, die in direktem Zusammenhang mit den unterschiedlichen Gattungen stehen. Beispielsweise sind Dextran und Levan charakteristisch für eine Vielzahl an *Gluconobacter*-Stämmen (Deppenmeier and Ehrenreich 2009). Andere Stämme wie *A. pasteurianus* (NBRC3284) bilden einen Biofilm, der Glucose und Rhamnose in einem äquimolaren Verhältnis enthält (Tonouchi 2016). Dagegen ist Acetan ein wasserlösliches Polymer aus Glucose, Mannose, Glucuronsäure und Rhamnose, welches zuerst im Überstand einer Kultur von *A. xylinum* nachgewiesen wurde (Couso et al. 1987; Trček et al. 2021). Cellulose hingegen ist ein Homopolysaccharid, das in den letzten zehn Jahren zunehmend in den Fokus gerückt ist. Es wird von mehreren *Komagataeibacter*-Stämmen produziert, darunter fallen die hier analysierten *K. hansenii* Stämme, aber auch *K. medellinensis* und *K. sucrofermentans* (Iguchi et al. 2000; Ryngajłło et al. 2019; Yamada et al. 2012a).

1.3 Cellulose – ein besonderes Polymer aus Pflanzen und Bakterien

Cellulose ist das am häufigsten vorkommende natürliche Polymer, da es den größten Anteil an der Zellwand von Pflanzen, etlichen Algengruppen und den Oomyceten hat. Es besteht aus Glukoseeinheiten, die durch β -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind und als kleinste, sich wiederholende Grundeinheit Cellobiose besitzen (Abbildung 1). Auch einige Bakterien sind in der Lage Cellulose zu synthetisieren, dazu zählen u. a. *Agrobacterium radiobacter* (syn. *A. tumefaciens*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, sowie Essigsäurebakterien der Gattung *Komagataeibacter*. Eine wichtige Gemeinsamkeit zwischen pflanzlicher und bakterieller Cellulosesynthese ist die Homologie des Cellulosesynthese-Apparats. Die bakteriellen Cellulosesynthase (CS)-Gene weisen große Ähnlichkeiten zu den CS-Genen in Pflanzen (CESA) wie dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* auf, weshalb die Untersuchung der Cellulosesynthese von Bakterien von großer Bedeutung für ein besseres Verständnis der Grundlagen der Cellulosesynthese allgemein ist (Kumar and Turner 2015a). Die unvorstellbar große Menge an Cellulose, die von Pflanzen synthetisiert wird, könnte darauf hindeuten, dass Cellulose primär pflanzlichen Ursprungs ist. Neuere Arbeiten weisen jedoch auf einen (cyano-) bakteriellen Ursprung der Cellulosesynthese hin (Nobles and Brown 2004; Nobles et al. 2001).

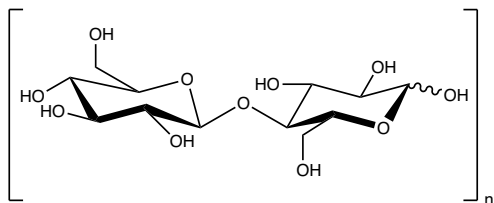


Abbildung 1. Cellobiose, die sich wiederholende Grundeinheit der Cellulose (Brown et al. 1976)

In *Arabidopsis thaliana* und den meisten anderen Pflanzenarten sind mehrere CS-Gene an der Zellwandsynthese beteiligt, was es schwierig macht, den entsprechenden CS-Komplex im Detail zu untersuchen (Richmond 2000). Außerdem war es viele Jahre lang nicht möglich, einen funktionellen CS-Komplex aus Pflanzen zu reinigen (Kumar and Turner 2015a). Erst vor kurzem gelang es, mehrere Cellulosesynthasen aus grünem Bambus (*Bambusa oldhamii*) in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog zu exprimieren (Huang and Cheng 2019). Um diese

Einleitung

Schwierigkeiten zu umgehen, diene der leichter zu reinigende bakterielle Cellulosesynthase-Komplex als Modell für detaillierte Untersuchungen zur Synthese pflanzlicher Cellulosesynthese. Der besondere Vorteil bakterieller Studien liegt hierbei in den im Grundsatz bereits langjährig etablierten genetischen Systemen zur Analyse unterschiedlichster Stoffwechselwege in Prokaryoten sowie in deren leichter Zugänglichkeit und höherer Wachstumsgeschwindigkeit. Die Tatsache, dass bakterielle Cellulose (BC) frei von zusätzlichen Polymeren wie Hemicellulose, Pektin und Lignin sowie von Proteinen ist, macht sie besonders geeignet für die Grundlagenforschung, sowie für biotechnologische und biomedizinische Anwendungen (Lampugnani et al. 2018).

Natürlich vorkommende Cellulose kann im Allgemeinen in Cellulose des Typs I und des Typs II eingeteilt werden, wobei Typ I die vorherrschende Struktur ist. Cellulose vom Typ I wird durch zwei Polymorphe weiter spezifiziert: Typ Ia, wenn sie von Bakterien oder Algen produziert wurde, und Typ Ib, wenn sie von höheren Pflanzen produziert wurde (French and Johnson 2007; Sugiyama et al. 1991). Der polymorphe Charakter der natürlichen Cellulose ist mit der Ordnung innerhalb von Komplexen des Makromoleküls verbunden. Neben den dicht gepackten Bereichen mit elementaren Fibrillen (kristalline Cellulose) gibt es auch Bereiche mit geringerer Dichte und einem eher fransigen Charakter der Fasern (amorph). Darüber hinaus kann auch eine intermediäre Form der Cellulosestruktur beobachtet werden, die jedoch aufgrund ihrer geringen Abundanz meist vernachlässigt wird (Wüstenberg 2014). Cellulose vom Typ II ist eine stabile Form der Cellulose, die aus regenerierten/mercerisierten Cellulose-Fasern durch eine nicht-reversible Behandlung mit wässriger NaOH gewonnen wird (Wüstenberg 2014). Nur seltene Fälle von natürlicher Synthese von Cellulose II werden für einige Bakterien berichtet (French and Johnson 2007). Unter anderem wurde auch von einem mutierten Stamm von *K. xylinus* berichtet, welcher in der Lage zu sein scheint Cellulose vom Typ II zu synthetisieren (Kuga et al. 1993). Andere chemische Behandlungen können für eine weitere Modifikation der Cellulose und die Erzeugung von Cellulose III und Cellulose IV eingesetzt werden (Newman 2008; O'Sullivan 1997).

1.4 Synthese Bakterieller Cellulose

1.4.1 Einführung

Bakterielle Cellulose (BC) unterscheidet sich von Cellulose pflanzlichen Ursprungs durch einen wesentlich geringeren Durchmesser der Fasern, obwohl die genetische Organisation des Synthesekomplexes ähnlich ist (Ohad and Danon 1964; Ohad et al. 1962). Der Durchmesser der bakteriellen Cellulosefibrille beträgt im Mittel etwa 80 x 4 nm (Iguchi et al. 2000). Einige Gattungen wie *Escherichia coli* oder *Agrobacterium radiobacter* (syn. *A. tumefaciens*) synthetisieren einen Biofilm bestehend aus Cellulose verbunden mit anderen EPS oder modifizierten Formen von Cellulose wie Phosphoethanolamin-Cellulose (Matthysse 2018; Thongsomboon et al. 2018). Ergänzend hierzu wurden bereits mehrere Arten von Essigsäurebakterien beschrieben, welche in der Lage sind große Mengen an bakterieller Cellulose zu produzieren (Costa et al. 2017; Deng et al. 2015; Park et al. 2003; Valera et al. 2015). Der Vorteil der von Essigsäurebakterien freigesetzten bakteriellen Cellulose liegt darin, dass diese als sehr kristalline Cellulose identifiziert wurde und so die Nachteile stärker amorpher Cellulose aus anderen Stämmen überwindet (Brown Jr. 2004; Brown 1996). Der kristalline Charakter der Cellulosefasern führt zu den vielversprechenden Eigenschaften von BC – wie einer hohen Zugfestigkeit, einer hohen Wasseraufnahmefähigkeit und einer geringen Immunogenität (Mohite and Patil 2014). Insbesondere biomedizinische Anwendungen profitieren von diesen Eigenschaften, allen voran das Tissue Engineering. So wurde von Klemm et al. (2001) erstmals die Verwendung von künstlichen Blutgefäßen beschrieben, die aus BC von *Acetobacter xylinum* gewonnen wurden. Die geringe Immunogenität und der hohe Wassergehalt werden außerdem in Kosmetika, bei der Verabreichung von Medikamenten und bei Wundverbänden nach schweren Verbrennungen genutzt (Mohamad et al. 2019; Perugini et al. 2020).

1.4.2 Metabolismus der Cellulosesynthese

Obwohl bakterielle Cellulose als Bestandteil der Essigmutter bereits erstmals von Pasteur (1864) beschrieben wurde und in der Lichtmikroskopie sichtbar ist, wurden erst in den vergangenen Jahrzehnten große Fortschritte bei der Aufklärung ihrer Biosynthese erzielt. Hierzu zählen u. a. die Visualisierung der Extrusionspore (Brown and Montezinos 1976), die erfolgreiche *in vitro*-Synthese von Cellulose (Ross et al. 1987) sowie erste Klonierungs- und Sequenzierungsansätze der Cellulosesynthasen (CS) (Saxena et al. 1990). Ferner wurde die Synthese von Cellulose als ein hierarchischer, mehrstufiger Prozess identifiziert. In diesem Prozess werden zunächst Elementarfibrillen (Protofibrillen) synthetisiert, die sich später zu Mikrofibrillen und Makrofibrillen zusammenlagern können (Benziman et al. 1980; Haigler et al. 1980; Iguchi et al. 2000; Koizumi et al. 2009; Lee et al. 2014; Ross et al. 1991). Der Aufbau der Makrostruktur des Cellulosenetzwerks wird hauptsächlich durch chemische Kräfte, wie die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte zwischen benachbarten Fibrillen angetrieben (Cousins and Brown 1995). Zuvor ist die intrazelluläre Maschinerie für das progressive Wachstum der Glucankette erforderlich. Die Synthese von Cellulose in Essigsäurebakterien geht von intrazellulärem Glucose-6-Phosphat aus. Dieses wird durch Phosphorylierung von Glucose durch eine ATP-abhängige Glucokinase oder nach Umwandlung von Fructose-6-Phosphat durch eine Phosphoglucoisomerase gebildet (Abbildung 2). Im weiteren Verlauf wird der Phosphatrest durch eine Phosphoglucomutase umgelagert, sodass Glucose-1-phosphat entsteht und abschließend durch eine UTP-abhängige UDP-Glucose-Pyrophosphorylase in UDP-Glucose umgewandelt, die für die Polymerisierung erforderliche aktivierte Form. Abschließend erfolgt die Verlängerung der Glucankette durch Anhängen von weiteren Glucoseresten von UDP-Glucose im aktiven Zentrum der Cellulosesynthase (Ross et al. 1991).

Einleitung

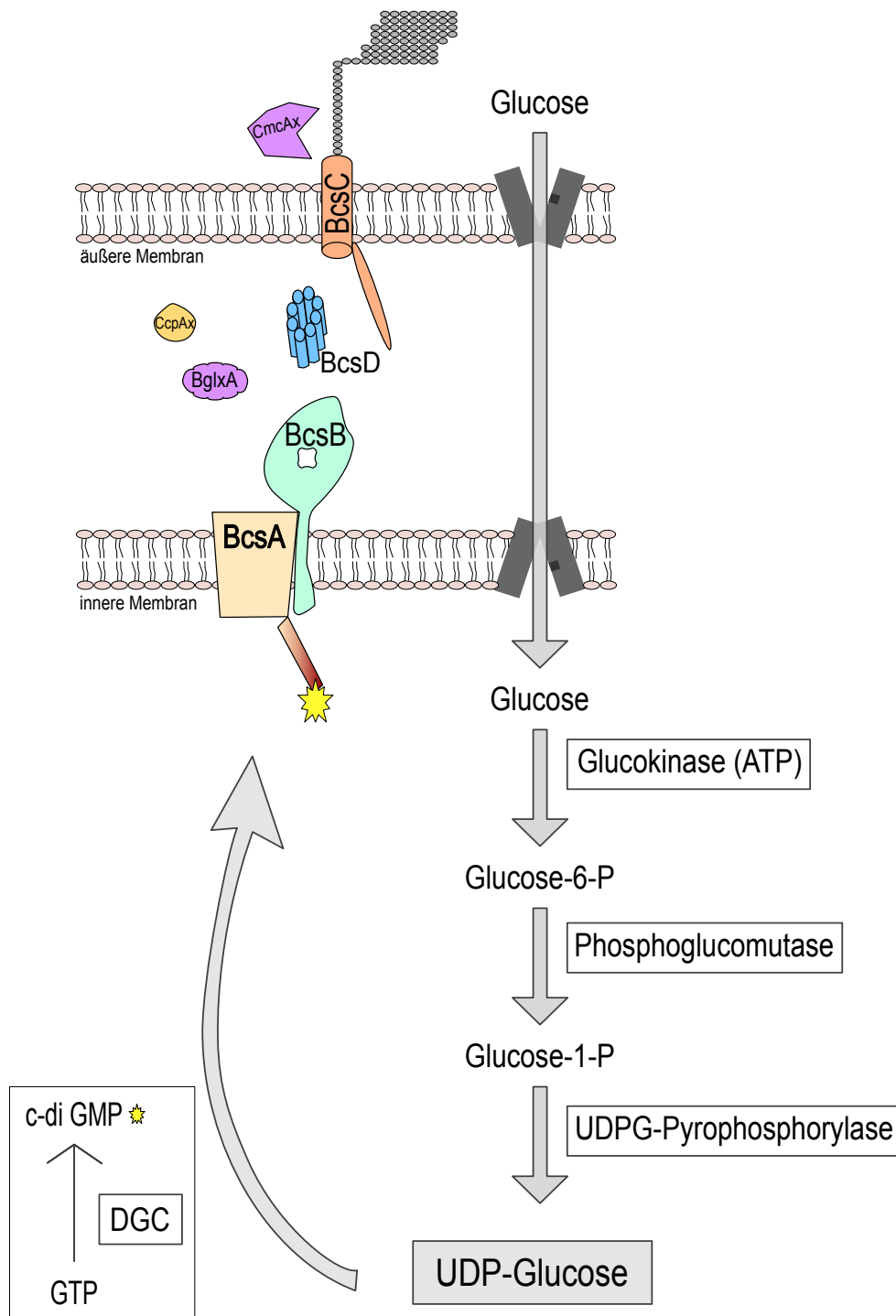


Abbildung 2. Schema bakterieller Cellulosesynthese in *K. hansenii*. Rechts: Glucose-Aufnahme über Transportproteine (graue Rechtecke) in der äußeren und inneren Membran und intrazelluläre Schritte zu deren Aktivierung. Links: Membranständiger Cellulosesynthase-Komplex. Cellulosesynthase BcsAB in der inneren Membran, Kanalprotein BcsC in der äußeren Membran und BcsD im Periplasma. An der Pilz-Domäne von BcsA (rötlicher Balken an BcsA) ist cyclisches di-GMP (gelber Stern) gebunden. Die Cellulosesynthase befindet sich in aktivierter Form und UDP-Glucose kann polymerisiert und über BcsC ausgeschleust werden. Die akzessorischen Proteine BglxA und CcpAx liegen im Periplasma bzw. CmcAx extazellulär vor. Box: Synthese von cyclischem di-GMP aus GTP durch Diguanylatcyclase. Erstellt nach Ross et al. (1991) und Abidi et al. (2021).

1.4.3 Der Cellulosesynthase-Komplex

Der CS-Komplex von Essigsäurebakterien ist ein membranständiger Multienzymkomplex, der in komplexen Genclustern in An- bzw. Abwesenheit von akzessorischen Proteinen kodiert wird. Während *K. hansenii* – Stämme drei CS-Gencluster exprimieren, kodieren andere Stämme wie *K. nataicola* nur zwei (Zhang et al. 2017) oder sogar vier Kopien (*K. rhaeticus* iGEM oder *K. medellinensis*) (Florea et al. 2016a; Hernández-Arriaga et al. 2019). Für *K. hansenii* konnte bisher lediglich für die Cellulosesynthase BcsAB1 die Kodierung in einem Operon experimentell nachgewiesen werden (Wong et al. 1990), für BcsAB2 und BcsAB3 wird daher nur eine Lokalisierung als Gencluster angenommen. Die allgemeine Struktur der CS-Operons variiert leicht in den verschiedenen Arten, ist aber besonders für *K. hansenii* im Detail beschrieben (siehe Römling and Galperin (2015) für eine ausführliche Übersicht). *K. hansenii* ATCC 23769 und ATCC 53582 kodieren an drei Loci jeweils ein CS-Gen (*bcsAB*) (*bacterial cellulose synthase*; in der Literatur auch als *acs*, *acetic acid bacteria cellulose synthase*, bezeichnet) und ein Kanalprotein (*bcsC*). Die Komplexität der drei (putativen) Operons variiert jedoch stark (siehe Abbildung 3; Abbildung 4). Auf dieser Tatsache basiert die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese, dass eine Hierarchie der Cellulosesynthase-Gencluster besteht. Diese geht von *bcsAB1* als Hauptoperon der Cellulosesynthase aus, welches um zwei untergeordnete Gencluster – Nebencluster 2 (*bcsAB2*) und Nebencluster 3 (*bcsAB3*) – ergänzt wird. Das Hauptoperon weist die typische Struktur des *bcsABCD*-Operons auf, einer Operonstruktur, welche zuerst in *Acetobacter xylinum* charakterisiert wurde (Bundalovic-Torma et al. 2020; Römling and Galperin 2015; Wong et al. 1990). Dem zweiten Gencluster (*bcsAB2*) hingegen fehlen *bcsD* und andere akzessorische Proteine, die *bcsAB1* benachbart sind. Umeda et al. (1999) beschrieben erstmals, dass hier außerdem noch *bcsY*, das Ähnlichkeiten zu Acetyltransferasen aufweist, und *bcsX*, ein noch nicht charakterisiertes Protein, kodiert werden. Interessanterweise ist das gesamte Cluster der zweiten Cellulosesynthase im Vergleich zu *K. hansenii* ATCC 23769 im Hochproduzenten ATCC 53582 invertiert. Das dritte Cellulosesynthase-Cluster (*bcsAB3*) ist in beiden Stämmen auf *bcsAB3* und *bcsC3* beschränkt.

Einleitung

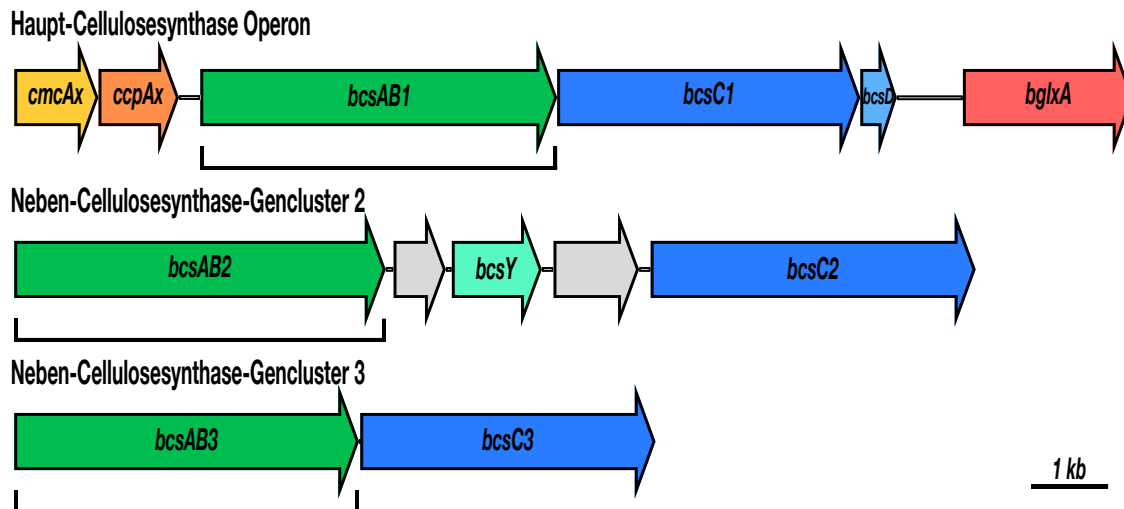


Abbildung 3. Struktur der Cellulosesynthese-benachbarten Gene und die Organisation der drei Gencluster in *K. hansenii* ATCC 23769. *cmcAx* - Carboxymethylcellulase, *ccpAx* - Cellulose-Komplementierungsfaktor, *bcsAB* - Cellulosesynthese, *bcsC* - Kanalprotein, *bcsD* - Cellulosesynthese-Untereinheit D, *bglxA* - β -Glucosidase, *bcsY* - Acetyltransferase. Die Klammern zeigen die Stelle der *in-frame*-Deletion an. (Bimmer et al. 2022)

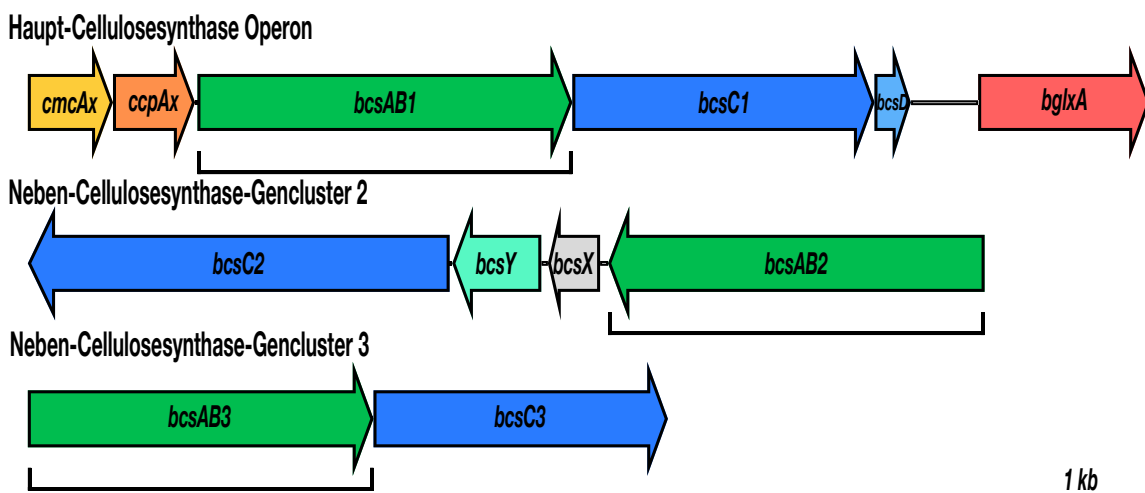


Abbildung 4. Struktur der Cellulosesynthese-benachbarten Gene und die Organisation in drei Genclustern in *K. hansenii* ATCC 53582. *cmcAx* - Carboxymethylcellulase, *ccpAx* - Cellulose-Komplementierungsfaktor, *bcsAB* - Cellulosesynthese, *bcsC* - Kanalprotein, *bcsD* - Cellulosesynthese-Untereinheit D, *bglxA* - β -Glucosidase, *bcsY* - Acetyltransferase, *bcsX* - uncharakterisiertes Protein. Die Klammern zeigen die Stelle der *in-frame*-Deletion an. (Bimmer et al. 2023)

Die Cellulosesynthese BcsAB und das Kanalprotein BcsC sind membranständige Proteine, die in der inneren bzw. äußeren Membran lokalisiert sind. Das letzte Element des Cellulosesynthese-Operons, BcsD, ist hingegen im Periplasma lokalisiert (siehe Abbildung 2). Für das akzessorische Protein CmcAx zeigten bereits Standal et al.

Einleitung

(1994) eine extrazelluläre Lokalisation. Dagegen sollen sich, wie von Sunagawa et al. (2013) beschrieben, die weiteren akzessorischen Proteine des ersten Cellulosesynthese-Operons, CcpAx und BglxA, im Periplasma befinden. Für BcsY und BcsX, Elemente im zweiten Cellulosesynthese-Cluster, konnte bisher experimentell noch keine Lokalisation bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese bioinformatisch mittels der Webanwendung *pSortB* für BcsY als in der Cytoplasmamembran liegend und für BcsX als innen an/in der Cytoplasmamembran liegend vorhergesagt (*pSortB*, aufgerufen am 19.12.2022 (Yu et al. 2010)).

Interessanterweise wird CmcAx als korrigierendes Element des Faserbildungsprozesses beschrieben, eine Funktion, die sich auch in Pflanzen wiederfindet. In Pflanzen dient die Cellulase KORRIGAN als Korrekturmechanismus, welche den korrekten Aufbau der Zellwand kontrolliert (Doblin et al. 2002; Nicol et al. 1998). Obwohl CmcAx und KORRIGAN die gleiche Funktion haben, weisen sie nach BLAST-Analyse (Altschul et al. 1990) weder auf Ebene der Protein- noch auf Ebene der Nukleotidsequenz eine Homologie auf. Dies deutet auf eine wichtige Funktion hin, die möglicherweise konvergent entwickelt wurde. Die Funktion der anderen akzessorischen Proteine ist noch weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass CcpAx durch Interaktion mit BcsD zur Bildung von Cellulose beiträgt. Beide scheinen für die richtige Anordnung der kristallinen Cellulosebänder im Periplasma notwendig zu sein (Deng et al. 2013; Sunagawa et al. 2013). Die Funktion von BglxA wird als β -Glucosidase beschrieben, die zu einer korrekten Bildung der Fasern beiträgt (Römling and Galperin 2015).

1.5 Regulation der Cellulosesynthese

Cyclisches di-GMP ist ein nahezu omnipräsenter sekundärer Botenstoff, der an zahlreichen intrazellulären Prozessen beteiligt ist. Darunter fallen die Beteiligung an grundlegenden Prozessen in phylogenetisch diversen Bakterien, wie z. B. dem Übergang von der beweglichen zur sessilen Lebensweise, der Kontrolle des Zellzyklus und der Pathogenität. Der erste Nachweis des essentiellen Aktivators cyclisch dimeres (3'→5') GMP für die Cellulosebildung in Essigsäurebakterien wurde von Ross et al. (1987) vor mehr als 30 Jahren erbracht. Obwohl die Cellulosebildung in Pflanzen auf homologen Genen beruht (*cesA*), wird sie nicht durch cyclisches di-GMP reguliert (Pear et al. 1996). Der exakte Regulationsmechanismus in Pflanzen konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden, jedoch gibt es einige Hinweise, dass die Regulation insbesondere durch posttranslationale Modifikationen gesteuert wird (Lampugnani et al. 2018; Polko and Kieber 2019).

Als wesentliches Motiv zur Identifizierung von regulatorischen Diguanylatcyclasen (DGCs) trug die Beschreibung der GGDEF-Domäne bei, die Enzyme kennzeichnet, die an der Synthese von cyclischem di-GMP beteiligt sind. Ergänzend dazu charakterisiert die ‚EAL‘-Domäne Phosphodiesterasen (PDE), die den Abbau von cyclischem di-GMP steuern. Das wachsende Verständnis des sekundären Botenstoffs brachte das Verständnis über die bakterielle Cellulosesynthese schon früh voran (Ausmees et al. 2001; Römling and Galperin 2017; Simm et al. 2004). Charakteristisch für *Komagataeibacter*-Stämme ist die Anordnung der GGDEF- und EAL-Domänen als Tandem innerhalb der Proteinsequenz eines Enzyms, wobei die Aktivität entweder die einer DGC oder PDE ist (Tal et al. 1998). Der genaue Regulationsmechanismus, der über die tatsächliche Funktion entscheidet, ist bisher noch unbekannt (Römling et al. 2017). Das Vorhandensein einer Häm-enthaltenden PAS-Domäne in PDEs verbindet den Prozess der Biofilmbildung mit einem Sensor der aktuellen Sauerstoffversorgung des Stoffwechsels. Dabei wird vermutet, dass die höchste Konzentration an cyclischem di-GMP wie auch die stärkste Cellulose-Produktion in Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt (Chang et al. 2001). Eine gute Sauerstoffversorgung ist für die strikt aeroben Essigsäurebakterien notwendig (Chang et al. 2001; Römling et al. 2013).

Einleitung

Die Regulation der bakteriellen Cellulosesynthese erfolgt über eine C-terminale Domäne von BcsA. BcsA enthält eine intrazellulär gelegene PilZ-Domäne, die cyclisches di-GMP bindet. Die Bindung induziert eine Konformationsänderung und die Freigabe des aktiven Zentrums und resultiert folglich in einer Aktivierung des Enzyms und damit der Cellulosesynthese (Abbildung 2) (Amikam and Galperin 2005; Ryjenkov et al. 2006).

Generell ist die regulatorische PilZ-Domäne nicht auf die Steuerung der Biofilmbildung beschränkt, sondern in verschiedenen Bakteriengattungen konserviert und trägt grundsätzlich zur Regulation der Zellmotilität bei (Ryjenkov et al. 2006). Außerdem ist die Bindung von cyclischem di-GMP nicht auf PilZ-Domänen beschränkt. In *P. aeruginosa* enthält ein Protein, das an der Biofilm-Bildung beteiligt ist (PelD), ein GGDEF-Motiv und eine inhibitorische Stelle, die die Bindung von cyclischem di-GMP reguliert (Li et al. 2012). Der genaue Regulationsmechanismus der Cellulosesynthese blieb unklar, bis eine Kristallstruktur des CS-Komplexes erstellt wurde und auf eine *Gating*-Schleife hinwies, die die Bindung von UDP-Glucose in Abwesenheit von cyclischem di-GMP verhindert (Morgan et al. 2014; Morgan et al. 2013). Viele Bakterienarten kodieren für mehr als nur ein paar DGCs und PDEs (z. B. 7 in *K. hansenii*-Stämmen und viele weitere in Bakterien anderer Gattungen), was auf ein komplexeres regulatorisches Netzwerk hindeutet, das von einer lokalen bis hin zu einer globalen Regulation reicht (Dahlstrom and O'Toole 2017). Es wurden Hinweise gefunden, dass beide Regulationsmechanismen in Abhängigkeit von der Spezies und dem physiologischen Zustand der Zelle genutzt werden können. Unter der Annahme eines globalen Netzwerks werden verschiedene Regulationsmechanismen vorgeschlagen. Die Spezifität bestimmter Effektoren für cyclisches di-GMP könnte durch eine höhere Bindungsaffinität des Effektors oder eine regulierte Aktivität der gewünschten Cyclase erhöht werden (Pultz et al. 2012; Tuckerman et al. 2009). Eine physische Interaktion zwischen der Cyclase und dem Effektor könnte ein lokales regulatorisches Netzwerk begünstigen, wie es im *Lap*-System von *P. fluorescens* gezeigt wurde (Collins et al. 2020).

1.6 Vergleich von *K. hansenii* ATCC 23769 und ATCC 53582

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei Cellulose-produzierenden *Komagataeibacter hansenii*-Stämmen, ATCC 23769 und ATCC 53582, gearbeitet. Bei *K. hansenii* ATCC 23769 handelt es sich um einen Stamm mit einer überdurchschnittlichen Menge an produzierter Cellulose. Dieser Stamm wurde ursprünglich aus Essig in Israel isoliert, erstmals von Aschner (1937) beschrieben und von Gosselé et al. (1983) weiter charakterisiert. In Iyer et al. (2010) wurde die erste vollständige Genomsequenz eines Cellulose-produzierenden Essigsäurebakteriums öffentlich zugänglich gemacht. Im Gegensatz dazu produziert *K. hansenii* ATCC 53582 sehrnrasch besonders große Mengen an Cellulose und wurde ursprünglich aus Zuckerrohr isoliert. Anfangs noch als ‚*Bacterium xylinum*‘ (Brown 1886) bezeichnet, wurde dieser Stamm in *Gluconacetobacter xylinus* (Brown 1886) umbenannt und wird nun als *K. hansenii* ATCC 53582 (NCBI Taxon ID 28448) gelistet. Die vollständige Genomsequenz wurde erstmals von Florea et al. (2016b) veröffentlicht. Die hohe Produktivität von Cellulose durch beide Stämme ist bekannt und in einem Patent von Brown aus dem Jahr 1990 hinterlegt (US-Patent 4,942,128).

Ein Vergleich der Genomsequenzen beider Stämme zeigt eine leichte Abweichung in der Größe. Das Chromosom von *K. hansenii* ATCC 23769 hat eine Größe von 3,6 Mbp, dagegen ist das Chromosom des Hochproduzenten ATCC 53582 mit 3,3 Mbp etwas kleiner, was sich in der vorhergesagten Anzahl der kodierenden Gene widerspiegelt, die beim ersten Stamm 2.978 und beim zweiten 2.829 beträgt. Der Unterschied in der Genomgröße lässt vermuten, dass es sich bei *K. hansenii* ATCC 53582 um einen Abkömmling von *K. hansenii* ATCC 23769 handelt, welcher zu Gunsten der besonders hohen Cellulose-Produktivität andere Gene verloren haben könnte. Der GC-Gehalt der Stämme ist jedoch nahezu identisch (59 %; 60 %). In beiden Stämmen werden außerdem die zwei Untereinheiten des CS-Komplexes als ein fusioniertes Protein BcsAB exprimiert (Saxena et al. 1994).

Beide Stämme sind von besonderem Interesse, da diese als Essigsäurebakterien mit einer hohen Cellulose-Produktionsrate auf verschiedenen C-Quellen charakterisiert sind (Fang and Catchmark 2015; Jozala et al. 2015; Valera et al. 2015). Die tatsächliche Menge der freigesetzten Cellulose sowie die Geschwindigkeit der

Einleitung

Synthese variieren jedoch stark. Die deutliche Variation in der Cellulosesynthese-Rate bei vergleichbarer genetischer Organisation war ein Grund, warum diese beiden Stämme als Vertreter der Cellulose-produzierenden Essigsäurebakterien ausgewählt wurden.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die meisten Studien zur Cellulosesynthese in Essigsäurebakterien konzentrierten sich bisher auf die Optimierung der verwendeten Kohlenstoffquelle, um die produzierte Gesamtmenge aus kostengünstigen Ausgangssubstraten zu steigern. Jedoch sind grundlegende Aspekte bakterieller Cellulosesynthese noch ungeklärt. Insbesondere steht der Vergleich von weniger starkproduzierenden und hochproduktiven Essigsäurebakterien bei gleichzeitiger enger phylogenetischer Verwandtschaft aus. Ein besseres Verständnis der Genetik der bakteriellen Cellulosebildung kann auch das Verständnis der Cellulosesynthese in Pflanzen voranbringen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Möglichkeiten zur Genommodifikation bei Cellulose-bildenden Essigsäurebakterien begrenzt und mussten verbessert werden, um gentechnische Experimentalansätze, wie in dieser Arbeit beschrieben, effizient durchführen zu können. Eine verbesserte genetische Modifizierbarkeit von Celluloseproduzierenden Essigsäurebakterien kann darüber hinaus den Weg zu innovativen und recyclefähigen Biomaterialien mit neuartigen Eigenschaften, sowie neuen Anwendungsbereichen ebnen. Durch Entwicklung neuer, auf Bakteriencellulose basierender Werkstoffe unter Nutzung biotechnologischer Produktionsweisen könnte mittel- oder langfristig auch ein Beitrag zur Reduktion oder Vermeidung fossil-basierter Materialien geleistet werden und damit eine Reduktion umweltschädigender Folgen einhergehen. Entwicklungen, die zum Aufbau einer nachhaltigen Bioökonomie sowie zum Erreichen der von den Vereinten Nationen formulierten Nachhaltigkeitszielen (*Sustainable Development Goals, SDGs*) beitragen können.

Die zentrale Hypothese meiner Doktorarbeit war, dass die drei CS-Gene bzw. Cellulosesynthese-Gencluster in *K. hansenii* unterschiedliche Funktionen besitzen, das zentrale Ziel die Aufklärung dieser Funktionen und die Untersuchung der Regulation ihrer Expression. Die dabei verfolgten Teilziele lassen sich in folgenden Arbeitspakete zusammenfassen:

- Entwicklung eines markerfreien *in-frame*-Deletionssystems für Essigsäurebakterien mit besonders hoher Cellulosesyntheserate.
- Konstruktion von Cellulosesynthase-Deletions- und -Multi-Deletionsstämmen, denen entweder eine Cellulosesynthase fehlt oder die nur eine einzige

Einleitung

Cellulosesynthase alleine exprimieren; außerdem die Erzeugung von Deletionsstämmen zweier regulatorischer DGCs.

- Etablierung eines kolorimetrischen Assays zur Bestimmung der freigesetzten Cellulose-Menge.
- Konstruktion von markerfreien *in-frame*-Insertionen von Fluoreszenzproteinen, die eine Charakterisierung der räumlichen Expression der drei CS-Gene innerhalb des nativen Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 ermöglichen.
- Darstellung des Cellulose-Netzwerks im Rasterelektronenmikroskop, um den Beitrag von BcsAB1, BcsAB2 und BcsAB3 zu ergründen.
- Physikochemische Charakterisierung der bakteriellen Cellulose der gentechnisch hergestellten, mutierten Stämme durch Messung der Kristallinität, der Zugfestigkeit und der Bestimmung des Infrarotspektrums.
- Bestimmung des Beitrags der einzelnen Cellulosesynthasen zum Cellulose-Netzwerk.
- Untersuchung des Regulationsmechanismus der Cellulosesynthese bzw. der Motilität durch Untersuchung des Beitrags von DgcA und DgcB.

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besitzen mindestens den Reinheitsgrad ‚pro Analysis (p.a.)‘. Die Chemikalien wurden für gewöhnlich von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Falls die Herkunft der Chemikalie besonders relevant war wurde der verwendete Hersteller im Text explizit erwähnt, ansonsten wird davon ausgegangen, dass die Herkunft der Chemikalie keine Auswirkung auf das experimentelle Ergebnis hatte.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen

Diese Arbeit basiert auf den in Tabelle 1 genannten bereits vorhandenen Stämme. Alle Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit neu erzeugt wurden, sind im Ergebnisteil aufgeführt (Tabelle 23; Tabelle 24). Sämtliche für die Konstruktion der Stämme verwendete Plasmide basierten auf den in Tabelle 2 gezeigten Plasmiden pKOS6b und pMM3b.

K. hansenii ATCC 23768 sowie *K. hansenii* ATCC 53582 und die zugehörigen Konstrukte wurden zur Stammerhaltung auf modifiziertem Elektroporationsmedium, EP_{mod} (Buchert and Viikari 1988) (1,5 % (w/w) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) Glycerin und 8 % (w/v) D-Mannitol, pH = 6,0) bei 30 °C und 180 U/min kultiviert. Zur Herstellung von Deletions- und Insertionsmutanten wurde der Anteil des komplexen Hefeextrakts bei der Gegenselektion auf 0,015 % (w/v) reduziert, und 0,5 % (w/v) Casaminsäuren hinzugefügt. Gegebenenfalls wurde das Medium mit den in Tabelle 3 aufgeführten Zusätzen ergänzt. Zur Stammsicherung wurden die Stämme aus einer über Nacht Kultur auf eine Glycerinkonzentration von 25 % gebracht und bei -80 °C gelagert.

Material & Methoden

Tabelle 1. Bereits vorhandene Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Stämme, die in dieser Arbeit neu erstellt wurden sind für *K. hansenii* ATCC 23769 in Tabelle 23 bzw. für *K. hansenii* ATCC 53582 in Tabelle 24 gelistet.

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23767 / LMG 1524	Cel ⁺	BCCM/LMG Bacterial Strain Collection
<i>K. hansenii</i> ATCC 23767 $\Delta bcsAB1$	Deletion von <i>bcsAB1</i> (GXY_RS03935)	Mientus (Bimmer et al. 2022)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23767 $\Delta bcsAB2$	Deletion von <i>bcsAB2</i> (GXY_RS13370)	Mientus (Bimmer et al. 2022)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23767 $\Delta bcsAB3$	Deletion von <i>bcsAB3</i> (GXY_RS08170)	Mientus (Bimmer et al. 2022)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23767 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	Einzelexpression von <i>bcsAB1</i>	Mientus (Bimmer et al. 2022)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 53582	Cel ⁺	ATCC Strain Collection

Tabelle 2. Ausgangsplasmide, die zur Konstruktion der in dieser Arbeit erstellten Deletions-, Insertions- und Expressionsplasmide verwendet wurden.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pKOS6b	Integrierender Vektor (<i>mob</i> , <i>lacZα</i> , Km ^R , FC ^S); wurde als Grundlage für die Konstruktion aller in dieser Arbeit verwendeten Deletions- und Insertionsplasmide verwendet	Kostner et al. (2013)
pMM3b	Nicht-integrierender Vektor (Km ^R), der zur Expression in <i>Komagataeibacter</i> verwendet wurde. Identisch mit pMM4a.	Mientus et al. (2017)
pJPB125-sfGFP	Km ^R , Insertion von sfGFP	Lee et al. (2015)
pBSC1-mRFP1	Amp ^R , Cm ^R , Insertion von mRFP1	Radeck et al. (2013)
pBad-mKalama1	Amp ^R , Insertion von mKalama1	Ai et al. (2007)

Tabelle 3. Medienzusätze

	Endkonzentration (w/v)
Kanamycin	50 μ g/ml
Cefoxitin	60 μ g/ml
5-FC	120 μ g/ml

Verschiedene *E. coli*-Stämme (Tabelle 4) wurden für die Transformation sowie als Helfer- und Donor-Stamm in der triparentalen Konjugation verwendet und auf

Material & Methoden

„lysogeny broth“ (LB)-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl) (Lennox 1955) bei 37 °C und 180 U/min kultiviert. Zur Sicherstellung der Plasmidreplikation wurde dem Medium die entsprechende Menge des notwendigen Antibiotikums zugesetzt (Tabelle 3).

Tabelle 4. Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galE15</i> , <i>galk16</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen, CA, USA
<i>E. coli</i> DH10β	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU galk</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>	Invitrogen, CA, USA
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , <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> , Km ^R , <i>oriColE1</i> , <i>RK2</i> -Tra ⁺ , <i>mH-1</i> carrying plasmid pRK2013	Boyer and Roulland-Dussoix (1969); Figurski and Helinski (1979)

2.2.2 Biofilm Bildung

K. hansenii-Stämme synthetisieren während stehender Kultivierung in Hestrin-Schramm-Medium (HS) (Hestrin and Schramm 1954) (5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,12 % (w/v) Zitronensäure 1-hydrat, 0,35 % (w/v) Dinatriumphosphat 2-hydrat, 2 % (w/v) D-Glucose, pH = 5,0) ein Cellulosebiofilm an der Oberfläche des Flüssigmediums. Daher wurden alle auf *K. hansenii* ATCC 23769 basierenden Stämme als Vorkulturen in Schikanekolben mit EP_{mod}-Medium angezogen und auf eine OD₆₀₀ = 0,03 in 250 mL HS-Medium in einem entsprechenden Gefäß oder auf eine OD₆₀₀ = 0,2 in 5 mL HS-Medium in 15 mL Bioreaktoren (TPP, Trasadingen, Schweiz) inokuliert. Dagegen reichte beim Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 unabhängig vom Kulturvolumen eine Einzelkolonie als Inokulum aus. Alle statischen Kulturen beider Stämme wurden ohne Schütteln bei 25 °C bebrütet, wobei die Inkubationszeit vom verwendeten *K. hansenii*-Stamm und der anschließenden Analyse der Biofilme abhängig war.

2.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

Plasmide, die zuvor mit der SLiCE-Ligationstechnik (2.3.8) hergestellt wurden, wurden durch Hitzeschock in *E. coli* übertragen. Eine Menge von 100 ng Plasmid-DNA wurde mit Portionen von chemisch kompetenten *E. coli* TOP 10-Zellen gemischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für 90 sec durchgeführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 37 °C und 1.100 U/min für 60 min regeneriert und zur Selektion auf LB_{Kan50} plattiert.

2.2.4 Transformation von *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582

Aufgrund der raschen Synthese großer Mengen an Cellulose war *K. hansenii* ATCC 53582 nicht für triparentale Konjugation geeignet, weshalb ein modifiziertes Elektroporationsverfahren etabliert wurde (Bimmer et al. 2022). Eine in EP_{mod} kultivierte Vorkultur wurde zur Beimpfung einer neuen Hauptkultur von 100 mL (EP_{mod}, 6 U/mL Cellulase) auf eine OD₆₀₀ = 0,1 verwendet und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,2 inkubiert. Die anschließende Aufbereitung erfolgte durchgängig auf Eis. Jede Kultur wurde in zwei 50 mL-Röhrchen überführt und bei 4.000 U/min, 4 °C und 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden dreimal mit 25 mL kaltem 1 mM HEPES (ohne pH-Korrektur) gewaschen, der Überstand wurde jeweils sorgfältig entfernt. Schließlich wurde eine der beiden Teile der Ausgangskultur in 250 µL 1 mM HEPES resuspendiert und mit der Probe im zweiten Röhrchen gemischt. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 20 µL 75 % Glycerin pro 100 µL Zellsuspension hinzugefügt. Aliquots von 50 µL wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurde eine Menge von 100 – 400 ng zu den elektrokompetenten Zellen gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Das Zell-Plasmid-Gemisch wurde in eine vorgekühlte 1 mm-Küvette überführt und bei folgenden Einstellungen verwendet: 25 kV/cm, 200 Ω und 25 µF. Zur Regeneration wurden 900 µL EP_{mod}-Medium zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 h bei 30 °C und 230 U/min wurden die Transformanten auf Platten mit selektivem EP_{mod}-Medium, das 50 µg/ml Kanamycin enthielt, ausplattiert, um eine Plasmid-Integration zu erreichen.

2.2.5 Konjugation von *K. hansenii* ATCC 23769

Üblicherweise ist die triparentale Konjugation die Methode der Wahl für die Transformation von Essigsäurebakterien (Bode 2021; Kostner et al. 2013). In dieser Arbeit war dieses Verfahren jedoch nur auf *K. hansenii* ATCC 23769 anwendbar. Eine Einzelkolonie des gewünschten Empfängerstammes diente als Inokulum der Vorkultur und wurde über Nacht in EP_{mod}-Medium angezogen. Die *E. coli* pRK2013-Helfer- und *E. coli* TOP10-Donor-Stämme (die das Insertions- oder Deletionsplasmid exprimieren) wurden in LB_{Kan50} beimpft und über Nacht inkubiert. Eine Hauptkultur der Rezipientenstämme wurde in EP_{mod} auf eine OD₆₀₀ von 0,3 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 – 1,5 bei 30 °C kultiviert. Die Helfer- und Donorstämme wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,1 kultiviert. Die höchste Transformationseffizienz wurde erzielt, wenn das von Peters et al. (2013) eingeführte Verhältnis der Stämme verwendet wurde. Daher entsprach das Volumen des Empfängerstammes einer OD₆₀₀ = 3,72. Das Volumen des Donor- und Helferstammes entsprach einer OD₆₀₀ von 0,8 bzw. 0,75. Zunächst wurden Helfer- und Donorstamm vorsichtig gemischt und zentrifugiert (4.000 U/min, 4 °C, 10 min). Verbleibende Spuren der Antibiotika wurden durch resuspendieren des Pellets in LB_{ohne} und anschließende Zentrifugation entfernt. Dann wurde der Empfängerstamm hinzugefügt und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Rücklauf vorsichtig resuspendiert und punktförmig auf eine nichtselektive EP_{mod}-Platte pipettiert und 20 – 24 h bebrütet. Anschließend wurde die Zellmasse in 300 µl EP_{mod} aufgenommen, sorgfältig resuspendiert und in Portionen von 100 µl und 200 µl auf EP_{mod, Kan50, Cef60} plattiert. Aufgrund der natürlichen Resistenz von *K. hansenii* gegen Cefoxitin konnten nur Kolonien nach erfolgreicher Plasmid-Integration wachsen. Einzelne Kolonien wurden mittels analytischer PCR (2.3.6.2) analysiert.

2.2.6 Markerfreie Gendeletion

Ein Ziel dieser Arbeit war die Generierung von markerfreien *in-frame*-Deletionen der CS-Gene in *Komagataeibacter*. Dazu wurde das von Kostner et al. (2013) in unserer Arbeitsgruppe eingeführte *codBA*-Gegenselektionssystem verwendet. Ein detailliertes Schema des Rekombinationsmechanismus ist in Abbildung 5 dargestellt.

Material & Methoden

Kurz zusammengefasst wurde ein Fragment in der Länge von 800 - 1.100bp unmittelbar oberhalb bzw. unterhalb des GOI liegend mit einer *High-Fidelity*-Polymerase (2.3.6.1) amplifiziert und mittels SLiCE-Reaktion (2.3.8) an das pKOS6b-Plasmidrückgrat fusioniert. Nach erfolgreicher Plasmid-Integration durch homologe Rekombination, infolge der durch Elektroporation (2.2.2) oder Konjugation (2.2.5) erreichten Plasmidaufnahme, wurden die Stämme auf Gegenselektionsplatten (2.2.1) mit 120 µg/mL 5-Fluorocytosin (5-FC) (TCI, Tokyo, Japan) ausplattiert. Die von *codB* kodierte Cytosinpermease ermöglicht die Aufnahme von 5-FC und fördert die Umwandlung in das toxische 5-Fluorouracil (5-FU) durch die Cytosindeaminase (*codA*). Diese toxische Verbindung wird von der genomischen Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) in den Stoffwechsel gebracht und treibt den Gegenselektionsmechanismus und schließlich den Verlust des GOI an (Kostner et al. 2013). Die korrekten Klone wurden mittels PCR (2.3.6.2) und Sequenzierung (2.3.9) analysiert. Bei manchen GOI war eine geringe Effizienz des Deletionssystems zu beobachten. Daher ist es ratsam in Zukunft die Zugabe von EtOH oder die Einstellung des pH-Werts durch Essigsäure zu testen. Insbesondere während der Selektion auf Plasmid-Integration und Selektion gegen *E. coli*, infolge der ersten Rekombination, könnte dies dazu beitragen die Effizienz zu steigern.

Material & Methoden

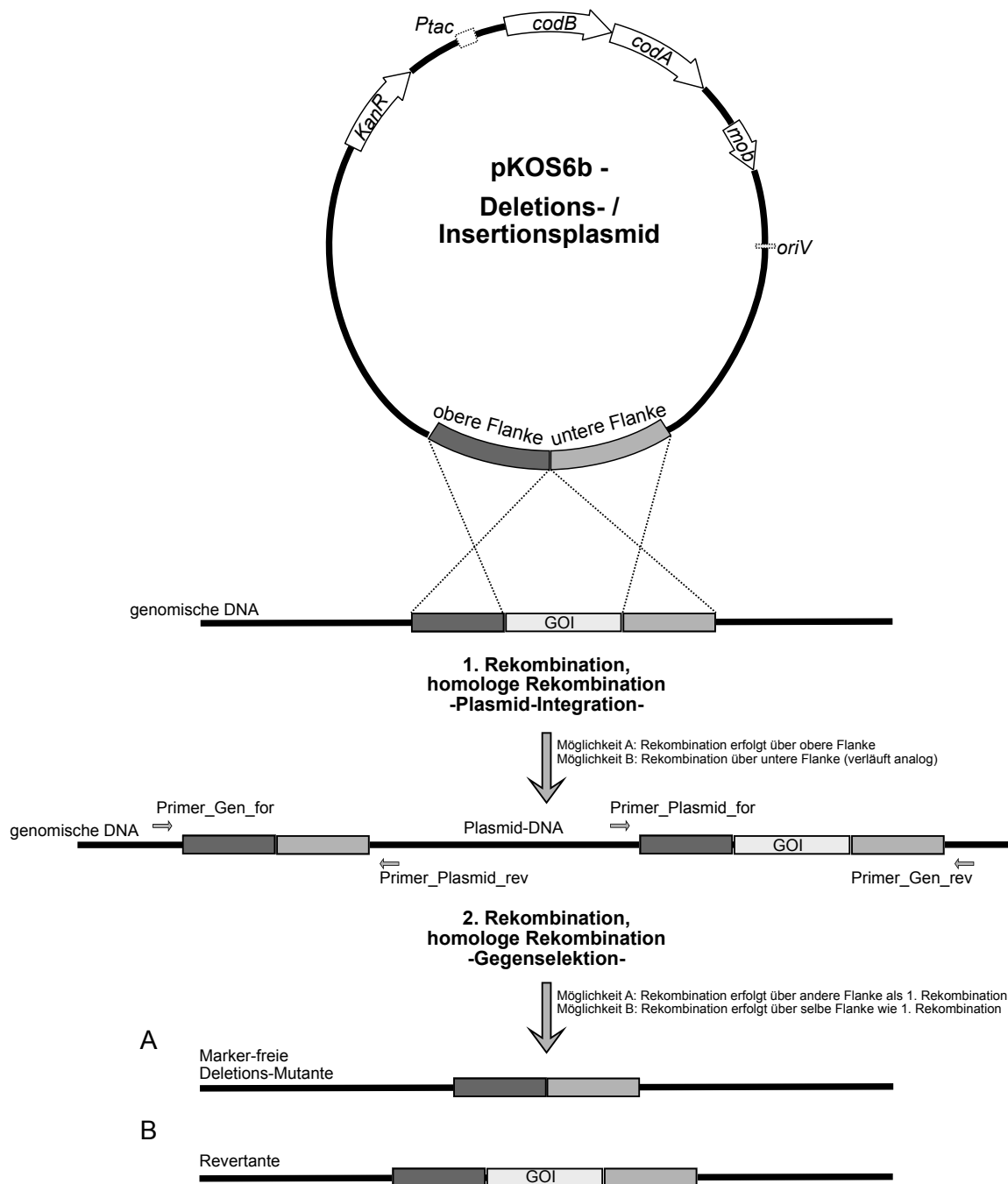


Abbildung 5. Schema des markerfreien Deletionssystems. Zur Erzeugung von markerfreien Deletionen sowie von Insertionen in das Genom von *Komagataeibacter* wurde als Ausgangsvektor das Plasmid pKOS6b verwendet. Die 1. Rekombination kann über die obere (gezeigt) bzw. untere Flanke erfolgen. Die zur Überprüfung verwendeten Primer-Paare sind entsprechend ihrer Lage eingezeichnet. Zur Gegenselektion mit 5-FC wurden möglichst Klone gewählt, bei denen die 1. Rekombination über die weniger häufigere Flanke stattgefunden hat. Als Ergebnis der 2. Rekombination entsteht entweder die gewünschte markerfreie Deletions-Mutante oder, bei Rekombination über erneut die Flanke der 1. Rekombination, eine Wildtyp-Revertante (nach Kostner et al. (2017)). GOI, *gene of interest*.

2.2.7 Insertion von Fluoreszenzmarkern

Der gleiche Mechanismus, der für die Erzeugung von *in-frame*-Deletionen (2.2.6) verwendet wurde, wurde auch für die *in-frame*-Insertion der offenen Leserahmen (ORFs) der Fluoreszenzproteine angewandt. Dazu wurden die entsprechenden ORFs (beginnend mit dem Start-Codon des Proteins) aus den jeweiligen Plasmiden amplifiziert (Tabelle 2). Sämtliche Insertionen erfolgten in *K. hansenii* ATCC 23769 mittels translationaler Fusion, dabei wurde sfGFP mit *bcsAB1* fusioniert, mRFP1 wurde mit *bcsAB2* fusioniert und mKalama1 wurde mit *bcsAB3* in fusioniert. Die Insertionsstelle wurde jeweils eine Aminosäure (AS) hinter *bcsC1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* gelegt. Da *bcsAB1* und *bcsC1* sich überschneidende Gene sind, war es nicht möglich, sfGFP direkt hinter *bcsAB1* zu platzieren, ohne die das Risiko einzugehen die Expression von *bcsC1* zu beeinflussen. Das Ablaufschema ist exemplarisch am Beispiel der Insertion von sfGFP an *bcsC1* in Abbildung 24 gezeigt. Die Bezeichnung der Primer kann systematisch auf die Primer, die zur Konstruktion der anderen Plasmide verwendet wurden, übertragen werden (7.3 Tabellen).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Easypure Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) isoliert. Es wurde das Verfahren des Herstellerprotokolls befolgt, wobei 2 mL Übernachtskulturen verwendet wurden und die Elution der Plasmid-DNA in ddH₂O erfolgte. Die Plasmide wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA von *K. hansenii* wurde mit dem MasterPure™ DNA Purification Kit von Epicentre aus Übernachtskulturen extrahiert. Die Extraktion erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers und einer Resuspension der DNA in 50 µl ddH₂O. Die DNA-Proben wurden bei 4 °C gelagert.

2.3.3 Isolierung von RNA

Das Prozedere der RNA-Isolation unterschied sich zwischen beiden verwendeten *Komagataeibacter*-Stämmen. RNA wurde aus Biofilm von *K. hansenii* ATCC 23769 extrahiert, die in 5 mL HS-Medium in 15 mL-Bioreaktoren (TPP, Trasadingen, Schweiz) für 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17 und 21 Tage gewachsen waren, anschließend zentrifugiert wurden (4.500 U/min, 10 min, 4 °C) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurden. Für *K. hansenii* ATCC 53582 wurden die Proben aus 10 mL Flüssigkulturen in HS-Medium mit 6 U/mL Cellulase aus *Trichoderma reesei* (C2730, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) extrahiert. Diese Kulturen wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und 3 Tage lang bei 30 °C und 60 U/min bebrütet. Die RNA-Extraktion mittels TRIzol schloss sich unmittelbar an.

Dazu wurde das TRIzol-Reagenz (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) entsprechend des hier beschriebenen Protokolls verwendet. Die Biofilme und Zell-Pellets wurden in 1.000 µL TRIzol resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 200 µL Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, 10 sec lang gründlich gemischt und 2 - 3 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden anschließend 15 min lang

bei 11.200rpm, 4 °C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues 1,5-mL-Röhrchen überführt und mit 500 µl Isopropanol gründlich gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 min unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, bevor das RNA-Pellet in 75 % (v/v) EtOH gewaschen und 5 min lang bei 8.880 rpm, 4 °C zentrifugiert wurde. Nach Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Pellet 10 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem H₂O aufgelöst und 15 min bei 58 °C inkubiert, um das Lösen der RNA zu verbessern. Verbleibende Spuren von gDNA wurden durch eine anschließende DNase-Behandlung (Turbo DNase Kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) nach dem Protokoll des Herstellers entfernt. Die Abwesenheit von gDNA wurde durch PCR-Amplifikation (2.3.6.2) eines Fragments der ATP-Synthase (2.871 bp) sowie der RNA-Polymerase (1.505 bp) getestet.

2.3.4 Messung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Qualität sowie die Konzentration aller extrahierten Nukleinsäuren wurde mit einem NanoDrop® ND-1000 (PeQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gemessen. Die Agarosegel-Elektrophorese wurde gewählt, wenn eine genauere Qualitätskontrolle erforderlich war (2.3.5).

2.3.5 Agarosegel-Electrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte (2.3.6) und der isolierten DNA (2.3.1; 2.3.2) sowie der RNA (2.3.3) erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese. Alle DNA-Proben wurden mit TriTrack DNA Ladepuffer (6x) (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gemischt. Für RNA-Proben wurde der RNA Ladepuffer (2x) (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Im Allgemeinen wurde für DNA-Proben eine Agarosekonzentration von 0,8 % (w/v) in 1x TAE (50x TAE: 24,2 % (w/v) Tris, 5,71 % (v/v) Eisessig, 0,93 % (w/v) EDTA, pH = 8,0) verwendet. Die Agarose-Konzentration wurde auf 1,2 oder 2,0 % erhöht, um eine bessere Auflösung von RNA und kleineren Fragmenten zu erreichen.

2.3.6 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet, die in nachfolgenden SLiCE-Reaktionen und in Sequenzierungsansätzen oder zur Analyse der erzeugten Konstrukte eingesetzt wurden. Die Sequenzen und Schmelztemperaturen aller verwendeten Primer sind im Anhang (7.3 Tabellen) aufgeführt.

2.3.6.1 DNA-Fragment Synthese durch PCR

Die High-Fidelity-DNA-Polymerase S7 Fusion Polymerase (MobiDiag, Espoo, Finnland) wurde im Allgemeinen für alle Anwendungen verwendet, bei denen eine Korrekturlesefunktion erforderlich war (Tabelle 5; Tabelle 6). Wenn das Template anspruchsvoller war oder die Amplifikation eines größeren Fragments erforderlich war, wurde die PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara, Kusatsu, Japan) gewählt (Tabelle 7; Tabelle 8). Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet.

Tabelle 5. PCR Ansatz S7 Fusion Polymerase

5x HF buffer	10 µL
10mM dNTPs	1 µL
Vorwärts Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Rückwärts Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Templat DNA	*
S7 Polymerase	0.5 µL
ddH ₂ O	Auffüllen auf 50 µL

*Plasmid DNA 10 pg – 10 ng; gDNA 50–250 ng

Tabelle 6. 3-stufiges PCR Programm bei Amplifikationen mit S7 Fusion Polymerase

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek
	Denaturierung	98 °C	10 sek
25	Annealing	X °C	30 sek
	Extension	72 °C	30 sek / kb
1	Finale Extension	72 °C	5 min
1	Lagerung	4 °C	∞

Tabelle 7. Zusammensetzung des PCR Ansatzes PrimeStar Max

PrimeSTAR Max premix	25 µL
Vorwärts Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Rückwärts Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Template DNA	*
ddH ₂ O	Auffüllen auf 50 µL

*Plasmid DNA 10 pg – 1 ng, gDNA 100 pg – 200 ng

Tabelle 8. PCR-Programm zur Amplifikation mit PrimeStar Max

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
25	Denaturierung	98 °C	10 sek
	Annealing	55 °C	5 sek or 5 sek*
	Extension	72 °C	5 sek / kb
1	Lagerung	4 °C	∞

*Berechnung der T_m aus: $T_m (°C) = 2(NA + NT) + 4(NC + NG) - 5$. Bei T_m Werten von 55 °C oder höher wird eine Annealing Dauer von 5 sec verwendet. Bei T_m Werten unterhalb von 55 °C erfolgt das Annealing für 15 sec.

2.3.6.2 Analytische PCR

Die Hochdurchsatz-Screening-Analyse der Konstrukte nach Transformation von *E. coli* sowie nach Konjugation oder Elektroporation sowie nach Gegenselektion von *K. hansenii* erfolgte durch analytische PCR unter Verwendung der Phire Hot Start II DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) (Tabelle 6; Tabelle 7).

Tabelle 9. PCR Ansatz mit Phire Hot Start II DNA Polymerase

5x Phire reaction buffer	4 µL
10 mM dNTPs	0.4 µL
Vorwärts Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Rückwärts Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Template DNA	*
Phire Hot Start II Polymerase	0.2 µL
ddH ₂ O	Auffüllen auf 20 µL

*Plasmid DNA 1 pg – 10 ng; gDNA 10 – 100 ng

Tabelle 10. 3-stufiges PCR Programm bei Phire Hot Start II DNA Polymerase

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek / 3 min*
	Denaturierung	98 °C	5 sek
25	Annealing	X °C	5 sek
	Extension	72 °C	15 sek/kb
1	Finale Extension	72 °C	1 min
1	Lagerung	4 °C	∞

*Zur Amplifikation von gDNA aus Kolonien wurde die initiale Denaturierung auf 3 min verlängert.

2.3.7 Restriktionsverdau

Die Analyse der Plasmide erfolgte durch Restriktionsverdau. Dazu wurden FastDigest-Enzyme (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde wie in Tabelle 11 angegeben hergestellt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Falls erforderlich, wurde die Reaktion anschließend gemäß den Empfehlungen des Herstellers thermisch inaktiviert.

Tabelle 11. Reaktionsansatz Restriktionsverdau

10x FastDigest green buffer	1 µL
Enzym 1	1 µL
Enzym 2	1 µL
Templat DNA	200 ng
ddH ₂ O	Auffüllen auf 10 µL

Zur Vorbereitung zur Ligation mittels SLiCE wurden alle Proben, die von Plasmid-DNA als Templat amplifiziert wurden, durch einen *DpnI*-Verdau bearbeitet. Das Enzym *DpnI* zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, spezifisch nur methylierte DNA zu schneiden. Der Reaktionsmix (Tabelle 12) wurde direkt aus dem PCR-Reaktionsmix hergestellt, 30 min bei 37 °C inkubiert und 5 min bei 80 °C inaktiviert.

Tabelle 12. Restriktionsverdau mit FD-*DpnI*

10x FastDigest buffer	2.5 µL
FastDigest <i>DpnI</i>	2.5 µL
PCR Reaktionsmix	42.5 µL
ddH ₂ O	Auffüllen auf 50 µL

2.3.8 Klonierung mittels SLiCE (*Seamless Ligation Cloning Extract*)

Für die Plasmidkonstruktion wurde die von Zhang et al. (2014) beschriebene SLiCE-Klonierungstechnik verwendet. Bei der SLiCE-Reaktion wird eine homologe Rekombinationsreaktion verwendet, um lineare Fragmente spezifisch miteinander zu kombinieren, ohne dass eine zusätzliche Vorbereitung der Ausgangsfragmente oder eine anschließende Produktbehandlung erforderlich ist. Die linearen Fragmente mit den jeweiligen homologen 5'- und 3'-Überhängen wurden mittels PCR (2.3.6.1) amplifiziert. Die Primer zeigen die gewünschte Verlängerung (20 - 25 nt), um die Fragmente in der zuvor festgelegten Reihenfolge zu kombinieren (7.3 Tabellen).

Der Bakterienzelleextrakt wurde aus *E. coli* PPY hergestellt und bei -80 °C aufbewahrt. Alle Fragmente wurden wie unter 2.3.6.1 beschrieben amplifiziert und aufgereinigt. Um die Rekombinationseffizienz zu verbessern, wurden verschiedene molare Verhältnisse von Vektor und Insert zwischen 1:1 und 1:20 verwendet. Die Menge des Vektors wurde stets auf 100 ng festgelegt, während die Menge der Insertfragmente entsprechend der Fragmentgrößen berechnet wurde. Eine Reaktionsmischung von 10 µL enthielt außerdem 1 µL SLiCE-Extrakt und 1 µL T4-Ligase-Puffer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) und wurde 15 min bei 37 °C inkubiert, sowie 5 min bei 80 °C inaktiviert. 1 µL und 9 µL wurden direkt für die chemische Transformation von *E. coli* TOP10 (2.2.3) verwendet und der Erfolg anschließend durch PCR (2.3.6.2) und Sequenzierung (2.3.9) überprüft.

2.3.9 Sequenzierung

Alle Sequenzierungsanalysen wurden zunächst bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt, später bei Genewiz Germany GmbH (Leipzig, Deutschland). Die Proben für die Sanger-Sequenzierung wurden gemäß den Anweisungen der Hersteller vorbereitet.

2.3.10 Reverse Transkription

Nach der RNA-Extraktion gemäß dem in 2.4.4 beschriebenen Verfahren wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt, um die Vorlage für die RT-qPCR-Analyse zu erzeugen (2.3.4). Das iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Menge des RNA-Templats wurde auf 1.000 ng pro Reaktion definiert, so dass in der anschließenden RT-qPCR 50 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt wurden.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Quantifizierung der Cellulose in *K. hansenii*

2.4.1.1 Anthron Assay

K. hansenii ATCC 23769 produziert eine erhebliche Menge an BC. Allerdings ist die Gesamtmasse nach der verwendeten Kultivierungsmethode im Labormaßstab relativ gering. Daher wurde der Anthron Assay (Dreywood 1946; Trevelyan et al. 1952), der für die Quantifizierung von Kohlenhydraten etabliert ist, auf die Bedürfnisse von BC angepasst. Entsprechend der Empfehlung von Ajeet Chaudhary (Entwicklungsbiologie der Pflanzen, TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) wurde in einer dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit (Bimmer 2017) ein Protokoll zur Quantifizierung von kristalliner Cellulose in *Arabidopsis thaliana* optimiert und für die Quantifizierung verwendet (Kumar and Turner 2015b). Das Prinzip beruht auf einer ersten Spaltung des Cellulosepolymers durch saure Hydrolyse (Saeman 1945), einer Reaktion des entstandenen 5-Hydroxymethylfurfural mit Anthron und der Bildung eines bläulich-grünen Komplex nach Inkubation bei 80 °C. Die Änderung der Absorption kann bei 620 nm gemessen werden.

Statische Kulturen von *K. hansenii* ATCC 23769 wurden in 5 mL HS-Medium in 15 mL TubeSpin® Bioreaktoren (TPP, Trasadingen, Schweiz) - mit offener Sauerstoffzufuhr A und B - mit einer OD₆₀₀ von 0,2 beimpft und 21 Tage bei 25 °C ohne Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der Zellen und des Mediums durch 30-minütige Inkubation in 1 mL 1 M NaOH bei 100 °C (Wasserbad) wurden die Proben zentrifugiert (15.000rpm, 4 °C, 10 min) und in 1 mL Ammoniumacetat (5 M) neutralisiert. Die Proben wurden dreimal in 1 mL ddH₂O gewaschen und ein neutraler pH-Wert wurde durch Messung des pH-Wertes bestätigt. Um eine ordnungsgemäße Trocknung der kristallinen Cellulose zu gewährleisten, wurden die Proben in eine Vakuumzentrifuge gegeben und 90 min lang zentrifugiert. Falls erforderlich, wurde die Zeit um 30 min verlängert. Die Saeman-Hydrolyse erfolgte anschließend durch Zugabe von 175 µL 72 %iger Schwefelsäure zu den Proben und Inkubation für 60 min bei RT unter wiederholtem, gründlichem Mischen. Die Säurekonzentration wurde durch Zugabe von 825 µL ddH₂O auf ~12,6 % reduziert und anschließend bei 100 °C (Wasserbad) für 30 min inkubiert. Der Glukosegehalt des Überstandes wurde entsprechend des

bereits bestehenden Protokolls des Anthron-Assays gemessen (Bimmer 2017). Der Assay wurde stets auf Eis vorbereitet, dabei wurde jede Probe wurde in Triplikaten auf einer 96-Well-Platte gemessen. 10 µL einer Probe wurden mit 90 µL ddH₂O und 200 µL frisch zubereitetem und vorgekühltem Anthron-Reagenz (0,2 % Anthron (w/v) in 96 % Schwefelsäure (beides Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) gemischt. Ein Glukosestandard im Bereich von 0 - 20 µg/well wurde ebenfalls auf jeder Platte gemessen. Die Platte wurde 30 min bei 80 °C inkubiert, auf RT abgekühlt und bei 620 nm photometrisch gemessen. Die Menge der Cellulose wurde aus der freigesetzten Glukose nach der Formel:

$[m_{\text{cellulose}}] = 0,9 * [m_{\text{glucose}}]$ berechnet (Haffner et al. 2013).

2.4.1.2 Trockengewicht

K. hansenii ATCC 53582 produziert deutlich höhere Mengen an Cellulose, die durch Wiegen mit einer Analysenwaage gemessen wurden. Dazu wurde eine statische Kultur mit einer einzelnen Kolonie in 250 ml HS-Medium in einem 500 ml-Glas beimpft und 6 Tage lang ohne Schütteln bei 25 °C bebrütet. Der Biofilm wurde fünfmal bei 4 °C für jeweils mindestens 8 Stunden mit ddH₂O gewaschen und bei 50 °C zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.4.2 Physikochemische Charakterisierung Bakterieller Cellulose

Die physikalisch-chemische Charakterisierung von BC wurde am Lehrstuhl für Biogene Polymere, TUM Campus Straubing, von Martin Reimer durchgeführt. Fourier-Transformation-Infrarot-Spektren (FTIR) wurden von BC Proben aufgenommen, um den Typ der analysierten Cellulose zu identifizieren. Die Charakterisierung erfolgte an einem Frontier MIR-Spektrometer (L1280018) mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR) (PerkinElmer, Waltham, USA). Alle Spektren wurden aus 32 Scans mit einer Auflösung von 4 cm⁻¹ und im ATR-Modus mit einem Wellenzahlbereich von 400 bis 4000 cm⁻¹ gewonnen.

Die Kristallinität der Cellulose-Proben wurde mittels Röntgendiffraktometrie in Bragg-Brentano-Geometrie (MiniFlex 600, Rigaku, Tokyo, Japan with D/teX Ultra, Copper K α , Divergence Slits 0.625°, Soller Slits 2.5°) gemessen. Die bakteriellen Cellulose-

Filme wurden im 2θ -Bereich zwischen 3° und 60° gemessen, mit Scan-Schritten von $0,02^\circ$ bei 5° min^{-1} . Die Kristallinität wurde mit der *Segal-Peak-Height*-Methode (Segal et al. 1959) berechnet. Die Zuordnung der der Berechnung zu Grunde liegenden Peaks erfolgte nach French (2014). Die Proben von *K. hansenii* ATCC 23769 wiesen eine hohe Varianz auf, die auch durch Änderung des Präparationsverfahrens nicht verringert werden konnte.

2.4.3 Messung des Elastizitätsmoduls

BC zeichnet sich durch seine hohe mechanische Festigkeit aus, die es zu einem attraktiven Material für biotechnologische und biomedizinische Anwendungen macht. Die vertikale Dehnbarkeit wurde mit einem *Kieffer Dough & Gluten Extensibility Rig* (Dunnewind et al. 2003) gemessen, das freundlicherweise von Thekla Alpers (Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) zur Verfügung gestellt und betreut wurde. Für diese Arbeit wurde eigens eine neue Halterung konstruiert, um den nassen Biofilm sorgfältig fixieren zu können (Abbildung 6).

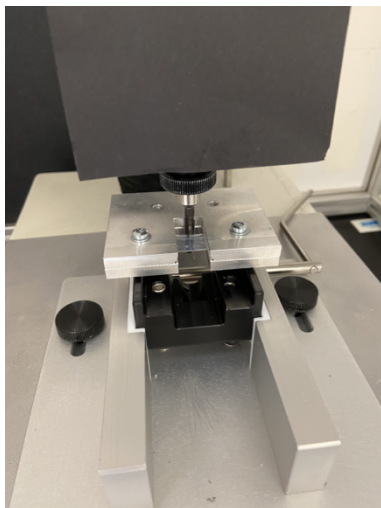


Abbildung 6. Gluten Extensibility Rig mit angepasster Halterung und fixierter Probe.

Die Biofilmprouben wurden nach 6 Tagen Kultivierung bei 25°C fünfmal in ddH_2O für jeweils mindestens 8 Stunden bei 4°C gewaschen. Die Proben wurden vor der Messung 10 min bei 4.500 rpm, 4°C zentrifugiert, um einen vergleichbaren Wassergehalt der Proben zu gewährleisten. Von jeder Biofilmproube wurden

mindestens drei technische Replikate in der Größe von 10 mm * 75 mm mit Schablone mit scharfen Kanten und einem Skalpell ausgeschnitten. Der Biofilm wurde auf die Schleiffläche gelegt und auf jeder Seite mit einer Schraube handfest angezogen. Die Messzelle wurde vor jedem Durchgang auf 2 kg kalibriert.

Das Elastizitätsmodul wurde aus der Steigung des linearen Teils des Kraft-Weg-Diagramms errechnet und nach Dunnewind et al. (2003) berechnet. Die Dicke jeder Probe wurde mit einer Schieblehre gemessen und bei der Berechnung berücksichtigt.

2.4.4 RT-qPCR

Die Quantifizierung der Abundanz von Genen ist eine leicht anzuwendende Methode zur Bewertung der Genexpression von GOIs unter definierten Bedingungen (Heid et al. 1996). In dieser Arbeit wurde der nur in die doppelsträngigen DNA interkalierende Farbstoff SYBR® Green verwendet. Für das Primerdesign sowie die Optimierung der RT-qPCR-Reaktion wurden die Empfehlungen von Bustin et al. (2009) und Taylor et al. (2010) befolgt. Die Primer für die Amplifikation der Zielgene *bcsAB1*, *bcsAB2*, *bcsAB3* und der Referenzgene *gyrA*, *recA* und *rpoB* wurden mit dem Online-Tool PrimerQuest™ (IDT, Coralville, USA) entworfen und konnten sowohl mit *K. hansenii* ATCC 23769, als auch mit ATCC 53582 verwendet werden. Die Primer wurden durch eine Schmelztemperatur von 60 °C, einer Länge von 20 nt und einer Fragmentgröße von ~100 bp definiert. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur des verwendeten Primers wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, wobei für *K. hansenii* ATCC 23769 eine $T_a = 55^\circ\text{C}$ und für *K. hansenii* ATCC 53582 eine $T_a = 60^\circ\text{C}$ verwendet wurde. Darüber hinaus wurde die PCR-Effizienz für die verwendeten Annealing-Temperaturen durch Amplifikation einer Verdünnungsreihe von cDNA (50 pg – 50 ng) bestimmt. Bei Einhaltung der Grenze von 0,9 – 1,1 entspricht dies der erwünschten Verdopplung je Zyklus (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13. Bestimmung der PCR-Effizienz bei $T_a=55^\circ\text{C}$

	Konzentration cDNA [10^x]				Steigung	PCR Effizienz
	0	-1	-2	-3		
P-acsAB1	25,00	28,07	31,13	34,02	-3,01	1,1
P-acsAB2	23,07	26,15	29,20	32,64	-3,18	1,1
P-acsAB3	22,44	25,44	28,77	32,19	-3,26	1,0
P-gyrA	25,50	28,35	31,58	34,87	-3,13	1,1
P-recA	23,40	26,59	30,00	33,50	-3,37	1,0

Das Protokoll des Herstellers für den SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde mit einer endgültigen Primerkonzentration von 250 nM und einer cDNA-Templatmenge von 50 ng befolgt. Die Reaktion wurde auf einem Bio-Rad® CFX96™ unter Verwendung des in Tabelle 14 dargestellten Thermocycling-Protokolls durchgeführt.

Tabelle 14. Programm der RT-qPCR.

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 sek
	Denaturierung	95 °C	10 sek
40	Annealing	55 °C*	10 sek
	Extension	60 °C	15 sek
1	Denaturation	95 °C	5 sek
1	Melting curve	65 °C	5 sek
1		95 °C $\Delta 0.5^\circ\text{C}$	

*Falls die optimale T_a bei 60 °C lag wurde der Annealing Schritt durch eine auf 20 sek verlängerte Extension Zeit ersetzt

2.4.4.1 Relative Quantifizierung

Eine relative Quantifizierungsanalyse (Livak and Schmittgen 2001; Pfaffl 2001) wurde für die Proben verwendet, die aus stehenden Kulturen von *K. hansenii* ATCC 23769 gewonnen wurden. Die gesamt RNA wurde an mehreren Tagen während der Kultivierungsperiode isoliert. Für diese Proben wurde die Expression der GOIs im Verhältnis zur Expression des Referenzgens *gyrA* am selben Tag bewertet.

2.4.4.2 Absolute Quantifizierung

Die Expressionsanalyse der CS-Gene sowie der Referenzgene in *K. hansenii* ATCC 53582 erfolgte mittels absoluter Quantifizierung aus Flüssigkulturen, die für 3 Tage in

Gegenwart von Cellulase kultiviert wurden (2.3.3) (Cusick et al. 2015; Whelan et al. 2003). Für die absolute Quantifizierung wurde eine Standardkurve von 1 pg bis 10 ng unter Verwendung von gDNA als Referenz gemessen (Hernández-Arriaga et al. 2019; Pfaffl 2012). Die Abundanz der Zielgene wurde entsprechend der folgenden Gleichung (Whelan et al. 2003) berechnet, nachdem der Schwellenwertzyklus (Ct) gegen die logarithmische DNA-Zielkonzentration aufgetragen wurde:

$$\text{Konzentration Ziel DNA (Kopien } \mu\text{l}^{-1}) = \frac{N_A \times \text{Menge Ziel DNA (g } \mu\text{l}^{-1})}{M_w}$$

$N_A = 6.02 \cdot 10^{23}$ (1 mol^{-1}) (Avogadro Konstante)

$M_w = \text{DNA Gesamtlänge (dp)} \cdot 660$ ($\text{g mol}^{-1} \text{ dp}^{-1}$)

2.4.5 Proteomik

2.4.5.1 Probenvorbereitung

Die Proben für die proteomischen Messungen von *K. hansenii* ATCC 23769 und ATCC 53582 wurden aus Cellulose-produzierenden Flüssigkulturen in Gegenwart von 6 U/mL Cellulase extrahiert, die wie unter 2.3.3 beschrieben kultiviert wurden. Pro Probe wurden 5 mL der Flüssigkultur für 10 min bei 4.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Kontaminierende Mediumbestandteile und andere Zelltrümmer wurden durch zwei Waschschriffe in 1x PBS (10x PBS: 40,9g NaCl, 8,9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1g KCl, 1,2g KH_2PO_4 ; auffüllen auf 500 ml H_2O , pH = 7,3 – 7,4) entfernt. Es war wichtig, eine Verdünnung der Trifluoressigsäure (TFA) während der Proteinextraktion zu vermeiden, daher musste der Rückfluss nach der letzten Zentrifugation sehr sorgfältig entfernt werden. Die Proteinextraktion erfolgte gemäß der Empfehlung von BayBioMs unter Verwendung des folgenden TFA-Lyseprotokolls. Zunächst wurde das Zellpellet in 100 μL 100 % TFA für 5 min bei 55 °C in einem vorgeheizten Thermoblock inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 900 μL Neutralisationspuffer (2 M Tris, pH = 8,2) und gründliches Mischen neutralisiert. Der pH-Wert wurde mit pH-Teststreifen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemessen; lag der pH-Wert unter 8,0 – 8,2, musste er durch Zugabe geringer Mengen von 2 M Tris (ohne pH-Einstellung) angepasst werden.

Material & Methoden

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt und mit einer BSA-Standardkurve im Bereich von 0 – 2.000 µg/mL berechnet. Vor der Messung wurde jede Probe 1:1 in ddH₂O verdünnt, während jede BSA-Standardlösung 1:1 in Neutralisationspuffer (2 M Tris, pH = 8,2 + 10 % TFA) verdünnt wurde. 5 µL jeder Probe wurden mit 250 µL Bradford-Lösung (vor der Messung auf RT gebracht) gemischt und auf einer 96-Well-Platte in Triplikaten gemessen, 10 min bei RT inkubiert und bei $\lambda = 595\text{nm}$ gemessen. Nach der Proteinquantifizierung wurden die Proben bei -80 °C gelagert und für die abschließende Proteomikmessung zum BayBioMs gebracht. Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Christina Ludwig am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) durchgeführt. Die massenspektrometrischen Daten wurden im “ProteomeXchange Consortium” über das PRIDE Partner-Repository zur Verfügung gestellt. Die Identifikationsnummer des Datensatz lautet PXD037699 (Zugriff über den Gutachter Zugang möglich – Benutzername: reviewer_pxd037699@ebi.ac.uk, Passwort: RkhR8g6e).

2.4.5.2 Analyse des Proteoms

Für die Proteomanalyse wurde das Referenzproteom von *K. hansenii* ATCC 23769 vom NCBI heruntergeladen (Datum des Downloads: 22.11.2021; Zugang: NZ_CM000920, Nukleotidsuche) und mit den Sequenzen für BcsAB1 und BcsC1 unter Verwendung der Einträge unter der *Accession number* Q76K8 bzw. Q76KJ7 aus der UniProt-Datenbank ergänzt (Datum des Downloads: 22.11.2021). Die vollständigen Proteomdaten von *K. hansenii* ATCC 53582 wurden ohne Änderungen vom NCBI heruntergeladen (Downloaddatum: 22.11.2021; Zugang: FBVP01000001, Nukleotidsuche). Die Zuordnung der verwendeten ProteinIDs erfolgte am Downloaddatum und ist in Tabelle 15 und Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 15. Übersicht der an der Cellulosesynthese beteiligten Proteine.

<i>K. hansenii</i> ATCC 23769		<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	
CmcAx	WP_174805759.1	CmcAx	CUW46504.1
Ccp	WP_080545399.1	Ccp	CUW46505.1
BcsAB1	sp Q76KJ8 ACSA1_KOMHA; WP_110550132.1	BcsAB1	CUW46506.1
BcsC1	tr Q76KJ7 Q76KJ7_KOMHA	BcsC1	CUW46507.1
BcsD	WP_003617981.1	BcsD	CUW46508.1
BglAx	WP_040511561.1	BglAx	CUW46510.1
BcsAB2	WP_003621570.1	BcsC2	CUW48390.1
BcsAB2 ORF2	WP_003621572.1	BcsY	CUW48391.1
BcsY	WP_003621573.1	BcsY	CUW48392.1
BcsC2	WP_064478823.1	BcsAB2	CUW48393.1
BcsAB3	WP_003619636.1	BcsAB3	CUW47136.1
BcsC3	WP_003619637.1	BcsC3	CUW47137.1

Tabelle 16. Die Proteine der Glucose-Aktivierung sowie die der analysierten DGCs.

<i>K. hansenii</i> ATCC 23769		<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	
pyro	WP_003622230.1	GlkA	CUW48521.1
glk	WP_003618365.1	Glk	CUW46742.1
pgm	WP_003619969.1	Pgm	CUW46964.1
ugp1	WP_040511958.1	Ugp1	CUW47019.1
DgcA	WP_003617106.1	DgcA	CUW46099.1
DgcB	WP_003621901.1	DgcB	CUW48224.1

Die massenspektrometrische Messung wurde anhand der Software MaxQuant (version 1.6.3.4) (Tyanova et al. 2016) und der integrierten Suchmaschine Andromeda (Cox et al. 2011) durch Christina Ludwig (BayBioMs, Freising, Deutschland) analysiert. Unspezifische Treffer wurden durch Filterung der Daten auf Grundlage von vier gültigen Werten in mindestens einer Gruppe reduziert. Eine Gruppe besteht aus den vier biologischen Replikaten des Wildtyps oder der Mutante, die nur BcsAB1 exprimiert. Jeder fehlende Wert wurde mit einem konstanten Wert (17) ersetzt, dieser war etwas kleiner als jeder in einer Probe gemessene Wert. Die relative Häufigkeit der Proteine wurde innerhalb von MaxQuant entsprechend des Massenanteils bewertet, der aus den Werten der intensitätsbasierten absoluten Quantifizierung (iBAQ) (Schwanhäusser et al. 2011) jeder Probe berechnet wurde. Außerdem wurden die Unterschiede zwischen den Stämmen ebenfalls anhand der iBAQ-Werte analysiert. Um die Komplexität der Daten zu reduzieren, wurden nur die Proteine detailliert analysiert, die mit den drei CS-Genclustern in Verbindung stehen, die an der Aktivierung der Cellulosesynthasen oder der Aktivierung der Glucose beteiligt sind.

2.4.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LCSM)

K. hansenii ATCC 23769 synthetisiert nach einigen Tagen bei unbewegter Kultivierung einen deutlich sichtbaren Cellulosebiofilm an der Grenzfläche zwischen Luft und Kulturmedium. Da für jedes der drei CS-Gene eine andere Funktion vermutet wird, wurden *in-frame*-Insertionen der ORFs von Fluoreszenzproteinen an die jeweiligen Cellulosesynthasen konstruiert (2.1.3.2.2). Das entsprechende Expressionssignal sollte die Lokalisierung jeder CS-Synthase in einem nativen Biofilm nach 21 Tagen Kultivierung ermöglichen. Die dem medium- bzw. der luftzugewandte Seite des Biofilms bilden Nischen, welche durch ein unterschiedliches Nährstoff- bzw. Sauerstoff-Vorkommen geprägt sind (Hornung et al. 2006).

Die Biofilmproben wurden 21 Tage lang in statischen, unbewegten Kulturen, wie oben beschrieben (2.2.2), kultiviert. Während des gesamten Präparationsverfahrens und während der konfokalen Mikroskopie war es wichtig, die Orientierung des Biofilms im aufrecht zu erhalten. Nach Entfernung des restlichen Mediums durch Waschen der Biofilme in 4 mL 1x PBS (10x PBS: 40,9g NaCl, 8,9g Na₂HPO₄*2H₂O, 1g KCl, 1,2g KH₂PO₄; auffüllen auf 500 ml H₂O, pH = 7,3 – 7,4) wurde der Biofilm mit 1,5 mL 4%iger PFA-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt und über Nacht inkubiert. Dann wurde die PFA-Lösung verworfen und die restlichen Spuren durch vorsichtiges Waschen des Biofilms in 1x PBS (10x PBS: 40,9g NaCl, 8,9g Na₂HPO₄*2H₂O, 1g KCl, 1,2g KH₂PO₄; auffüllen auf 500 ml H₂O, pH = 7,3 – 7,4) entfernt. Die anschließende Dehydratisierung der Probe erfolgte manuell in Biopsie-Einbettkassetten nach dem in Tabelle 17 dargestellten Verfahren.

Tabelle 17. Dehydratisierung der Biofilmproben zur Fluoreszenzmikroskopie

Lösung	Dauer
1xPBS	60 min
1xPBS	60 min
EtOH (25 %)	60 min
EtOH (50 %)	60 min
EtOH (75 %)	60 min
EtOH (90 %)	60 min
EtOH abs.	60 min
EtOH abs.	60 min
EtOH abs.	60 min und Lagerung

Material & Methoden

Der dehydratisierte Biofilm wurde halbiert, damit die zu analysierende Probe aus dem inneren Bereich des Biofilms entnommen werden konnte. Die Einbettung erfolgte anschließend am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie der Pflanzen (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland), der die Einbettungs- und Schneidegeräte freundlicherweise zur Verfügung stellte. Zunächst wurde der Biofilm in einen bereits teilweise mit Paraffin gefüllten Einbettungsträger gelegt und so ausgerichtet, dass die korrekte Ausrichtung des Biofilms erhalten blieb. Dann wurde der Rahmen gefüllt und abgedeckt, und das Paraffin verfestigt. Jede Probe wurde zunächst am Mikrotom grob geschnitten (30 µm), bis die Biofilmprobe erreicht wurde. Für die Vorbereitung der Proben erfolgte das Schneiden mit auf 10 µm reduzierter Schnittdicke. Ein Streifen von etwa 4 Proben wurde in ein Becherglas mit warmem Wasser übertragen, 90 sec lang gestreckt und auf einen vorgewärmten (42 °C) Objektträger gebracht. Die Proben wurden durch eine Inkubation bei 42 °C über Nacht fixiert. Das restliche Paraffin wurde durch eine Waschserie in HistoClear II (National Diagnostics, Atlanta, USA) (2x 10 min) und EtOH abs. (2x 2 min) entfernt. Vor der konfokalen Mikroskopie wurde der Deckel durch Zugabe von 90 µL Mowiol 4-88 + DABCO (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf dem Objektträger fixiert.

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde an der Professur für Neuronale Schaltkreise und Stoffwechsel (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) mit einem Leica TCS SP8 X WLL2 upright HyVolution 2 (Leica, Wetzlar, Deutschland) und einem 63x Immersionsöl-Objektiv durchgeführt. Für den Nachweis der fluoreszierenden Reporter wurden die folgenden Detektorbereiche des HyD-Detektors verwendet: sfGFP 493 – 525 nm, mRFP1 585 – 720 nm und mKalama1 420 – 484 nm. Ein Hellfeldbild wurde jeweils mit dem PMT-Detektor aufgenommen. Für alle Bilder wurde die Größe der Lochblende auf 0,5 eingestellt und eine Zeilenmittelung von 10 vorgenommen, während die Geschwindigkeit während der Aufnahme auf 100 und während des Screenings auf 400 eingestellt war. Die übrigen Parameter in der Steuerungssoftware wurden auf die Standardwerte gesetzt. Alle aufgenommenen Bilder wurden mit der Leica Application Suite X (Version 3.5.6.21594) (Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert und verarbeitet.

2.4.7 Rasterelektronenmikroskopie bakterieller Cellulose

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die räumliche Verteilung der Cellulose-Fasern und die Zusammensetzung des Biofilm-Netzwerks im Detail untersucht. Die REM-Proben wurden nach 21 Tagen statischer, unbewegter Kultivierung von *K. hansenii* ATCC 23768 bzw. nach 6 Tagen bei *K. hansenii* ATCC 53582 hergestellt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C in 1x PBS (10x PBS: 40,9g NaCl, 8,9g Na₂HPO₄*2H₂O, 1g KCl, 1,2g KH₂PO₄; auffüllen auf 500ml H₂O, pH = 7,3 – 7,4) oder 2,5% Glutardialdehyd inkubiert und in einer aufsteigenden EtOH-Reihe dehydratisiert (Tabelle 18).

Tabelle 18. Dehydratisierung BC für REM

Lösung	Dauer
EtOH 20 %	20 min
EtOH 30 %	20 min
EtOH 40 %	20 min
EtOH 60 %	30 min
EtOH 80 %	60 min
EtOH abs.	60 min + Lagerung

Die in EtOH abs. aufbewahrten Biofilmproben wurden zur Core Facility Elektronenmikroskopie der LMU (Pflanzliche Entwicklungsbiologie, LMU München, Martinsried, Deutschland) gebracht und von Andreas Klingl bearbeitet. Dazu wurden die Proben vor der Analyse mit einer dünnen Platinschicht beschichtet (sog. ‚sputter coating‘). Alle in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen zeigen die der Luft zugewandten Oberseite des Biofilms.

Bakterielle Cellulose von *K. hansenii* erwies sich als anspruchsvolles Material für die REM. Zunächst erfolgte die Entwässerung nach dem Standardprotokoll für die Probenvorbereitung durch eine aufsteigende Acetonreihe und anschließende Luft- oder Gefriertrocknung (persönliche Mitteilung Gerhard Wanner & Andreas Klingl). Nur dadurch, dass die Dauer der Acetonbehandlung zwischen zwei getesteten Protokollen erhöht wurde, konnte die auflösende Wirkung von Aceton auf das Cellulose-Netzwerk beobachtet werden. Insbesondere die von BcsAB2 und BcsAB3 in *K. hansenii* ATCC 23768 synthetisierten EPSs wurden auch bei kurzer Inkubation nahezu vollständig aufgelöst. Daher wurden für Biofilme von *K. hansenii* ATCC 53582

nur Aufnahmen von mit EtOH dehydratisierten Biofilmen gemacht. Die Dehydratisierung durch EtOH wird für zukünftige REM-Analysen bakterieller Cellulose empfohlen.

2.4.8 Bestimmung des Schwimm- und Schwarmverhaltens

Cyclisches di-GMP ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der zu zahlreichen intrazellulären Prozessen wie Biofilmbildung, Motilität oder Zellzykluskontrolle beiträgt (Jenal et al. 2017). Diese Arbeit konzentrierte sich hauptsächlich auf den Beitrag der regulatorischen DGCs zur Biofilmbildung. Außerdem sollte der Beitrag von DgcA (GXY_RS01540/ATCC53582_00180) und DgcB (GXY_RS14245/ATCC53582_02359) zur Zellmotilität in beiden Stämmen aufgeklärt werden.

Eine Charakterisierung der Motilität durch Hellfeldmikroskopie an lebenden Zellen war nicht zweifelsfrei möglich, daher wurde ein Schwimm- und Schwarmtest durchgeführt (Jacek et al. 2019; Kearns 2010). Diese Assays zielen auf die Motilität von Zellen in der feuchten Umgebung auf der Oberfläche von Weichagarplatten mit unterschiedlichen Agar-Konzentrationen ab. Beide Tests wurden auf EP_{mod}-Medium durchgeführt, wobei für die Analyse der Schwarmaktivität 0,5 % Agar zugesetzt wurden, während für die Schwimmversuche die reduzierte Menge von 0,3 % Agar verwendet wurde. Hauptkulturen von *K. hansenii* ATCC 23769, ATCC 53582, $\Delta dgcA$ und $\Delta dgcB$ beider Stämme wurden in EP_{mod} bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 beimpft und 5 h lang bei 30 °C und 180 U/min bebrütet. Anschließend wurden 5 μ L jeder Kultur in die Mitte der frisch zubereiteten schwimm-/schwarm- Agarplatte gegeben und 12 Tage lang bei 30 °C bebrütet. Die Ausbreitung wurde durch Messen des Durchmessers jeder Kolonie mit dem Messwerkzeug von GIMP (Open Source) bewertet.

2.4.9 Bioinformatik

Alle Versuche basieren auf mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten. Sofern anwendbar wurden mehrere technische Replikate einer Probe gemessen. Die Messwerte werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben, letztere wurde mittels der Funktion STABW.S in Microsoft Excel (Redmond, USA) berechnet.

Material & Methoden

Die statistischen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten wurden mittels Student's t-Test ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Da einige Ergebnisse als äußerst signifikant angesehen werden konnten, wurde das Signifikanzniveau durch die Anzahl der Sternchen spezifiziert und im Ergebnisteil wie folgt weiter definiert: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,025$; *** = $p < 0,0001$.

Die Konstruktion des phylogenetischen Baums basierte auf einem Sequenzalignement in Mega11 (Stecher et al. 2020) unter zur Hilfenahme des ClustalW Algorithmus (Thompson et al. 1994). Der phylogenetische Baum wurde anhand der statistischen Methode Maximum-Likelihood berechnet, wobei der Test auf Phylogenie mittels Bootstrap (100 Wiederholungen) und den Standardeinstellungen der Software erfolgte.

Der Entwurf geeigneter Primer, die Berechnung der dazugehörigen Schmelztemperatur, sowie die Auswertung der Sequenzierungs-Ergebnisse und ein *in silico* Restriktionsverdau erfolgte in der Software Clone Manger (Version 9 – Professional) (Scientific and Educational Software, Denver, USA). Einzig für die Auswahl der RT-qPCR-Primer wurde auf die Webapplikation PrimerQuest™ (IDT, Coralville, USA) zurückgegriffen.

3. Ergebnisse

Diese Arbeit baut auf Vorarbeiten zur Etablierung des kolorimetrischen Anthron-Assays, wie auch auf Vorbereitungen zur Erstellung der Mehrfach-Deletionsstämme von *K. hansenii* ATCC 23769 auf, welche bereits in meine Masterarbeit (Bimmer 2017) eingeflossen sind. Einzeldelationen der CS-Gene *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCCC 23769 sowie die gleichzeitige Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* und die Deletionen der akzessorischen Proteine in *K. hansenii* ATCCC 23769 wurden von Markus Mientus erstellt und sind bisher unveröffentlicht.

Ein Teil der Ergebnisse, die im Rahmen dieses Promotionsprojekts entstanden sind, wurden in den beiden Publikationen Bimmer et al. (2022) und Bimmer et al. (2023) beschrieben. Die unveränderte Übernahme von Abbildungen und Tabellen wurde im Text mit den entsprechenden Referenzen versehen.

3.1 Bioinformatischer Vergleich von *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582

3.1.1 Phylogenetische Einordnung innerhalb des Genus *Komagataeibacter*

Die Analyse der Genetik der Cellulosesynthese in Essigsäurebakterien wurde aufgrund der Vorarbeiten von Markus Mientus in *K. hansenii* ATCCC 23769 begonnen, da sich dieser Stamm gegenüber anderen Essigsäurebakterien durch eine erhöhte Cellulosesyntheserate auszeichnet. In der Literatur sind weitere Vertreter der *Acetobacteraceae* beschrieben, deren Menge an produzierter Cellulose deutlich über der des Stamms ATCC 23769 liegt. Deshalb wurde zu Beginn dieser Arbeit *K. hansenii* ATCCC 53582 als Hoch-Cellulose-Produktionsstamm von besonderem Interesse identifiziert und aufgrund der Verfügbarkeit der vollständigen Genomsequenz als zweiter, zu analysierender Stamm ausgewählt. Durch diese Auswahl war es möglich innerhalb dieser Arbeit zwei eng verwandte Stämme hinsichtlich der Ursachen für die deutlichen Unterschiede in der Cellulose-Quantität zu untersuchen.

Die phylogenetische Neucharakterisierung und Neueinteilung beider Stämme in die Gattung *Komagataeibacter* durch Yamada et al. (2012a) und Yamada et al. (2012b) legt eine enge Verwandtschaft beider Stämme, im Vergleich zu den übrigen *Komagataeibacter* Stämmen, nahe. Für eine bessere Darstellung der Einordnung in die Gattung wurde ein entsprechender phylogenetischer Baum berechnet. Dem Alignment lagen die 16S rRNA Sequenzen dieser Gattung zu Grunde, welche anschließend in MEGA11 (VERSION 11.0.10) (Stecher et al. 2020) mittels des ClustalW analysiert wurden (Thompson et al. 1994). Zur Erstellung des phylogenetischen Baums wurde dieses Alignment mit der statistischen Methode *maximum likelihood* und dem phylogenetischen Test *bootstrap test* (100 Wiederholungen) prozessiert. Die übrigen Parameter wurden entsprechend der Standardeinstellungen der Software belassen. Im phylogenetischen Baum sind die beiden Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden mit einem Punkt hervorgehoben (Abbildung 7). Aufgrund der phylogenetischen Untersuchung ließ sich die enge Verwandtschaft der beiden Stämme bestätigen. Umso mehr wird die Ursache für die unterschiedliche Menge an

Ergebnisse

freigesetzter Cellulose in Veränderungen innerhalb der drei Cellulosesynthase-Gencluster vermutet.

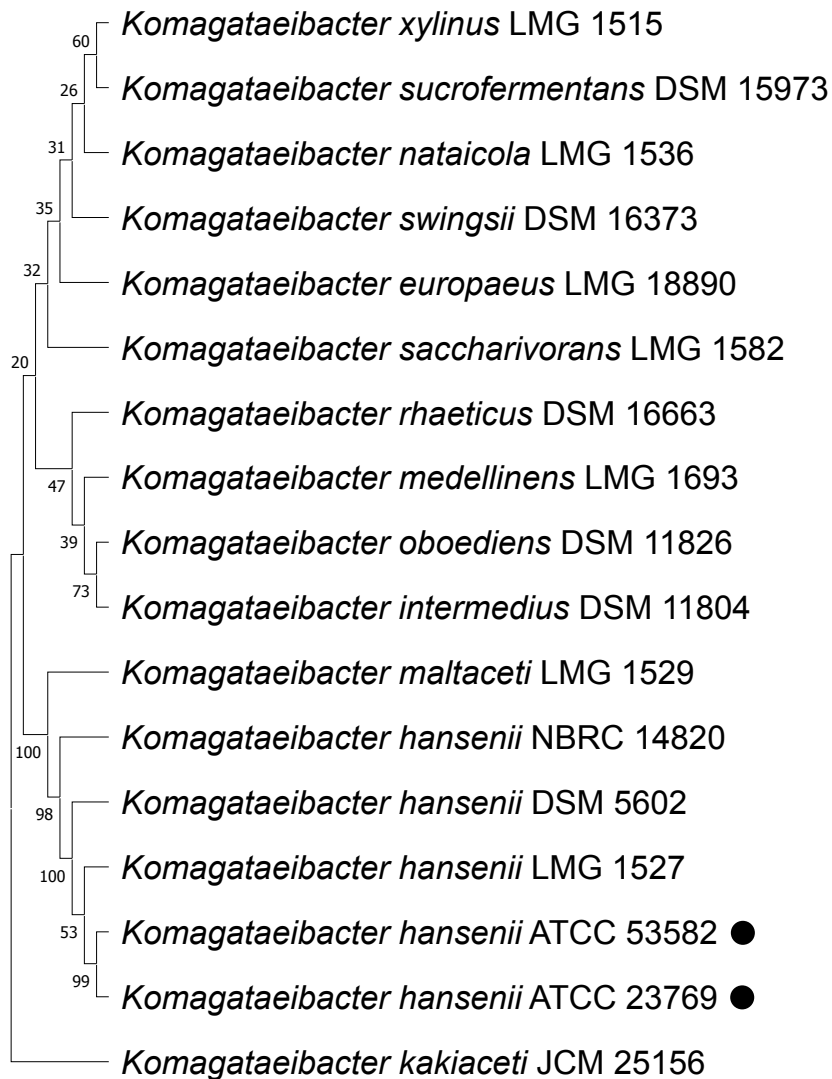


Abbildung 7. Phylogenetischer Baum des Genus *Komagataeibacter* basierend auf 16S rRNA Sequenzierung. Mit schwarzen Punkten sind die beiden *K. hansenii*-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Das Sequenzalignement erfolgte in Mega11 unter zur Hilfenahme des ClustalW Algorithmus. Der phylogenetische Baum wurde anhand der statistischen Methode *Maximum-Likelihood* berechnet, wobei der Test auf Phylogenie mittels Bootstrap (100 Wiederholungen) erfolgte.

3.1.2 Vergleich der *bcsABCD* Cellulosesynthase-Operons

Das Cellulosesynthase-Operon von *Komagataeibacter* wird als Operon mit der typischen Struktur *bcsABCD* beschrieben (Römling and Galperin 2015; Wong et al. 1990). Da beide in dieser Arbeit analysierten Stämme sich im Aufbau der Operons nicht unterscheiden (Abbildung 3; Abbildung 4) sollte die Ähnlichkeit der enthaltenen Gene und Proteine untersucht werden. Dazu wurde ergänzend zum Vergleich der 16S rRNA ein Alignment der Proteinsequenzen der drei kodierten Cellulosesynthasen durchgeführt. Dabei wurden die Sequenzen von BcsAB1 (ATCC 23769: 1.552 AS / ATCC 53582: 1.661 AS), BcsAB2 (1.640 AS / 1.668 AS) und BcsAB3 (1.523 AS / 1.531 AS) sowohl innerhalb eines Stamms, als auch zwischen beiden Stämmen verglichen und ein phylogenetischer Baum berechnet (Abbildung 8). Dem Alignment lagen die Aminosäuresequenzen beider Stämme zu Grunde, diese Sequenzen bildeten auch die Grundlage für den späteren Vergleich des Proteoms (3.6). Die Analyse und Berechnung des Baumes erfolgten analog zum bereits zuvor gezeigten phylogenetischen Baum der 16S rRNA Sequenzen und zeigt eine stammübergreifende Gruppierung der einzelnen Cellulosesynthasen sich entsprechend der unterschiedlichen Cellulosesynthase-Operons bzw. Gencluster (Abbildung 8).

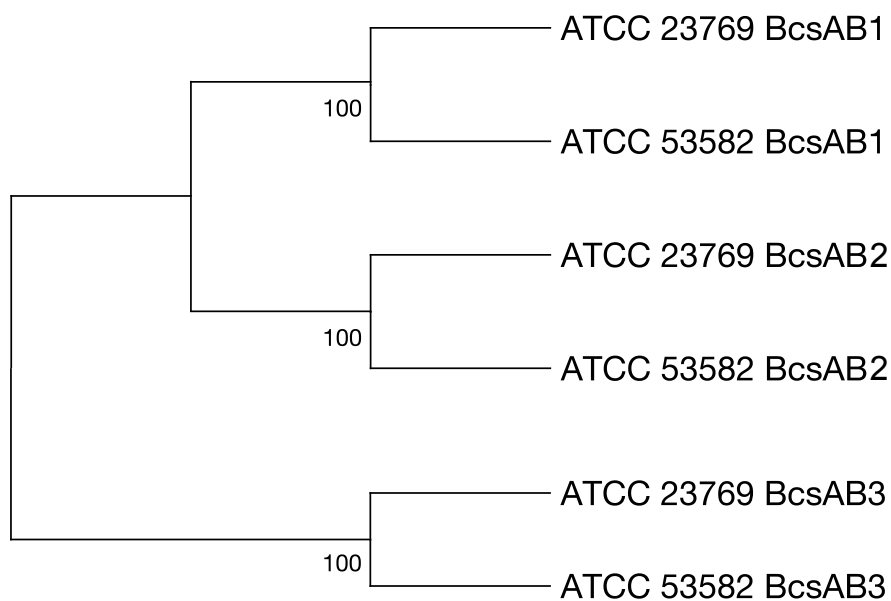


Abbildung 8. Phylogenetischer Baum basierend auf der Proteinsequenz der Cellulosesynthasen in beiden *Komagataeibacter* Stämmen.

Ergebnisse

Eine detaillierte Charakterisierung der Verwandtschaft zwischen den einzelnen Cellulosesynthasen beider Stämme erforderte die Analyse mittels BLAST (Altschul et al. 1990). Generell lässt sich sagen, dass die Übereinstimmung zwischen beiden Stämmen, bezogen auf die Ähnlichkeit innerhalb der beiden Proteine für BcsAB1, BcsAB2 bzw. BcsAB3, über die gesamte Länge der Proteine sehr hoch ist, lediglich einzelne Positionen weisen einen AS-Austausch auf. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Sequenzen der drei Cellulosesynthasen innerhalb eines Stamms deutlich über die gesamte Länge, ohne dass sich ein Bezug zu funktionalen Domänen herstellen ließe. Die Analyse der Homologie der Aminosäuresequenzen erfolgte durch BLASTp-Analyse (Tabelle 19). Durch dieses Alignments konnte die höchste Homologie für die Cellulosesynthase BcsAB2 zwischen beiden Stämmen bestimmt werden (99,94 % Aminosäuresequenzidentität). Auch die Proteinsequenzen der anderen beiden Cellulosesynthasen wiesen eine sehr hohe Übereinstimmung auf. Diese lag bei der Haupt-Cellulosesynthase BcsAB1 (99,55 %), wie auch bei der dritten Cellulosesynthase BcsAB3 (99,53 %) nur leicht unterhalb der Ähnlichkeit von BcsAB2. Im Gegensatz dazu ergab das Alignment der Proteine innerhalb eines Stamms deutliche Unterschiede. Zum einen verringerte sich die *Query Cover*, zum anderen sank die *Identity* der Proteinsequenz deutlich (Tabelle 19).

Die große Ähnlichkeit der Cellulosesynthasen zwischen *K. hansenii* ATCC 23769 und dem Hochproduktionsstamm ATCC 53582 spiegelte sich auch in den Nukleotidsequenzen der CS-Gene *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* wider, welche mittels BLASTn-Analyse verglichen wurden. Jedoch zeigte sich der beschriebene Unterschied von *bcsAB1* zu *bcsAB2* und *bcsAB3* auch durch eine stärkere Abweichung des *Query Covers* und einer daraus resultierenden geringen Übereinstimmung (Tabelle 20).

Ergebnisse

Tabelle 19. BLASTp-Analyse der Aminosäuresequenzen der Cellulosesynthasen der *K. hansenii* Stämme ATCC 23769 und ATCC 53582. QC = Query Cover, ID = Identity.

	ATCC 23769 – <i>bcsAB1</i>	ATCC 23769 – <i>bcsAB2</i>	ATCC 23769 – <i>bcsAB3</i>	ATCC 53582 – <i>bcsAB1</i>	ATCC 53582 – <i>bcsAB2</i>	ATCC 53582 – <i>bcsAB3</i>
ATCC 23769 – <i>bcsAB1</i>		QC: 97 % ID: 46,34 %	QC: 94 % ID: 40,89 %			
ATCC 23769 – <i>bcsAB2</i>			QC: 91 % ID: 53,15 %			
ATCC 53582 – <i>bcsAB1</i>	QC: 100 % ID: 99,55 %				QC: 93 % ID: 46,46 %	QC: 91 % ID: 40,79 %
ATCC 53582 – <i>bcsAB2</i>		QC: 100 % ID: 99,94 %				QC: 89 % ID: 53,15 %
ATCC 53582 – <i>bcsAB3</i>			QC: 100 % ID: 99,53 %			

Tabelle 20. BLASTn-Analyse der Nukleotidsequenzen der Cellulosesynthase-Gene der *K. hansenii* Stämme ATCC 23769 und ATCC 53582. QC = Query Cover, ID = Identity.

	ATCC 23769 – <i>bcsAB1</i>	ATCC 23769 – <i>bcsAB2</i>	ATCC 23769 – <i>bcsAB3</i>	ATCC 53582 – <i>bcsAB1</i>	ATCC 53582 – <i>bcsAB2</i>	ATCC 53582 – <i>bcsAB3</i>
ATCC 23769 – <i>bcsAB1</i>		QC: 49 % ID: 72,87 %	QC: 27 % ID: 69,23 %			
ATCC 23769 – <i>bcsAB2</i>			QC: 36 % ID: 70,51 %			
ATCC 53582 – <i>bcsAB1</i>	QC: 100 % ID: 99,15 %				QC: 47 % ID: 72,54 %	QC: 24 % ID: 69,58 %
ATCC 53582 – <i>bcsAB2</i>		QC: 100 % ID: 99,50 %				QC: 35 % ID: 69,93 %
ATCC 53582 – <i>bcsAB3</i>			QC: 100 % ID: 98,94 %			

Ergebnisse

Neben den Cellulosesynthasen bilden die Kanalproteine BcsC1, BcsC2 und BcsC3, sowie BcsD die essentiellen Bestandteile eines vollständigen Cellulosesynthase-Operons vom *bcsABCD*-Typ (Römbling and Galperin 2015; Wong et al. 1990). Die Homologie von BcsD bzw. *bcsD* lag auf Ebene der Aminosäuresequenz zwischen beiden Stämmen bei 100 % (Nukleotidsequenz 99,35 %). Diese hohe Konservierung der Sequenz deutet einen entscheidenden Beitrag des Proteins innerhalb des CS-Komplexes an. Ebenso wie die Cellulosesynthasen unterschieden sich die Kanalproteine zwischen den einzelnen Gen-Loci deutlich, dagegen unterscheiden sich diese wiederum kaum zwischen den beiden Stämmen (Tabelle 21, Tabelle 22).

Tabelle 21. BLASTp-Analyse der Aminosäuresequenzen der Kanalproteine in den *K. hansenii* Stämmen ATCC 23769 und ATCC 53582. QC = Query Cover, ID = Identity.

	ATCC 23769 – <i>bcsC1</i>	ATCC 23769 – <i>bcsC2</i>	ATCC 23769 – <i>bcsC3</i>	ATCC 53582 – <i>bcsC1</i>	ATCC 53582 – <i>bcsC2</i>	ATCC 53582 – <i>bcsC3</i>
ATCC 23769 – <i>bcsC1</i>		QC: 94 % ID: 30,88 %	QC: 94 % ID: 29,28 %			
ATCC 23769 – <i>bcsC2</i>			QC: 99 % ID: 39,21 %			
ATCC 53582 – <i>bcsC1</i>	QC: 100 % ID: 99,62 %			QC: 97 % ID: 31,12 %	QC: 94 % ID: 29,44 %	
ATCC 53582 – <i>bcsC2</i>		QC: 100 % ID: 99,60 %				QC: 67 % ID: 39,31 %
ATCC 53582 – <i>bcsC3</i>			QC: 100 % ID: 98,90 %			

Ergebnisse

Tabelle 22. BLASTn-Analyse der Kanalprotein-Gensequenzen in den *K. hansenii* Stämmen ATCC 23769 und ATCC 53582. QC = Query Cover, ID = Identity.

	ATCC 23769 – <i>bcsC1</i>	ATCC 23769 – <i>bcsC2</i>	ATCC 23769 – <i>bcsC3</i>	ATCC 53582 – <i>bcsC1</i>	ATCC 53582 – <i>bcsC2</i>	ATCC 53582 – <i>bcsC3</i>
ATCC 23769 – <i>bcsC1</i>		QC: 15 % ID: 73,68 %	QC: 1 % ID: 73,68 %			
ATCC 23769 – <i>bcsC2</i>			QC: 17 % ID: 65,27 %			
ATCC 53582 – <i>bcsC1</i>	QC: 100 % ID: 99,18 %				QC:15 % ID: 65,19 %	QC: 1 % ID: 73,68 %
ATCC 53582 – <i>bcsC2</i>		QC: 100 % ID: 99,09 %				QC: 10 % ID: 68,09 %
ATCC 53582 – <i>bcsC3</i>			QC: 100 % ID: 99,00 %			

3.2 Weiterentwicklung eines markerfreien Deletionssystems für Cellulose-produzierende Essigsäurebakterien

3.2.1 Konstruktion der Deletionsplasmide

Beide *K. hansenii* Stämme kodieren in ihrem Genom jeweils drei Gene für Cellulosesynthasen: *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3*. Jedoch ist der Beitrag jedes einzelnen Gens zum komplexen Cellulose-Netzwerk des Wildtyps bisher noch nicht geklärt worden. Bisherige Studien, die die Funktion der einzelnen Gene der Cellulosesynthese in Essigsäurebakterien untersuchten, waren auf Deletionssysteme beschränkt, die entweder auf Transposonmutagenese (Deng et al. 2013), Plasmidintegration und Funktionsverlust von *bcsAB1* (Saxena and Brown 1995) oder die Insertion einer Antibiotikaresistenz-Kassette (Jacek et al. 2018) aufbauten. Diese Systeme basieren auf dem Mechanismus der Gendisruption und verhindern so die Synthese eines aktiven Proteins, werden aber möglicherweise von polaren Effekten begleitet. Die polaren Effekte können sich negativ auf die Synthese von Strang-abwärts kodierten Genen auswirken (Hutchison et al. 2019).

Die Analyse der Cellulosesynthese in Essigsäurebakterien ermöglicht ein verbessertes grundlegendes Verständnis der Polymersynthese, welche aufgrund der hohen Homologie des CS-Komplexes auch Erkenntnisse für die Mechanismen der Cellulosesynthese in Pflanzen liefert. Umso entscheidender ist es daher ein zuverlässiges Deletionssystem zu entwickeln, welches unter Aufrechterhaltung des Leserasters genutzt werden kann, um Gene schnell und spezifisch zu deletieren. Hierfür eignet sich besonders das in unserer Arbeitsgruppe von Kostner et al. (2013) entwickelte System, welches auf den *codBA*-Gegenselektionsmechanismus zurückgreift und bisher in *Gluconobacter*- (Phylum Proteobacteria), wie auch in *Bacillus*-, *Clostridien*- (beide Phylum Bacillota, syn. Firmicutes) und *Micrococcus*-Stämmen (Phylum Actinobacteria) erfolgreich eingesetzt werden konnte (Bode 2021; Huang et al. 2018; Kostner et al. 2017; Surger et al. 2018).

Die Klonierung der entsprechenden Deletionsplasmide, wie auch die der Insertionsplasmide basierte auf der SLiCE Methode (Zhang et al. 2014). Hierzu war es notwendig, zunächst geeignete flankierende Bereiche der zu deletierenden Gene bzw. der Insertionsstelle festzulegen. Da eine Verschiebung im Leserahmen vermieden

Ergebnisse

werden und gleichzeitig eine vollständige Deletion des Zielgens erfolgen sollte, wurde der rückwärts-Primer zur Amplifikation der vor dem Gen liegenden Flanke unmittelbar vor das Start-Codon, bzw. der vorwärts-Primer der nach dem Gen liegenden Flanke unmittelbar an das Stopp-Codon anschließend gelegt (Abbildung 5). Konnte an diesen Stellen aufgrund der Genomsequenz kein Primerpaar entworfen werden, das den Kriterien für den erfolgreichen Einsatz in einer PCR entsprachen, so wurden die Primer in Basen-Triplett-Schritten verschoben. Folglich blieb der Leserahmen unverändert und polare Effekte wurden vermieden. Die Primer wurden so gewählt, dass beide Flanken möglichst eine vergleichbare Länge aufwiesen und einer Länge von ca. 800 - 1.100bp entsprachen (Gen_SL-FL A/B_for/rev). Dies ermöglichte zum einen eine vergleichbare Wahrscheinlichkeit für eine Rekombination über jede der beiden Flanken, zum anderen einen ausreichend langen homologen Bereich, über den die Rekombinationsreaktion während der Plasmid-Integration ablaufen konnte. Ein effizientes zusammenfügen der Fragmente während der SLiCE-Reaktion wurde durch entsprechende 5'-Überhänge an allen Primern gewährleistet. Entsprechend dieser Überhänge ließ sich die Reihenfolge und Orientierung der Fragmente während der Klonierung spezifisch festlegen. Die homologen Flanken wurden in das bereits vorhandene pKOS6b-Plasmid innerhalb der *multiple cloning site* eingefügt. Die Amplifikation der einzelnen Fragmente, die in der SLiCE-Reaktion eingesetzt werden, erfolgte mit einer Polymerase, die neben der 5'→3' – Polymeraseaktivität auch eine 3'→5' – Exonukleaseaktivität zur Fehlerkorrektur aufwies. In der anschließenden SLiCE-Reaktion, mit aufgereinigten PCR-Fragmenten, stellte sich der Vergleich verschiedener Verhältnisse von Vektor und Insert als unabdingbar heraus. Vektor : Insert-Verhältnisse von 1:5, 1:10 und 1:20 zeigten für die jeweiligen Konstrukte eine unterschiedliche Effizienz, wodurch hier keine eindeutige Empfehlung gegeben werden kann. Die Transformation erfolgte in dieser Arbeit in chemo-kompetente *E. coli* TOP10 Zellen, ein anfänglicher Vergleich mit *E. coli* DH10β zeigte keine Auswirkungen auf die nachfolgende Konjugationseffizienz.

Die erzeugten Deletions- und Insertions-Vektoren wurden in einem dreistufigen Prozess validiert. Dieser umfasste zunächst den spezifischen Restriktionsverdau des entstandenen Plasmids, eine anschließende PCR-Amplifikation der inserierten

Ergebnisse

Bereiche mit zum Plasmidrückgrat spezifischen Primern (pKOS6b_check1_for/rev) und abschließend der Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte.

Der genomischen Insertion der ORFs für Fluoreszenz-Gene zur räumlichen Darstellung der Expression der drei CS-Gene in *K. hansenii* ATCC 23769 ging ein *proof-of-concept* Nachweis voraus. Da zum Zeitpunkt des Experiments die Nutzung von sfGFP in *Komagataeibacter* noch nicht beschrieben war, wurde zunächst ein Expressionsplasmid konstruiert. Dieses Plasmid basierte auf dem bereits in *Gluconobacter* etablierten Plasmid pMM3b (Mientus et al. 2017). Einzig die verwendete Promotor-Region wurde durch die entsprechende regulatorische Sequenz vor *bcsAB1* aus *K. hansenii* ATCC 23769 ersetzt. So konnte die Expression von *sfGFP* entsprechend der Expression der Cellulosesynthase induziert werden.

3.2.2 Transformation von *K. hansenii* ATCC 23769

Die genutzte Methode zur Transformation beider *Komagataeibacter* Stämme unterschied sich, da lediglich für *K. hansenii* ATCC 23769 triparentale Konjugation erfolgreich war. Triparentale Konjugation wurde erstmal von Goldberg and Ohman (1984) beschrieben und unter Hölscher and Görisch (2006) erstmal auf Essigsäurebakterien, im Stamm *G. oxydans* angewandt. Unter Anwendung des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Protokolls (Bode 2021; Kostner et al. 2013; Mientus et al. 2017) sind die in Tabelle 23 gezeigten Stämme konstruiert worden. Es ist anzumerken, dass es im Verlauf dieser Arbeit nicht möglich war eine gleichzeitige Deletion von *dgcA* und *dgcB* zu erzeugen. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine solche Deletion den von cyclischem di-GMP regulierten Metabolismus zu stark negativ beeinflusst und sich für den Organismus als letal herausstellt.

Tabelle 23. Übersicht über die in dieser Arbeit erzeugten markerfreien Deletions-, Expressions- und Insertionsstämme von *K. hansenii* ATCC 23769.

Stamm	Eigenschaft
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$	Alleinige Expression von <i>bcsAB3</i> (GXY_RS08170)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$	Alleinige Expression von <i>bcsAB2</i> (GXY_RS13370)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	Deletion aller CS-Gene, Cel ⁻
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 $\Delta dgcA$	Deletion von <i>dgcA</i> (GXY_RS01540)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 $\Delta dgcB$	Deletion von <i>dgcB</i> (GXY_RS14245)
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 pMM3b_pAB1-23769_sfGFP	Expression von sfGFP unter Regulation durch den Promotor von <i>bcsAB1</i> aus <i>K. hansenii</i> ATCC 23769
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 sfGFP_ <i>bcsD</i>	Fusion des ORF für sfGFP an <i>bcsAB1</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 mRFP1_ <i>bcsAB2</i>	Fusion des ORF für mRFP1 an <i>bcsAB2</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 mKalama1_ <i>bcsAB3</i>	Fusion des ORF für mKalama1 an <i>bcsAB3</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 sfGFP_ <i>bcsD</i> -mKalama1_ <i>bcsAB3</i>	Doppelinsertion von mRFP1 an <i>bcsAB2</i> und mKalama1 an <i>bcsAB3</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 23759 sfGFP_ <i>bcsD</i> -mRFP1_ <i>bcsAB2</i> -mKalama1_ <i>bcsAB3</i>	Dreifach-Insertion von sfGFP an <i>bcsAB1</i> , mRFP1 an <i>bcsAB2</i> und mKalama1 an <i>bcsAB3</i>

3.2.3 Transformation von *K. hansenii* ATCC 53582

Anfangs wurde versucht das in *K. hansenii* ATCC 23769 erfolgreich angewandte Protokoll für triparentale Konjugation auf den Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 zu übertragen. Die Reaktion unter Standardbedingungen wies kein Wachstum von Transkonjuganten nach Selektion auf Plasmid-Integration auf, obwohl auf den nicht-selektiven *mating*-Platten nach Inkubation über Nacht Wachstum beobachtet wurde. Jedoch wies dieser Konjugations-Spot (die Stelle auf der Agaroberfläche, an der die vermengten Donor-, Helfer- und Rezipientenzellen aufgebracht wurden) eine oberflächliche Bildung von Cellulose auf, die die Zellen fest miteinander verband und ein anschließendes Resuspendieren behinderte. Es wird vermutet, dass die freigesetzte Cellulose die Zelloberfläche von *K. hansenii* ATCC 53582 so umschließt, dass die Ausbildung von Pili zwischen Donor-, Helfer- und Rezipienten-Stamm verhindert wird und folglich keine Übertragung des Plasmids möglich war.

Im weiteren Verlauf wurden unterschiedliche Protokolle getestet, deren Ziel es war die freigesetzte Cellulose durch die Zugabe von Cellulase (6 U/mL, aus *T. reesei*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) abzubauen und die Ausbildung der Pili zu erleichtern. In einem Ansatz wurde die Hauptkultur von *K. hansenii* ATCC 53582 nach Erreichen der gewünschten OD_{600} mit Cellulase behandelt, um Cellulose-freie Ausgangsbedingungen während der Konjugation zu gewährleisten. In einem weiteren Versuch wurde dem Medium der *mating*-Platten vor dem Gießen oder dem Konjugationsansatz aus Donor-, Helfer- und Rezipienten-Stamm Cellulase (6 U/mL) zugegeben. Keines der getesteten Protokolle führte zu einer erfolgreichen Transformation von *K. hansenii* ATCC 53582 durch triparentale Konjugation.

Dagegen wurde in der Literatur bereits die erfolgreiche Transformation von Cellulose-produzierenden Essigsäurebakterien mittels Elektroporation beschrieben (Florea et al. 2016a; Jacek et al. 2019; Wong et al. 1990). Daraufhin wurde das in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Protokoll zur Herstellung elektrokompenter Essigsäurebakterien verwendet und durch die Zugabe von Cellulase (6 U/mL, aus *T. reesei*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur Hauptkultur, wie auch während der Regeneration der Zellen erweitert. Die sorgfältige und vollständige Entfernung der

Ergebnisse

Cellulose stellte sich hierbei als essenziell heraus, insbesondere führte ein Verzicht auf die Zugabe von Cellulase während der Regeneration zu keinen positiven Transformanten. Es zeigte sich, dass die Cellulose-freie Zelloberfläche sowohl während der Anlagerung der Plasmid-DNA, als auch während der Porenbildung und der Regeneration der Zellen ein kritischer Parameter zu sein scheint.

Im Laufe dieser Arbeit konnten die in Tabelle 24 aufgelisteten Stämme des Hoch-Cellulose-Produktionsstamms *K. hansenii* ATCC 53582 mittels Elektroporation konstruiert werden. Wie bereits für *K. hansenii* ATCC 23769 beschrieben, so war es auch in *K. hansenii* ATCC 53582 nicht möglich, eine gleichzeitige Deletion von *dgcA* und *dgcB* zu erreichen. Dies weist darauf hin, dass die kombinierte Deletion beider Gene letal ist.

Tabelle 24. Übersicht über die in dieser Arbeit entstandenen markerfreien Deletionsstämme von *K. hansenii* ATCC 53582.

Stamm	Eigenschaft
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB1$	Deletion von <i>bcsAB1</i> (ATCC53582_00602)
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB2$	Deletion von <i>bcsAB2</i> (ATCC53582_02530)
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB3$	Deletion von <i>bcsAB3</i> (ATCC53582_01242)
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$	Alleinige Expression von <i>bcsAB3</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$	Alleinige Expression von <i>bcsAB2</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	Alleinige Expression von <i>bcsAB1</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	Deletion aller CS-Gene, Cel ⁻
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta bcsY$	Deletion der Acetyltransferase (ATCC53582_02528)
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta dgcA$	Deletion von <i>dgcA</i> (ATCC53582_00180)
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 $\Delta dgcB$	Deletion von <i>dgcB</i> (ATCC53582_02359)

3.2.4 Deletion der Zielgene

Die für diese Arbeit gewählte Deletionsmethode basierte auf homologer Rekombination. Hierbei konnte – statistisch gesehen – eine gleichmäßig verteilte Rekombination über beide homologen Flanken erwartet werden. Jedoch stellte sich im Verlauf dieser Arbeit heraus, dass die Plasmid-Integration über eine der beiden homologen Flanken mit höherer Wahrscheinlichkeit erfolgte als über die andere Flanke, wobei die entsprechende Flanke nicht vorhergesagt werden konnte. Hieraus leitete sich ein entscheidender, zusätzlicher Schritt während der Konstruktion neuer Deletions- und Insertionsstämmen ab, indem die Flanke, über die die Rekombination stattgefunden hatte, mittels PCR eindeutig identifiziert wurde. Hierzu wurden in zwei Reaktionen einmal ein vor dem Gen liegender, genomischer vorwärts-Primer und ein auf dem Plasmid außerhalb der Flanken liegender, rückwärts-Primer, bzw. *vice versa* verwendet.

Das entstandene Bandenmuster diente der Identifikation der weniger wahrscheinlichen Flanke für jedes der zu erzeugenden Konstrukte (Abbildung 9).

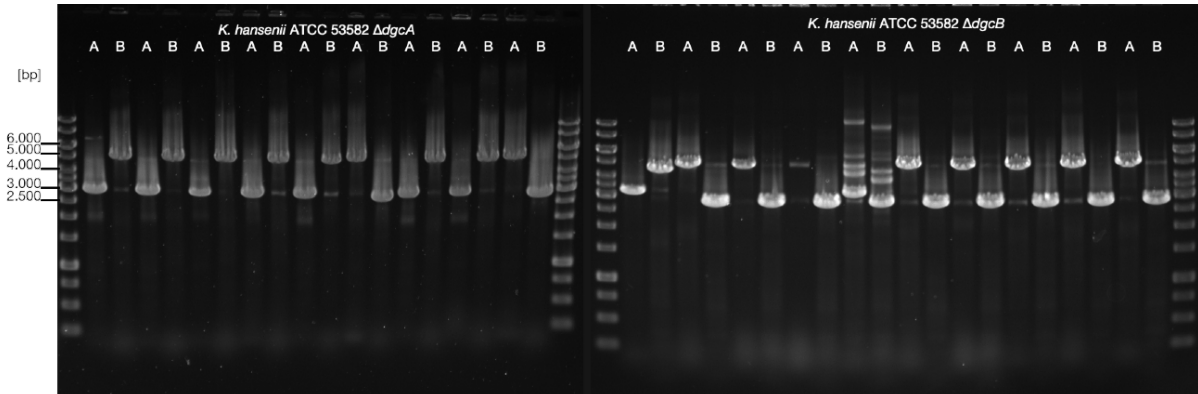


Abbildung 9. Exemplarisches Gel nach Überprüfungs-PCR zum Nachweis der Integration des Deletionsplasmids zur Deletion von *dgcA* bzw. *dgcB* in das Genom von *K. hansenii* ATCC 53582. Primer Mix ‚A‘ enthielt einen genspezifischen vorwärts- und einen plasmidspezifischen rückwärts-Primer, Primer-Mix ‚B‘ war umgekehrt aufgebaut. Als plasmidspezifische Primer wurden stets pKOS6b_check1_for/rev gewählt. Für *dgcA* wurden die genom-spezifischen Primer pdeA1-DGC1-53582_check1_for/rev gewählt. Bei *dgcB* wurden DGC2-53582_check1_for/rev verwendet. Eine erfolgte homologe Rekombination bei *dgcA* über Flanke A ist durch Banden bei 3.011 bp (Primer-Mix A) und 5.088 bp (Primer-Mix B) zu sehen. Eine Rekombination über Flanke B ist durch Banden bei 5.234 bp (Primer-Mix A) und 2.865 bp (Primer-Mix B) gekennzeichnet. Die entsprechenden PCR-Produktgrößen bei *dgcB*: Flanke A: 3.318 bp (Primer-Mix A) und 4.620 bp (Primer-Mix B). Flanke B: 5.037 bp (Primer-Mix A) und 2.901 bp (Primer-Mix B). Aufgetragen wurde die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (ThermoFischer Scientific, Waltham, USA)

Ergebnisse

Die Erfolgsaussichten für die anschließende Gegenselektionsreaktion ließen sich anschließend deutlich steigern, wenn Klone gewählt wurden, bei denen die Integration des Plasmids zuvor über die weniger wahrscheinliche Flanke stattgefunden hatte. Außerdem zeigte sich, dass die deutliche Reduktion des Hefe-Extrakts auf 0,015 % und die Zugabe von 0,5 % Casaminosäuren sich positiv auf die Effizienz der Gegenselektion in *K. hansenii* ausgewirkt hat.

Bei zukünftigen Projekten bieten sich noch weitere Modifikationen des Transformationsprotokolls an, die, in parallel zu dieser Dissertation entstandenen Projekten, vielversprechend wirkten. Zum einen ließ sich der Anteil an *E. coli* Kolonien nach dem ersten Selektionsschritt durch Einstellen des pH-Werts mit Essigsäure anstatt von Salzsäure deutlich reduzieren. Dies folgt aus der fehlenden Essigsäuretoleranz von *E. coli* (Roe et al. 2002). Eine Verifikation dieser aus *Acetobacter* stammenden Beobachtung steht in *Komagataeibacter* jedoch noch aus. Darüber hinaus ließ sich die Effizienz der Gegenselektion weiter steigern, indem statt normalem Agar in den Gegenselektions-Platten ultra-reiner Agar verwendet wurde. Dieser besonders reine Agar ist vollständig frei von anderen Bestandteilen und enthält somit keine Pyrimidine, die mit dem *codBA*-Gegenselektionsmechanismus konkurrieren könnten (Kostner et al. 2013). Diese Modifikation wurde bisher ebenfalls nicht in *Komagataeibacter* getestet.

3.3 Charakterisierung Bakterieller Cellulose

3.3.1 Phänotypische Charakterisierung der Cellulosebiofilme

Die Synthese bakterieller Cellulose durch Essigsäurebakterien wurde bereits von Pasteur (1864) als zentraler Bestandteil der Essigmutter beschrieben. Essigsäurebakterien sind strikt aerobe Organismen und daher auf Lebensräume mit hoher Sauerstoffversorgung angewiesen. Bei einer Schüttelkultur in Drei-Schikane-Kolben erfolgt die optimale Sauerstoffversorgung durch den ständigen Eintrag von frischem Sauerstoff über die große Oberfläche des Kulturmediums. Unter diesen Bedingungen konnte bei *K. hansenii* ATCC 23769 für keinen Stamm die Synthese von Cellulose beobachtet werden. Lediglich in Schüttelkulturen des Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582-Stämmen, die BcsAB1 exprimierten war eine geringe Biofilmbildung in Form von Cellulose-Kugeln zu beobachten. Eine deutlich höhere Ausbeute konnte nach statischer Kultivierung beider Stämme in ruhig stehenden Kolben oder Glaszylindern, also ohne Schütteln der Kulturen, beobachtet werden. Beide Wildtyp-Stämme unterschieden sich dennoch deutlich in der Geschwindigkeit und der Menge an synthetisiertem Biofilm. So reichte für unbewegte, statische Kulturen von *K. hansenii* ATCC 53582 eine Einzelkolonie als Inokulum aus, um Cellulosesynthese in HS-Medium zu bewirken. Erste Hinweise auf die Bildung des Biofilms konnten bereits am nächsten Tag beobachtet werden. Im Gegensatz dazu reichte bei *K. hansenii* ATCC 23769 eine Einzelkolonie als Inokulum nicht aus – selbst bei deutlich verlängerter Inkubationszeit. Dieser Stamm erforderte als Inokulum für die unbewegte Kultur eine Vorkultur in EP_{mod}-Medium, wobei die eingesetzte Zellmenge über die optische Dichte der Vorkultur genau bestimmt werden musste. Ebenfalls dauerte es deutlich länger, bis eine erste Biofilmbildung beobachtet werden konnte, diese fand im Regelfall nach 5–7 Tagen statt.

Der deutliche Unterschied in der Geschwindigkeit, wie auch in der Menge der durch beide Stämme freigesetzten Cellulose wurde besonders deutlich, wenn *K. hansenii* ATCC 23769 unter den Bedingungen kultiviert wurde, die standardmäßig für *K. hansenii* ATCC 53582 verwendet wurden (Abbildung 10). Die Kultur von *K. hansenii* ATCC 23769 wies nach 6 Tagen Kultivierung im ruhig stehenden Kolben kein geschlossenes Pellicel auf, sondern bestand nur aus einzelnen, kleinen Cellulose-

Ergebnisse

Fragmenten, deren Gewicht sich durch Wiegen nicht bestimmen ließ (Abbildung 10 A). Dagegen ist bei *K. hansenii* ATCC 53582 die gesamte Oberfläche mit einem geschlossenen Biofilm bedeckt (Abbildung 10 B). Auch eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 21 Tage führte bei *K. hansenii* ATCC 23769 mit einer Einzelkolonie als Inokulum nicht zur Ausbildung eines geschlossenen Pellikels.

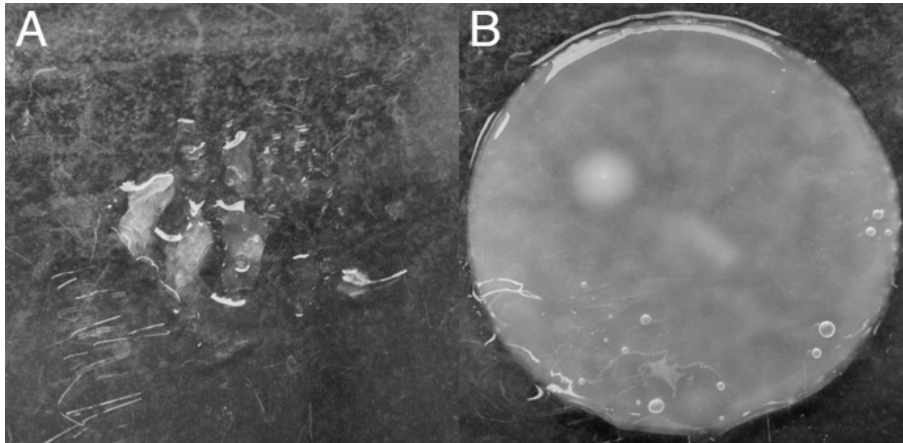


Abbildung 10. Biofilmbildung von *K. hansenii* ATCC 23769 (A) bzw. *K. hansenii* ATCC 53582 (B) nach 6 Tagen statischer Kultur ohne Schütteln in HS-Medium nach Inokulation mit einer Einzelkolonie. Die Kultivierung erfolgte jeweils in mit 250 mL HS-Medium gefüllten Glaszylindern, die mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Stammes inokuliert und für 6 Tage unbewegt bei 25 °C gelagert wurden. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte nach Trocknung bei 50 °C bis zur Gewichtskonstanz: *K. hansenii* ATCC 23769 nicht bestimmbar, *K. hansenii* ATCC 53582 1,62 g/L. Durch Ausweitung der Inkubationsdauer auf 21 Tage konnte die Cellulose-Menge gesteigert werden. Für *K. hansenii* ATCC 23769 betrug die Menge an Cellulose 740 mg/L, dagegen lag die Masse bei *K. hansenii* ATCC 53582 bei 1,8 g/L.

Entsprechend der oben beschriebenen Unterschiede in der Dauer der Cellulosesynthese wurde, neben der Wahl des Inokulums, die Inkubationszeit an die Eigenschaften beider Stämme angepasst. Die Analyse von Biofilmen aus *K. hansenii* ATCC 23769 erfolgte nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultur (Abbildung 11), dagegen bei *K. hansenii* ATCC 53582 bereits nach 6 Tagen. Lediglich zur verbesserten Darstellung des Kontrasts der nahezu durchsichtigen Cellulose gegenüber der nicht getrübbten Mediumsflüssigkeit, wurde das Foto nach 14 Tagen aufgenommen (Abbildung 12).

3.3.1.1 Biofilmbildung in *K. hansenii* ATCC 23769

Die *bcsAB*-Deletionsmutanten von *K. hansenii* ATCC 23769 wurden nach unbewegter, statischer Kultivierung untersucht. Dazu wurden 250 mL HS-Medium in weiten Glaszylindern steril mit über Nacht Vorkulturen beimpft, auf eine OD_{600} von 0,03 eingestellt und für 21 Tage bei 25 °C stehend inkubiert. Der Vergleich des Wildtyps (Expression von *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3*) (Abbildung 11 A; B) mit den erzeugten Einzelexpressionsstämmen zeigte deutlich, dass ein Biofilm nur in Anwesenheit der Haupt-Cellulosesynthase gebildet wurde. Die alleinige Expression von *bcsAB1* reichte aus, um einen phänotypisch mit dem Wildtyp vergleichbaren, strukturell stabilen Cellulosebiofilm zu erzeugen (Abbildung 11 C). Dagegen unterschied sich der Biofilm bei alleiniger Expression von *bcsAB2* (Abbildung 11 D) bzw. *bcsAB3* (Abbildung 11 E) deutlich. Beide Stämme waren nicht in der Lage ein die Mediumsoberfläche vollständig bedeckendes Pellikel zu bilden, sondern sie erzeugten lediglich ein schwach ausgebildetes und fragmentiertes Pellikel. Dieser Eindruck wurde durch die Betrachtung des Phänotyps nach Einzeldelation der CS-Gene bestätigt. Hier zeigte sich, dass die Deletion von *bcsAB1* zum Fehlen der Biofilmbildung führte und stattdessen nur (EPS-) Fragmente auf der Mediumsoberfläche zu sehen waren (Abbildung 11 G). Vergleichbar fragmentiert stellte sich die Pellikelbildung dar, wenn *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* gleichzeitig deletiert wurden (Abbildung 11 F). Dagegen führte die einzelne Deletion von *bcsAB2* bzw. von *bcsAB3* im Vergleich zum Wildtyp zu phänotypisch kaum detektierbaren Unterschieden (Abbildung 11 H; I).

Die Aktivierung der Cellulosesynthasen erfolgt über die Bindung von cyclischem di-GMP an BcsA. Daher wurden die bereits beschriebenen CS-Deletionsstämmen von *K. hansenii* ATCC 23769 um Stämme ergänzt, in denen die beteiligten DGCs (*dgcA* und *dgcB*) ebenfalls markerfrei deletiert wurden. Da der sekundäre Botenstoff cyclisches di-GMP an die N-terminale PilZ-Domäne von BcsA bindet und so die Bildung von Cellulose-Fasern katalysiert (siehe Abbildung 2), sollte folglich der Beitrag beider DGCs zur Biofilmbildung geklärt werden. Hier erfolgte die Kultivierung der Proben unter den bereits zuvor beschriebenen Bedingungen. Nach Deletion von *dgcA* konnte jedoch im Vergleich zum Wildtyp keine sichtbare Veränderung des Cellulosebiofilms beobachtet werden (Abbildung 11 J). Jedoch führte die Deletion von

Ergebnisse

dgcB zu einer deutlich reduzierten Biofilmbildung und der Freisetzung einer geringen Menge an EPS- oder Biofilmfragmenten (Abbildung 11 K).

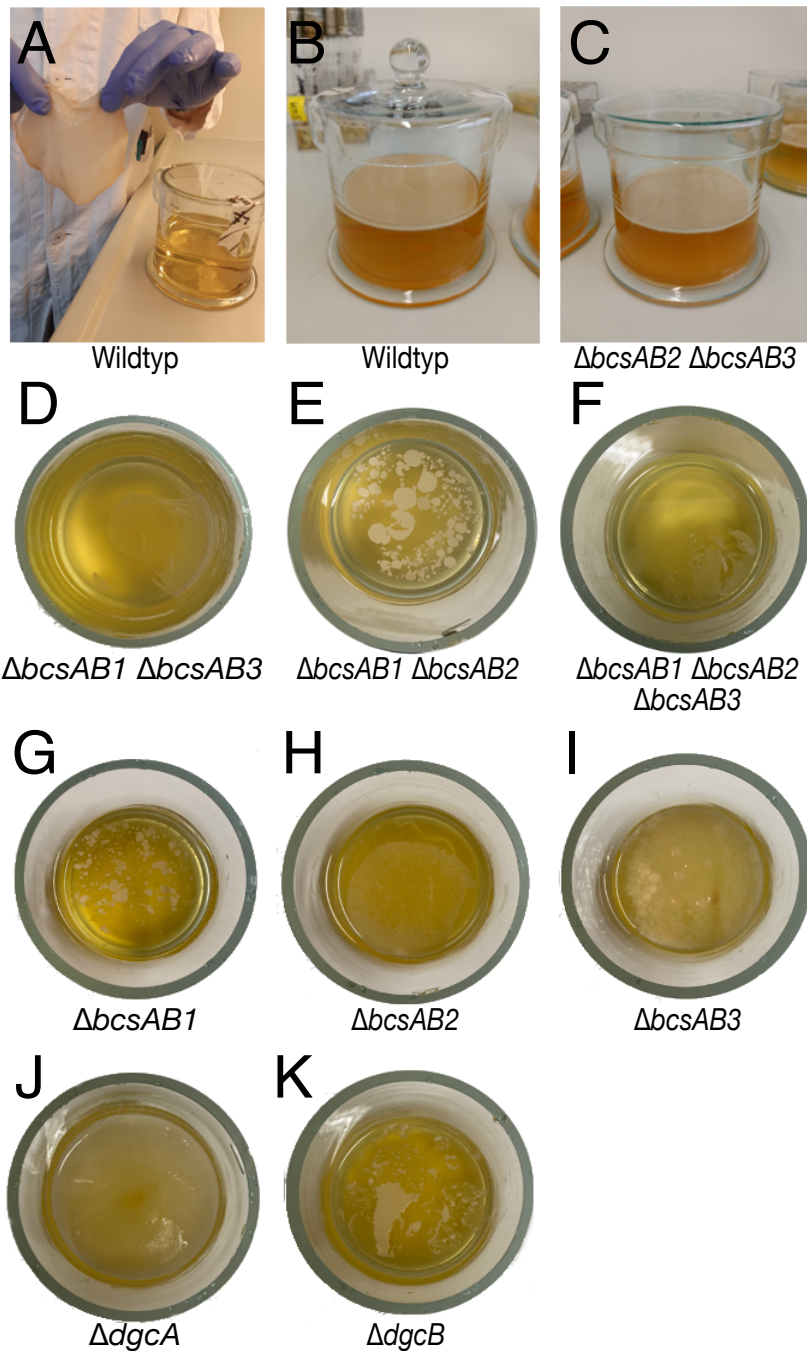


Abbildung 11. Biofilmbildung in *K. hansenii* ATCC 23769 und Deletionsmutanten davon nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultur in HS-Medium bei 25 °C. A, B: *K. hansenii* ATCC 23769 Wildtyp; C: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$; D: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$; E: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$; F: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$; G: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1$; H: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2$; I: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB3$; J: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta dgcA$; K: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta dgcB$. (Abbildung nach Bimmer et al. (2022))

3.3.1.2 Cellulosebiofilm in *K. hansenii* ATCC 53582

Der Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 war in der Lage auch bei Kultivierung in einer Schüttelkultur Cellulose zu bilden. Da aber unter diesen Bedingungen nur Biofilm-Kugeln entstanden, so wie es bereits zuvor von Hu and Catchmark (2010) beschrieben wurde, wurde für eine zuverlässige Quantifizierung der Cellulose ebenfalls die Kultivierung in einer statischen Kultur in weiten Glaszylindern ohne Bewegung der Kulturen während der Bebrütung verwendet. So wurden, bis auf das Inokulum, dieselben Bedingungen, wie für *K. hansenii* ATCC 23769 verwendet. Der Phänotyp der Biofilmbildung wurde in *K. hansenii* ATCC 53582 nach Kultivierung für 14 Tage bei 25 °C in HS-Medium dokumentiert. Hier ließen sich im Vergleich zu *K. hansenii* ATCC 23769 einerseits Übereinstimmungen und andererseits deutliche Unterschiede feststellen (Abbildung 12). Zum einen bestätigte sich auch in diesem Stamm der essentielle Beitrag von *bcsAB1* zur Bildung eines Cellulosebiofilms. Bei Expression von *bcsAB1* wurde, unabhängig vom Vorhandensein der weiteren Cellulosesynthasen, ein dicker, fester und stabiler Biofilm von hoher Elastizität gebildet, welches die gesamte Mediumsoberfläche bedeckte. Dagegen konnte nach Deletion von *bcsAB1* in *K. hansenii* ATCC 53582 keine Bildung eines Biofilms beobachtet werden (Abbildung 12 B). Andererseits wurden, im Gegensatz zu *K. hansenii* ATCC 23769, aber auch keine Biofilmfragmente gebildet (vgl. Abbildung 11 G). Die alleinige Deletion der zusätzlichen CS-Gene *bcsAB2* und *bcsAB3* zeigte keine phänotypisch erkennbare Auswirkung auf die Biofilmbildung in *K. hansenii* ATCC 53582 (Abbildung 12 C; D) – der zu beobachtende Phänotyp entsprach dem des Wildtyps (Abbildung 12 A). Dagegen zeigte sich nach alleiniger Synthese von *BcsAB2* ($\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$) bzw. *BcsAB3* ($\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$) ein Biofilm-freier Phänotyp (Abbildung 12 E; F), dieser entsprach dem Phänotyp des Stamms, in welchem alle drei Gene für Cellulosesynthasen deletiert wurden (Abbildung 12 H).

Vergleichbar verhielten sich ATCC 53582 und ATCC 23769 jedoch in Bezug auf die Ergebnisse nach Deletion der beiden DGCs, *dgcA* und *dgcB*. Hier führte in Stamm ATCC 53582 wie in Stamm ATCC 23769 schon nur die Deletion von *dgcB* zu einem Phänotyp ohne Biofilmbildung (Abbildung 12 J), die Deletion von *dgcA* zeigte keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 12 I). Wobei anzumerken

Ergebnisse

ist, dass *K. hansenii* ATCC 53582 in Abwesenheit von *dgcB*, anders als *K. hansenii* ATCC 23769, keine an der Oberfläche sichtbaren Fragmente bildete.

Die Deletion der im *bcsAB2*-Gencluster kodierten Acetyltransferase, *bcsY*, wirkte sich phänotypisch nicht auf das Erscheinungsbild der gebildeten Cellulose aus. Der Stamm war weiterhin in der Lage einen deutlich sichtbaren Biofilm zu bilden, welcher optisch dem des Wildtyps bzw. dem Zustand nach Deletion von *bcsAB2* entsprach.

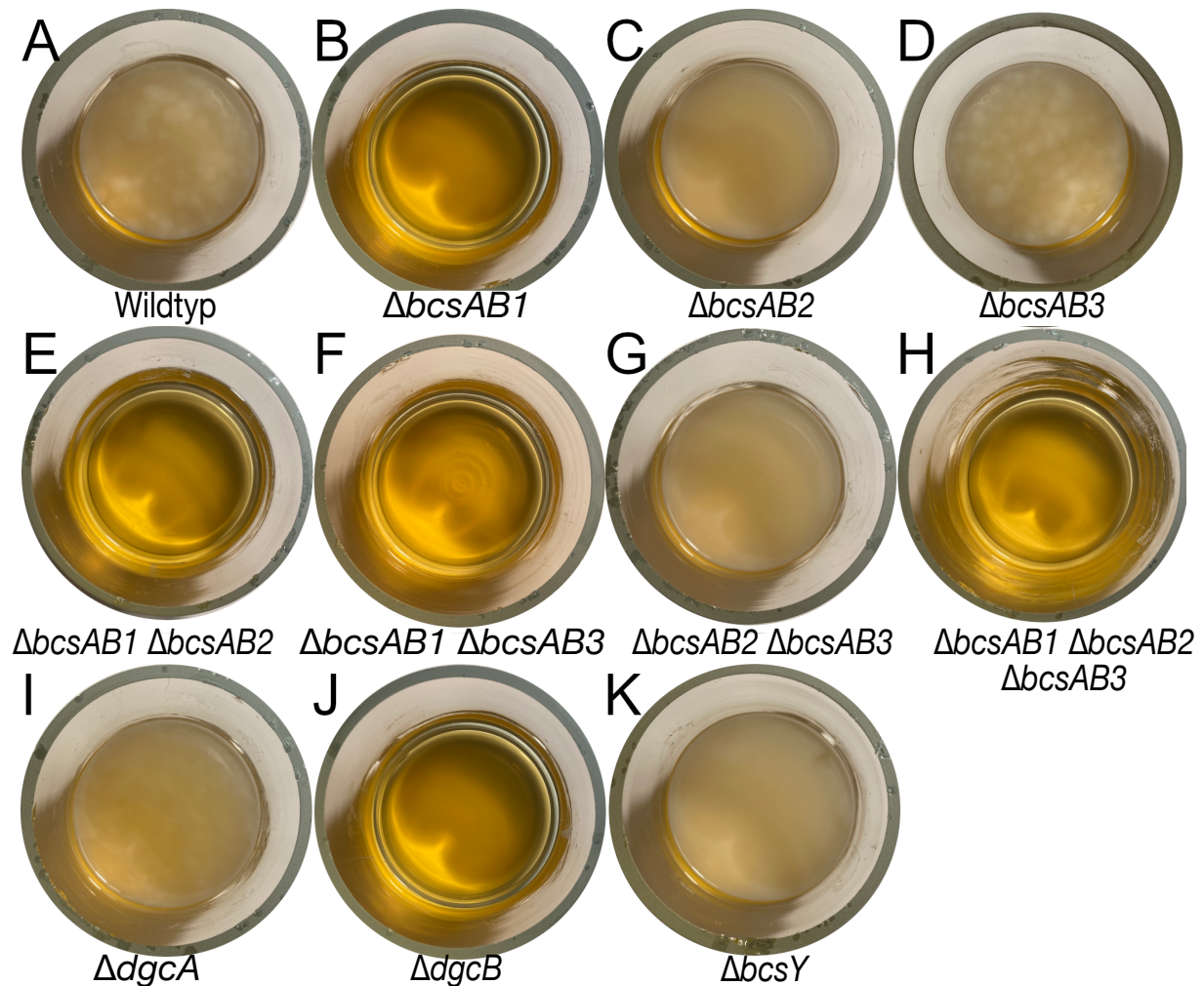


Abbildung 12. Biofilmbildung in *K. hansenii* ATCC 53582 und Deletionsmutanten davon nach 14 Tagen stehender, statischer Kultur in HS-Medium bei 25 °C. A: *K. hansenii* ATCC 53582; B: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB1$; C: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB2$; D: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB3$; E: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$; F: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$; G: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$; H: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$; I: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta dgcA$; J: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta dgcB$; K: *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsY$. (Abbildung aus Bimmer et al. (2023))

3.3.2 Weiterentwicklung eines kolorimetrischen Assays zur Quantifizierung von Cellulose in *K. hansenii* ATCC 23769

Die zuvor beschriebenen phänotypischen Beobachtungen beschränken sich auf eine generelle Aussage zur nach den Deletionen verbliebenen Fähigkeit Cellulose bilden zu können. Besonders interessant war es jedoch, den Beitrag der einzelnen Cellulosesynthesen zu quantifizieren. Die von den unterschiedlichen *K. hansenii* ATCC 23769 Stämmen freigesetzte Menge an Cellulose war nach Kultivierung für 21 Tagen in den zur Verfügung stehenden Gefäßen so gering, dass sich die Masse nicht gravimetrisch bestimmen ließ. In der dieser Doktorarbeit vorangegangenen Masterarbeit wurde bereits ein Protokoll zur kolorimetrisch Cellulose-Quantifizierung entwickelt (Bimmer 2017), welches nun verbessert und auf seine Zuverlässigkeit hin geprüft wurde.

Die Cellulose-Quantifizierung mittels Anthron-Assay (2.4.1.1) basiert auf einem mehrstufigen Prozess. Dazu wurde Biofilm, der nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultur gebildet wurde, zunächst aus den Kulturgefäßen so in neue Zentrifugationsröhrchen überführt, dass abgesunkene Zelltrümmer im Kulturgefäß zurückblieben. Dies war wichtig, da sonst die Wahrscheinlichkeit für Messungenauigkeiten im anschließenden Prozess durch Zelltrümmer stieg. Im Biofilm eingeschlossene Zellen sowie Mediumsbestandteile wurden mittels Inkubation in 1 M NaOH entfernt, anschließend wurde das Material in Ammoniumacetat neutralisiert. Dieses Protokoll ersetzte aufgrund der harschen Bedingungen das zuvor in der Masterarbeit beschriebene Protokoll, welches die Verwendung des Updegraff Reagenz (Essigsäure : Salpetersäure : H₂O – 8:1:2; v:v:v) (Updegraff 1969) und Waschschrte in Aceton vorsah. Die nachfolgend im REM gemachten Beobachtungen zur Auswirkung von Aceton auf die Netzwerkstruktur (siehe Abschnitt 3.4.1) scheinen sich hier bereits anzudeuten. Die getrockneten Celluloseproben wurden in der Saeman-Hydrolyse (Saeman 1945) durch Zugabe von 72%iger Schwefelsäure zunächst zum Schwellen gebracht, einem für die nachfolgende Hydrolyse kritischer Schritt. Denn nur bei sorgfältiger und mehrmaliger Mischung der Probe in Schwefelsäure ließen sich die Celluloseproben während der anschließenden Hydrolyse, bei 100°C in reduzierter Säurekonzentration, vollständig lösen. Im

Ergebnisse

anschließenden Anthron-Assay war es wichtig stets eine Glucose-Standardkurve (0–20 µg in 100 µL ddH₂O) auf jeder Mikrotiterplatte mitzuführen. Die Celluloseproben wurden in Triplikaten zu je 10 µL (+90 µL ddH₂O) gemessen. Die dem Anthron-Assay zugrunde liegende Farbreaktion ist temperaturabhängig und fand während der anschließenden Inkubation bei 80 °C vollständig statt. Um ein vorzeitiges und ungleichmäßiges Ablufen der Reaktion zu vermeiden, wurde die Platte zum einen auf Eis vorbereitet, zum anderen wurde die 0,2 %ige Lösung von Anthron (w/v) in 96 % Schwefelsäure aufgrund der Wärmeentwicklung auf Eis abgekühlt.

In Abbildung 13 ist beispielhaft eine Platte des Anthron-Assays zur Bestimmung des Cellulosegehalts nach Abschluss der Farbreaktion gezeigt.

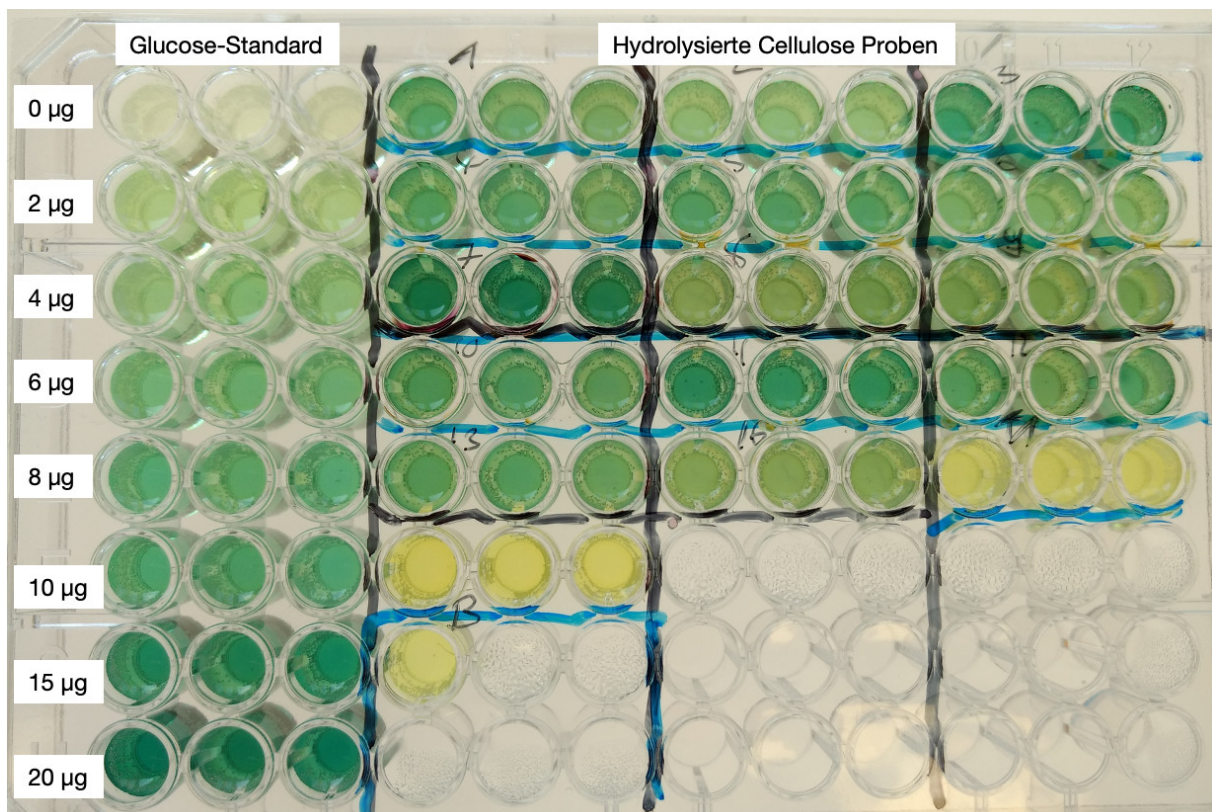


Abbildung 13. Anthron-Assay-Reaktionen mit hydrolysierten Celluloseproben von *K. hansenii* ATCC 23769 Kulturen. Photometrische Messung der Absorption des bei dem Assay (siehe Material und Methoden) entstehende bläulich-grünen Komplexes bei 620 nm erlaubt die Quantifizierung der aus einer Celluloseprobe durch Hydrolyse freigesetzten Glukose. Gelbliche Wells zeigen die Abwesenheit von Glukose an.

3.3.3 Quantifizierung der Cellulosebildung in *K. hansenii* ATCC 23769

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Anthron-Assay ließ sich auf alle in *K. hansenii* ATCC 23769 generierten Deletionsstämme anwenden und sich zur Bestimmung der freigesetzten Menge an Cellulose verwenden. Die oben bereits beschriebenen phänotypischen Eindrücke (siehe 3.3.1.1) bezüglich der unterschiedlichen Fähigkeiten zur Cellulosebildung konnte durch die Quantifizierung eindeutig bestätigt werden und ist in Abbildung 14 dargestellt. Wie oben beschrieben sank die Cellulosemenge nach Deletion von *bcsAB1* signifikant. Dabei war es unerheblich, ob *bcsAB1* alleine oder in Kombination mit einer/mehreren der zusätzlichen CS-Gene fehlte. Der Wildtyp von *K. hansenii* ATCC 23769 war in der Lage, nach 21 Tagen und unter für ATCC 23769 optimierten Bedingungen, 1,60 g/L Cellulose zu bilden, wohingegen nach Deletion von *bcsAB1* nur noch zwischen 0,18 und 0,40 g/L erreicht wurden. Dagegen bildete der Stamm *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$, der nur *bcsAB1* enthält, vergleichbar viel Cellulose wie der Wildtyp (1,57 g/L). Ebenfalls waren keine Unterschiede auszumachen, ob alle drei Cellulosesynthasen deletiert wurden oder *bcsAB1* alleine oder in Kombination mit einer der anderen beiden CS.

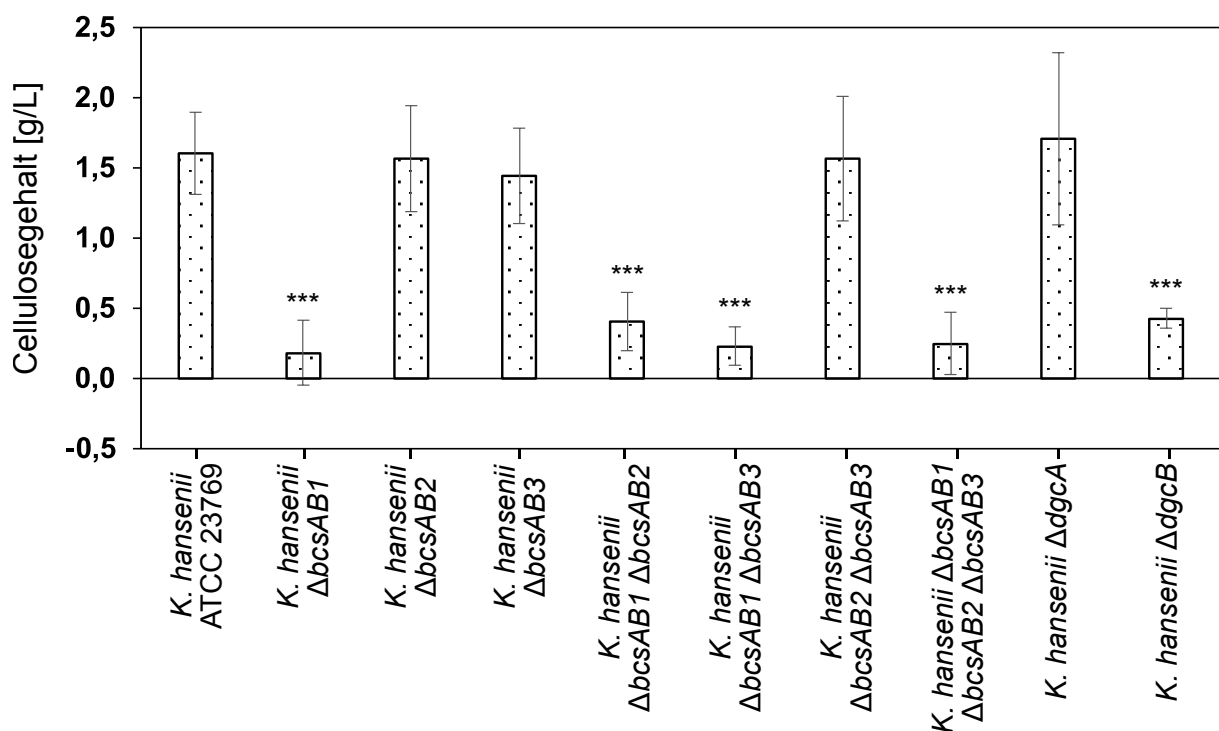


Abbildung 14. Quantifizierung der Celluloseproduktion in *K. hansenii* ATCC 23769 und Deletionsmutanten davon mittels kolorimetrischem Anthron-Assay. [MW±SD, n=7≤21] (nach Bimmer et al. (2022))

Ergebnisse

Ebenfalls ließ sich der zuvor beschriebene Eindruck des Beitrags der beiden DGCs quantitativ erfassen. Die Deletion von *dgcA* wirkte sich weder steigernd noch reduzierend auf die freigesetzte Cellulosemenge aus. Dagegen ließ sich, wie bereits zuvor beschrieben, der deutliche Rückgang nach Deletion von *dgcB* auch quantitativ bestätigen.

3.3.4 Gravimetrische Quantifizierung der von *K. hansenii* ATCC 53582 gebildeten Cellulose

Die große Menge an gebildeter Cellulose in *K. hansenii* ATCC 53582 erleichterte das Quantifizieren der Cellulose, insbesondere auch durch den Umstand, dass keine EPS-Fragmente an der Oberfläche des Mediums, bei alleiniger Expression von *bcsAB2* oder *bcsAB3*, bzw. nach Deletion von *bcsAB1*, gebildet wurden. Die statischen Kulturen wurden mit einer Einzelkolonie in 250 mL HS-Medium inokuliert und für 6 Tage ohne Bewegung bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden verbleibende Mediumsbestandteile und Zelltrümmer durch intensives Waschen in ddH₂O entfernt und bei 50 °C zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dies führte dazu, dass die Masse des Biofilms im trockenen Zustand unter Zuhilfenahme einer Feinwaage bestimmt werden konnte. Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen mit Kunststoff-Petrischalen, die die Messungen verfälschte, musste das Wiegen in geschlossenen Glas-Petrischalen erfolgen.

Die Quantifizierung der Cellulose in *K. hansenii* ATCC 53582 ergab für den Wildtyp eine durchschnittliche Masse von 118,5 mg/L (Abbildung 15). Die Deletion der zusätzlichen CS-Gene *bcsAB2* und *bcsAB3* wirkte sich nicht signifikant auf die Menge an freigesetzter Cellulose aus. Ebenfalls war bei alleiniger Expression von *bcsAB1* mit 106,1 mg/L keine deutliche Reduktion der Cellulosesynthese festzustellen. Auch die alleinige Deletion der im zweiten Gen Locus der CS-Gene liegenden Acetyltransferase wirkte sich im Vergleich zum Wildtyp nicht auf die Menge an gebildeter Cellulose aus. Dagegen war in *K. hansenii* ATCC 53582, anders als zuvor für *K. hansenii* ATCC 23769 beschrieben, eine signifikante Reduktion der Cellulosemenge nach Deletion von *dgcA* im Vergleich zum Wildtyp festzustellen (52,4 mg/L). Dieser phänotypische Effekt ließ sich bereits während der Handhabung des Biofilmmaterials in Vorbereitung auf die Messung beobachten. Auch wenn zuvor während der Kultur kein deutlicher Unterschied der Biofilme festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 12 I), war außerhalb des Kulturmediums zu beobachten, dass der gewaschene Biofilm von *K. hansenii* $\Delta dgcA$ deutlich mehr Wasser und deutlich weniger Cellulosefasern enthielt, was in einem besonders dünnen Biofilm nach der Trocknung deutlich wurde.

Ergebnisse

Die Ergebnisse für die absolute Quantifizierung der von *K. hansenii* ATCC 53582 gebildeten Cellulose lagen deutlich unterhalb der zuvor für *K. hansenii* ATCC 23769 bestimmten Werte. Als mögliche Erklärung für diese Unterschiede ist erneut darauf hinzuweisen, dass für beide Stämme primär die Kultivierungsmethode gewählt wurde, mit der sich schnellstmöglich eine qualitative Aussage treffen ließ. Dadurch kam es zu einem deutlichen Unterschied im Oberfläche- zu Medium-Verhältnis beider Kulturen. Dieses Verhältnis der Oberfläche des Kulturgefäßes zum Kulturvolumen lag bei *K. hansenii* ATCC 23769 in 15 mL TPP-Bioreaktoren bei 5,4, dagegen bei Kultivierung von ATCC 53582 in 10 cm Wattegläsern bei 0,6. Zusammen mit der auf etwa ein Drittel der Zeit reduzierte Inkubationsdauer von ATCC 53582, lässt sich so der deutliche Unterschied in den absoluten Werten erklären.

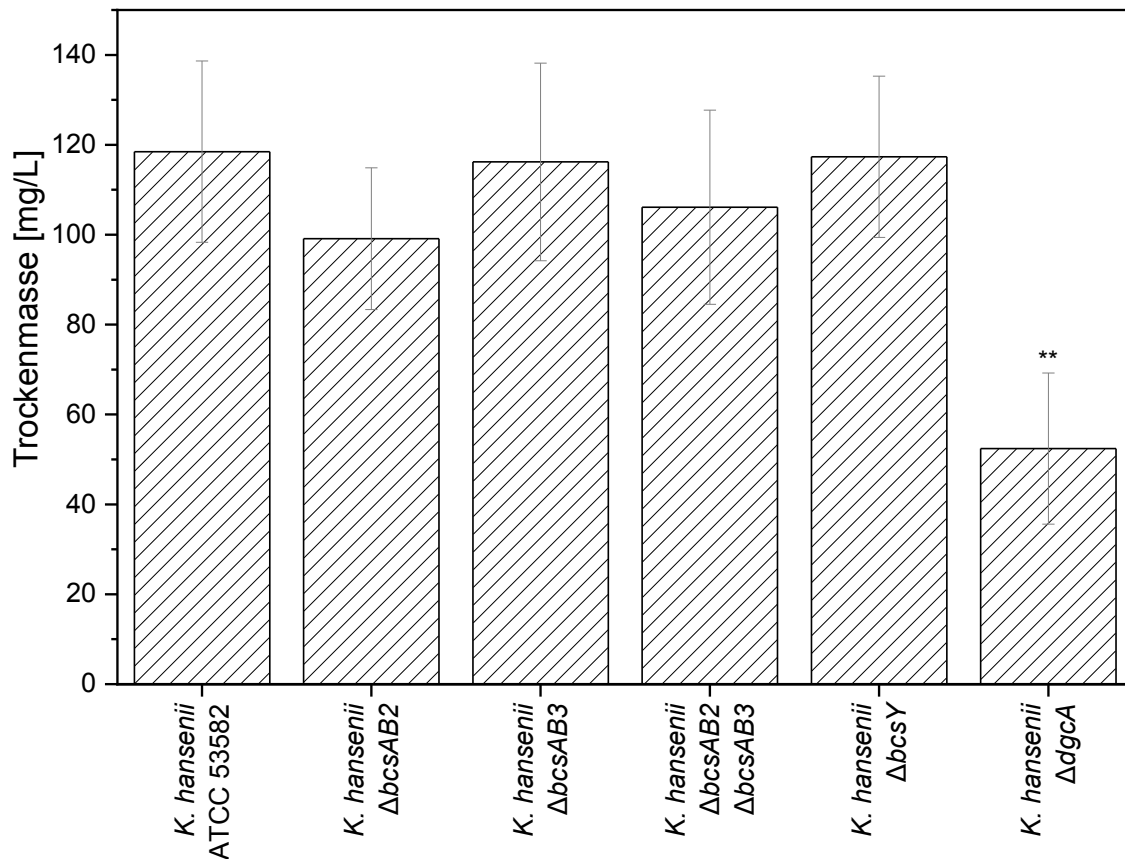


Abbildung 15. Trockenmasse des Cellulosebiofilms in *K. hansenii* ATCC 53582 nach 6 Tagen Kultivierung ohne Schütteln bei 25 °C in HS-Medium. Die Biofilme wurden fünfmal in ddH₂O gewaschen, um Mediumsbestandteile und Zelltrümmer zu entfernen und anschließend bis zur Gewichtskonstanz bei 50 °C getrocknet. [MW \pm SD; n = 3 \leq 5]

3.3.5 Vergleich unterschiedlicher Färbemethoden zum Nachweis von BC

Neben den bereits genannten Methoden zur Quantifizierung der Cellulose wurde eine Methode gesucht, mit der sich Cellulose-produzierende Zellen direkt aus Kultur nachweisen lassen, um die Charakterisierung neuer Mutanten-Stämme zu erleichtern und eine schnellere Einordnung in Cel⁺ bzw. Cel⁻ zu ermöglichen.

Es kamen mehrere Methoden zum Einsatz, die auf den Nachweis von Cellulose abzielten. Zum einen wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Calcofluor White* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in *K. hansenii* ATCC 23769 getestet. Dieser Farbstoff lagert sich in den Cellulosefasern ein und wurde bereits in der Literatur erfolgreich zum Nachweis von Cellulose verwendet (Haigler et al. 1980; Hughes and McCully 1975). Im *K. hansenii* ATCC 23769 Wildtyp konnte der Nachweis für Cellulose erfolgreich erbracht werden, jedoch lieferte die Analyse von *K. hansenii* $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$ und *K. hansenii* $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$ keine reproduzierbaren und vom Vorhandensein von Cellulose abhängige Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Verwendung des Farbstoffs abgesehen und die Fluoreszenzfärbung mit *Calcofluor White* nicht auf *K. hansenii* ATCC 53582 übertragen. Neben dem Anfärben einer Zellsuspension wurde außerdem versucht einerseits Kolonien auf Agarplatten mit *Calcofluor White* anzufärben, andererseits wurde *Calcofluor White* auch direkt bei Erstellung der Agarplatten zugegeben. Beide Ansätze lieferten jedoch ebenfalls keine erfolgreichen Ergebnisse.

Tusche-„Färbung“ ist eine klassische Nachweismethode für aus EPS bestehende Kapseln wie z. B. aus Alginat bei *Azotobacter*. Die Tuschepartikel werden durch die Kapsel abgehalten und können folglich nicht in die Zelle eindringen, wodurch die Kapsel als heller Hof um die Zelle sichtbar wird. Dieser Färbeversuch wurde mit *K. hansenii* ATCC 23769 und ATCC 53582 sowie mit *G. oxydans* 621H als Cel⁻-Kontrolle durchgeführt. In der Kontrolle ließen sich die Zellen eindeutig vom Tusche-Hintergrund abgrenzen, jedoch war dies bei beiden *Komagataeibacter* Stämmen nicht möglich. Hier bildete die Tusche unabhängig vom Genotyp des untersuchten Stamms Trapezförmige Bereiche um die Zellen, wodurch eine Zuordnung zu Cel⁺ bzw. Cel⁻ nicht möglich war. Mögliche zukünftige Ansätze für Färbenachweise können dem umfassenden Review von Hubbe et al. (2019) entnommen werden.

3.3.6 Charakterisierung physikochemischer Eigenschaften

3.3.6.1 Identifikation bakterieller Cellulose mittels FTIR

Die in beiden *K. hansenii* Stämmen nach unbewegter, statischer Kultivierung gebildete Cellulose wurde zunächst in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biogene Polymere (TUM Campus Straubing, Deutschland) mittels FTIR (Fourier-Transform Infrarotspektrometrie) analysiert, um die chemische Identität der Probe zu klären. Das aufgezeichnete Spektrogramm wurde dazu mit einer Referenzprobe reiner mikrokristalliner Cellulose, die im selben Gerät gemessen wurde, verglichen. Dazu wurden die Biofilmprouben, wie oben beschrieben, intensiv mit ddH₂O gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Sämtliche Biofilme, die sowohl aus dem Wildtyp, als auch aus den generierten Deletionsstämmen stammten, konnten eindeutig als kristalline Cellulose vom Typ I identifiziert werden. Sie wiesen die zur Charakterisierung entscheidenden Wellenzahlen (cm⁻¹) auf. Diese lagen bei $\nu_{C-O-C} = 896$, $\nu_{C-O} = 1.160$; 1.027 , $\delta_{CH} = 1.315$ und $\delta_{CH_2} = 1.428$. Außerdem wurden Rückstände von Wasser in der Probe, wie auch in der Umgebungsluft bei 1.651 und mögliches CO₂ aus der Atemluft bei $\nu_{CH} = 2.893$ bzw. $\nu_{OH} = 3.329$ miterfasst. Die auf der y-Achse dargestellte Intensität der Peaks ist ein probenspezifischer Parameter und wurde beispielsweise durch die Probendicke beeinflusst. Er gibt jedoch keine Auskunft über die Qualität der Probe und der Messung. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Spektren von *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582, die Spektren der weiteren Stämme befinden sich im Anhang (Abbildung S 1; Abbildung S 2). Keines der aufgenommenen Spektren wies Peaks bei zusätzlichen Wellenzahlen auf, die Hinweisen für die Anwesenheit von acetylierter Cellulose zugerechnet werden konnte.

Ergebnisse

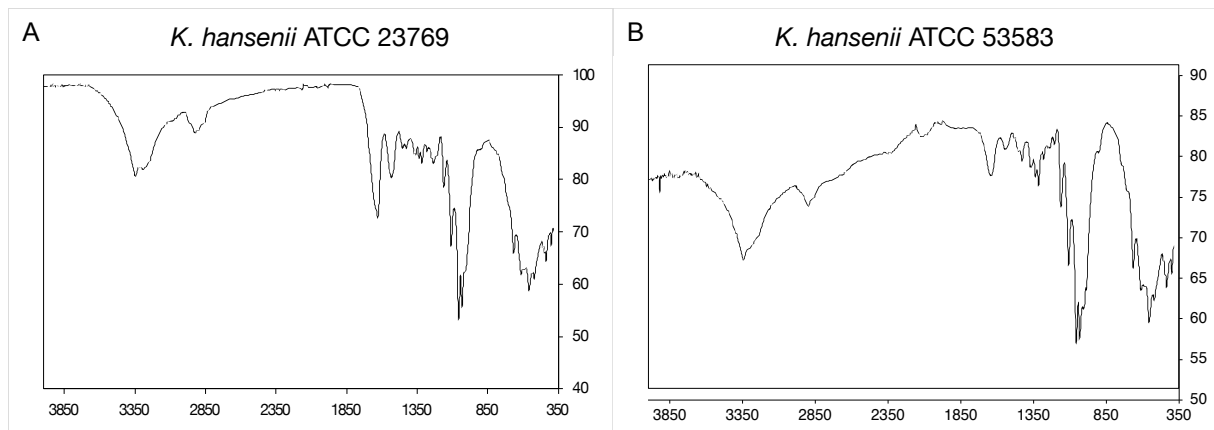


Abbildung 16. FTIR-Spektrogramm zur Identifikation der Cellulose in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582. Die zur Identifikation entscheidenden Wellenzahlen (cm^{-1}) liegen bei $\nu_{\text{C-O-C}} = 896,0$, $\nu_{\text{C-O}} = 1.160,1$; $1.027,7$, $\delta_{\text{CH}} = 1.315,1$ und $\delta_{\text{CH}_2} = 1.428,7$. Außerdem werden Rückstände an Wasser in der Probe, wie auch in der Umgebungsluft bei $1.651,6$ und mögliches CO_2 aus der Atemluft bei $\nu_{\text{CH}} = 2.893,1$ bzw. $\nu_{\text{OH}} = 3329,4$ miterfasst.

3.3.6.2 Kristallinität bakterieller Cellulose

Bakterielle Cellulose ist durch die hohe Kristallinität der gebildeten Cellulosefasern besonders gut für unterschiedliche biotechnologische und biomedizinische Anwendungen geeignet. Die Messungen zur Bestimmung der Kristallinität wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biogene Polymere (TUM Campus Straubing, Deutschland) durchgeführt. Die Messung erfolgte an denselben Proben, die zuvor bereits zur FTIR-Messung verwendet wurden, um hier mögliche Abweichungen ausschließen zu können. Die Kristallinität der Proben wurde aus der aufgezeichneten Röntgendiffraktion berechnet. Die Berechnung der Kristallinität kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Grundsätzlich liefern Bestimmungen nach der *Rietveld-Refinement*-Methode meist exaktere Werte (Rietveld 1969), da jedoch in der Literatur zur Bestimmung der Kristallinität bakterieller Cellulose zumeist auf die *Segal-Peak-Height*-Methode zurückgegriffen wird, wurde diese Auswertungsmethode in dieser Arbeit verwendet (Segal et al. 1959). Zur Unterscheidung beider Methoden ist anzumerken, dass aufgrund der Berechnungsmethode bei *Segal-Peak-Height* der kristalline Anteil der Probe tendenziell etwas zu hoch eingeschätzt wird, da der Beitrag amorpher Bereiche etwas unterschätzt wird (Ahvenainen et al. 2016; Park et al. 2010).

Ergebnisse

Die Quantifizierung der Cellulose in *K. hansenii* ATCC 23769 mittels Anthron-Assay ergab kaum einen Unterschied zwischen *K. hansenii* ATCC 23769 und dem Stamm, der einzig *bcsAB1* exprimiert. Auch wirkte sich die gleichzeitige markerfreie Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* nicht auf die gemessene Kristallinität der Cellulose aus (Tabelle 25). Die Kristallinität der scheinbar nicht-fibrillären EPS (nfEPS), die bei alleiniger Expression von *bcsAB2* bzw. von *bcsAB3* in ATCC 23769 gebildet wurden, konnte aufgrund der geringen Menge nicht mit dem zur Verfügung stehenden Gerät gemessen werden.

Wie bereits oben beschrieben, wies die Quantifizierung der Biofilme von *K. hansenii* ATCC 53582 lediglich nach Deletion von *dgcA* einen deutlichen Rückgang der Masse auf, die übrigen Deletionen zeigten nur eine geringe Schwankung (3.3.4). Eine mögliche Auswirkung auf die Kristallinität wurde mittels XRD-Messung bestimmt. Zunächst fiel im direkten Vergleich von ATCC 23769 und ATCC 53582 auf, dass die Kristallinität der von *K. hansenii* ATCC 53582 gebildeten Cellulose deutlich höher war (77,20 %), als die der von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten (60,76 %). Anders als bei *K. hansenii* ATCC 23769 beschrieben, wirkten sich die Deletionen in *K. hansenii* ATCC 53582 teilweise signifikant auf die Kristallinität der Cellulose aus (Tabelle 25). Nach alleiniger Deletion von *bcsAB3* (74,88 %), sowie nach zeitgleicher Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* (74,55 %), bzw. nach Deletion von *bcsY* (74,72 %) reduzierte sich die Kristallinität deutlich gegenüber der des Wildtyps. Die aufgezeichneten Diffraktogramme bestätigten ebenso, wie bereits zuvor das FTIR-Spektrum, die von beiden *K. hansenii*-Stämmen gebildete Cellulose als Cellulose I.

Tabelle 25. Kristallinitäts-Indices (CI) bakterieller Cellulose in *K. hansenii* Stämmen. Die Berechnung des CI erfolgte nach der *Segal-Peak-Height*-Methode [MW \pm SD; n = 5 \leq 11]. Nach Bimmer et al. (2023).

	<i>K. hansenii</i> ATCC 23769 [%]	<i>K. hansenii</i> ATCC 53582 [%]
Wildtyp	60,76 \pm 20,88	77,20 \pm 2,85
$\Delta bcsAB2$	---	76,25 \pm 3,09
$\Delta bcsAB3$	---	74,88 \pm 1,91 **
$\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	63,43 \pm 13,73	74,55 \pm 2,14 *
$\Delta bcsY$	---	74,72 \pm 2,93 *
$\Delta dgcA$	---	75,39 \pm 3,41

3.3.6.3 Bestimmung des Elastizitätsmoduls

Bakterielle Cellulose zeichnet sich insbesondere durch eine hohe mechanische Reißfestigkeit aus und bietet daher zahlreiche biotechnologische und biomedizinische Einsatzmöglichkeiten. Die Bestimmung des Elastizitätsmoduls liefert einen zuverlässigen und weit verbreiteten Parameter zur rheologischen Charakterisierung verschiedenster Materialien. Aufgrund des hohen Wassergehalts und der unterschiedlichen Haptik zwischen feuchtem und trockenem Biofilm, wurde entschieden die mechanische Stabilität des feuchten Biofilms zu ermitteln. Der Einfluss des Wassergehalts der Proben wurde durch die Zentrifugation der Proben vor der Messung reduziert. Für die Messung stand ein *Kieffer Dough & Gluten Extensibility Rig* (Dunnewind et al. 2003) am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) zur Verfügung. Zur zuverlässigen Fixierung der feuchten Proben wurde eine Halterung erstellt, die das Herausziehen der Probe während der Messung verhinderte.

Die Bestimmung der Zugfestigkeit der von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten Cellulose stellte sich als schwierig heraus. Durch Bereiche mit geringeren und größeren Dicken innerhalb eines Biofilms konnten keine reproduzierbaren und gleichmäßigen technische Replikate erzeugt werden. Dies führte folglich zu stark schwankenden Ergebnissen bei der Messung eines biologischen Replikats. Die Messergebnisse sind in Abbildung 17 zu sehen und lassen aufgrund der hohen Standardabweichung keinen eindeutigen Schluss zu. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz für eine erhöhte Zugfestigkeit nach Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3*, folglich bei alleiniger Expression von *bcsAB1*.

Ergebnisse

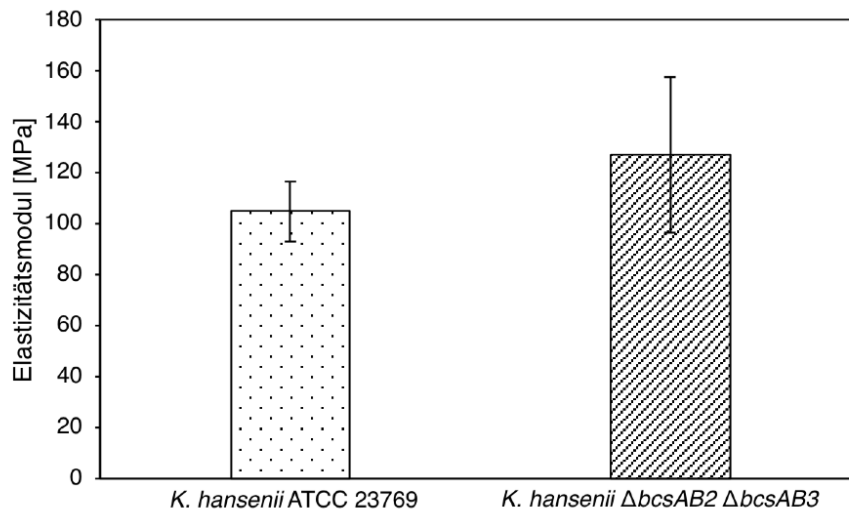


Abbildung 17. Elastizitätsmodul gemessen in *K. hansenii* ATCC 23769 nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultur [MW \pm SD; n = 7 \leq 9].

Im Gegensatz dazu konnten bei unbewegter, statischer Kultivierung von *K. hansenii* ATCC 53582 sehr gleichmäßig geformte Biofilme erzeugt werden. Nach 6 Tagen Kultivierung in HS-Medium und intensivem Waschen in ddH₂O erfolgte die Messung der Proben nach Zentrifugation der Proben, um nicht gebundenes Wasser zu entfernen. Aus den gleichmäßig gewachsenen Bereichen konnten je Biofilm mindestens drei Proben mittels einer Schablone ausgeschnitten und gemessen werden. Da in der Berechnung des Elastizitätsmoduls die Querschnittsfläche der Probe berücksichtigt wurde, wurden pro Biofilm mehrere Proben zur Bestimmung der Dicke zurückgehalten.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Elastizitätsmoduls sind in Tabelle 26 dargestellt. Der Wildtyp des Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 wies mit 145,2 MPa ein deutlich höheres Elastizitätsmodul auf, als es zuvor für *K. hansenii* ATCC 23769 gemessen worden war. Bemerkenswerterweise führten die Deletionen innerhalb des zweiten CS-Genclusters zu einer signifikanten Erhöhung der Zugfestigkeit (*K. hansenii* $\Delta bcsAB2$: 284,2 MPa; *K. hansenii* $\Delta bcsY$: 235,1 MPa). Vergleichbar verhält es sich mit der mechanischen Festigkeit der Cellulose, die bei gleichzeitiger Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* (alleinige Expression von *bcsAB1*) gebildet wurde. Da hier das gemessene Elastizitätsmodul (272,5 MPa) nahe dem Wert bei alleiniger Deletion von *bcsAB2* liegt und die alleinige Deletion von *bcsAB3* (119,9 MPa) sogar zu einer

Ergebnisse

Reduktion der Zugfestigkeit führte, wird vermutet, dass die Zunahme nach Doppel-Deletion einzig auf den fehlenden Beitrag von BcsAB2 zurückzuführen ist. Dies verdeutlicht den Trend, der bereits für *K. hansenii* ATCC 23769 zu erahnen war, aber dort aufgrund des hohen Fehlerbalkens nicht eindeutig erkennbar war.

Tabelle 26. Berechnung des Elastizitätsmoduls in *K. hansenii* ATCC 53582. [MW \pm SD; n = 3 \leq 5].
Modifiziert nach Bimmer et al. (2023).

	Elastizitätsmodul [MPa] \pm SD
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	145,2 \pm 12,4
<i>K. hansenii</i> Δ bcsAB2	284,1 \pm 36,7 ***
<i>K. hansenii</i> Δ bcsAB3	119,9 \pm 13,8 *
<i>K. hansenii</i> Δ bcsAB2 Δ bcsAB3	272,5 \pm 14,0 ***
<i>K. hansenii</i> Δ bcsY	235,1 \pm 0,8 ***
<i>K. hansenii</i> Δ dgcA	230,2 \pm 67,1 *

Die Deletion von *dgcA* wirkte sich reduzierend auf die gebildete Masse an Cellulose aus, nicht aber auf deren Kristallinität. In Bezug auf die gemessene Festigkeit ist jedoch eine Zunahme des Elastizitätsmoduls (239,2 MPa) im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten.

3.3.6.4 Bestimmung der Wasserbindefähigkeit der von *K. hansenii* ATCC 53582 gebildeten Cellulose

Die Fähigkeit große Mengen an Wasser zu binden macht bakterielle Cellulose vor allem für biomedizinische, pharmazeutische und kosmetische Anwendungen interessant. Als letzter physikochemischer Parameter wurde daher die Wasserbindefähigkeit (WAR) der vom Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 nach 6 Tagen unbewegter Kultur in HS-Medium gebildeten Cellulose bestimmt. Hierzu wurde das Feuchtgewicht des wie üblich vorbereiteten Biofilms ins Verhältnis zur Trockenmasse gesetzt und berechnet, wie hoch der Wasseranteil bezogen auf die Feuchtmasse war. Aufgrund der bereits zuvor beschriebenen großen Schwankungen der von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten Cellulosemenge wurde auf eine Bestimmung des Wassergehalts für diesen Stamm verzichtet.

Wie für bakterielle Cellulose charakteristisch, so wies auch die von *K. hansenii* ATCC 53582 gebildete Cellulose bei allen charakterisierten Stämmen einen sehr hohen Wassergehalt (>99 %) auf (Tabelle 27). Eine klare Reduktion des Wassergehalts auf 99,34 %, gegenüber den des Wildtyps (99,5 %) wurde nach Doppel-Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* (nur *bcsAB1* war vorhanden), sowie nach Deletion von *bcsY* ermittelt (Reduktion auf 99,4 %). Dagegen führte die Deletion von *dgcA* zu einem signifikant erhöhten Wassergehalt von 99,7 %. Aufgrund dieser Beobachtung deutete sich ein Einfluss der zusätzlichen CS-Gene auf die Feuchtigkeitsregulation der Biofilme an, welche möglicherweise auch durch die DGCs beeinflusst werden kann.

Tabelle 27. Wassergehalt der von *K. hansenii* ATCC 53582 gebildeten Cellulosebiofilme. [MW \pm SD; n = 3] Modifiziert nach Bimmer et al. (2023).

	Wassergehalt [%] \pm SD
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	99,5 \pm 0,1
<i>K. hansenii</i> Δ <i>bcsAB2</i>	99,6 \pm 0,1
<i>K. hansenii</i> Δ <i>bcsAB3</i>	99,5 \pm 0,1
<i>K. hansenii</i> Δ <i>bcsAB2</i> Δ <i>bcsAB3</i>	99,3 \pm 0,0 **
<i>K. hansenii</i> Δ <i>bcsY</i>	99,4 \pm 0,0
<i>K. hansenii</i> Δ <i>dgcA</i>	99,7 \pm 0,0 **

3.4 Räumliche Auflösung des Cellulose Netzwerks

3.4.1 Elektronenmikroskopische Darstellung zur Charakterisierung des Cellulose Netzwerks

3.4.1.1 Etablierung eines Prozederes zur Probenvorbereitung

Die bereits beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass die einzelnen CS-Gene einen unterschiedlichen Beitrag im Phänotyp des Biofilms leisten. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob sich dies auch in einem unterschiedlichen Beitrag der einzelnen Cellulosesynthesen zum Gerüst des Netzwerks widerspiegelt. Dazu wurde eine detaillierte Analyse der räumlichen Struktur des Cellulose-Netzwerks in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) durchgeführt. Dazu wurde, in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Pflanzliche Entwicklungsbiologie (LMU München, Martinsried, Deutschland), ein Prozedere zur optimalen Darstellung des Biofilms im REM erarbeitet. Biofilme von *K. hansenii* ATCC 23769 wurden nach 21 Tagen stehender Kultivierung in HS-Medium prozessiert, bei Biofilmen von *K. hansenii* ATCC 53582 erfolgte die Probenvorbereitung bereits nach 6 Tagen Kultivierung.

Zunächst wurde das von Prof. Gerhard Wanner (LMU München, Martinsried, Deutschland) im persönlichen Gespräch ausgetauschte allgemeine Standardprotokoll getestet. Die Probenvorbereitung erfolgte durch eine kurzzeitige Dehydratisierung der Proben in 100 % Aceton (5 – 10 min) und unmittelbar nachfolgender Trocknung bei Raumtemperatur (Druckluftspray). Hierdurch war es möglich, die unterschiedlichen Elemente des Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 gut aufzulösen (Abbildung 18 A). Jedoch zeigte sich insbesondere bei Betrachtung von *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$, dass die sichtbaren Zellen ihre dreidimensionale Form verloren haben (Abbildung 18 B), andere Zellen wiesen deutlich erkennbare Löcher in der Zellmembran auf (Abbildung 18 C). Beides war in erster Linie auf eine unzureichende Dehydratisierung der Proben zurückzuführen.

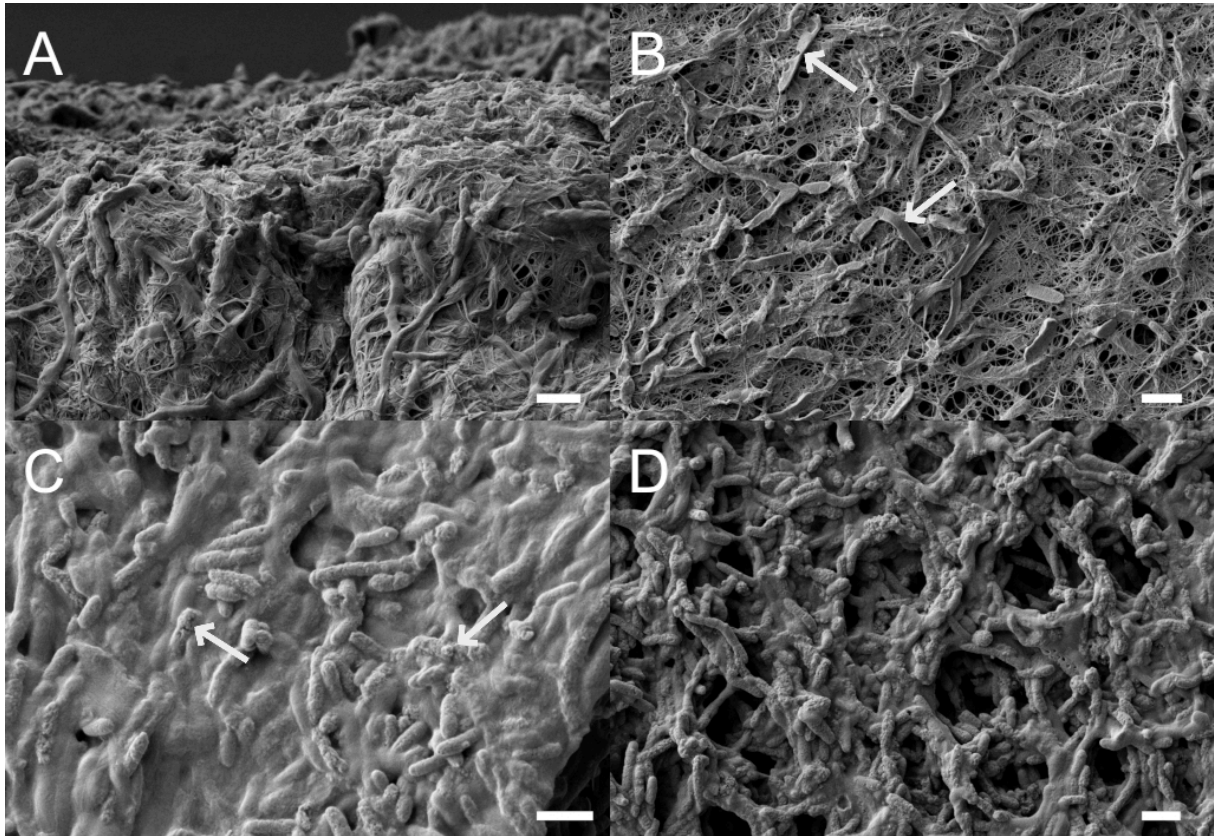


Abbildung 18. REM Aufnahmen des Cellulose Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 und der erzeugten Einzel-Expressionstämmen. Die Proben wurden mit einer verkürzten Version des Standardprotokolls prozessiert, dieses nutzte eine kurzzeitige Dehydratisierung in 100 % Aceton und anschließendem kurzzeitigem Trocknen. Die Pfeile verweisen auf die durch unzureichende Dehydratisierung entstandenen flachen Zellen bzw. Löcher in den Zellen. A: *K. hansenii* ATCC 23769, B: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$, C: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$, D: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 2 μm . (Bimmer et al. (2022))

Zur Verbesserung der Auflösung des Biofilms wie auch der eingeschlossenen Zellen wurde das Protokoll weiter optimiert. Dazu wurde der Biofilm zunächst über Nacht in 2,5 % Glutardialdehyd (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert bzw. in 1xPBS gelagert, anschließend in einer aufsteigenden Aceton-Reihe entwässert, in 100 % Aceton lagernd den REM-Experten übergeben und anschließend mittels Kritisch-Punkt-Trocknung getrocknet. Dieses Prozedere verbesserte einerseits die Darstellung der Zellen, jedoch waren die zuvor beobachteten, nicht-fibrillären Bestandteile des Netzwerks von *K. hansenii* ATCC 23769 nicht mehr zu sehen, lediglich die von BcsAB1 gebildeten kristallinen Cellulosefasern waren gut zu erkennen (Abbildung 19). Außerdem schien sich der Durchmesser der einzelnen Cellulosefasern im Vergleich

Ergebnisse

zum vorherigen Ansatz (Abbildung 18), deutlich reduziert zu haben. Aus technischen Gründen ließ sich jedoch der Durchmesser der Cellulosefasern nicht bestimmen.

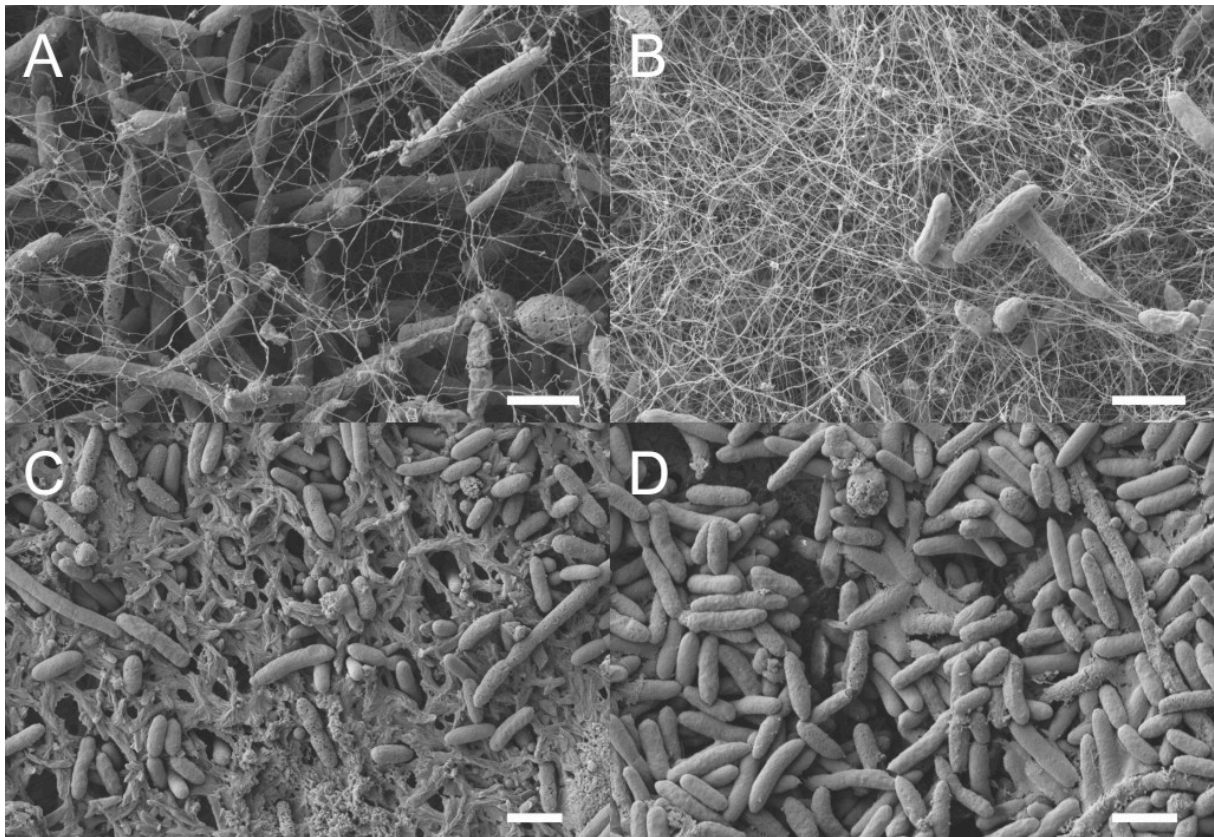


Abbildung 19. Biofilme nach Dehydratisierung in Aceton und Fixierung in Glutaraldehyd. A: *K. hansenii* ATCC 23769, B: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$, C: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$, D: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 2 μm . (Bimmer et al. 2022)

Aufgrund dieser Beobachtungen schlossen sich weitere Optimierungsversuche an. Zunächst wurde die Dehydratisierung in Aceton durch eine aufsteigende EtOH-Reihe mit anschließender Lagerung in 100 % EtOH ersetzt. Ethanol ist als Lösungsmittel einerseits ebenso gut geeignet, um bakterielle Zellen zu dehydratisieren, andererseits aber nicht als Lösungsmittel für Celluloseacetat bekannt, wodurch eine schonendere Behandlung der Biofilmproben möglich war. Die Wirkung beider Lösungsmittel auf Celluloseacetat wurde im ersten Schritt an einer kommerziell erworbenen Filtermembran aus Celluloseacetat verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass diese nach 10 min in Aceton vollständig aufgelöst wurde. Dagegen war die Membran nach derselben Inkubationsdauer in Ethanol noch vollständig intakt und wies keinen Unterschied zur Kontrolle in Wasser (ddH_2O) auf (Abbildung 20). Gemäß diesen

Ergebnisse

Beobachtungen wird vermutet, dass es sich – in Verbindung mit dem Wissen um eine im zweiten CS-Gencluster kodierte Acetyltransferase – bei dem beschriebenen nfEPS um Celluloseacetat handeln könnte.



Abbildung 20. Analyse der Wirkung von Aceton auf Membranen aus Celluloseacetat (CA).

Die Fixierung von Proben über Nacht in 2,5 % Glutardialdehyd ein weit verbreitetes Prozedere der Elektronenmikroskopie, um Zellen optimal darzustellen. In diesem Fall zeigten die so fixierten Proben bakterieller Cellulose von *K. hansenii* ATCC 23769, nach anschließender Entwässerung in EtOH, dass die Zellen gut aufgelöst wurden (Abbildung 21).

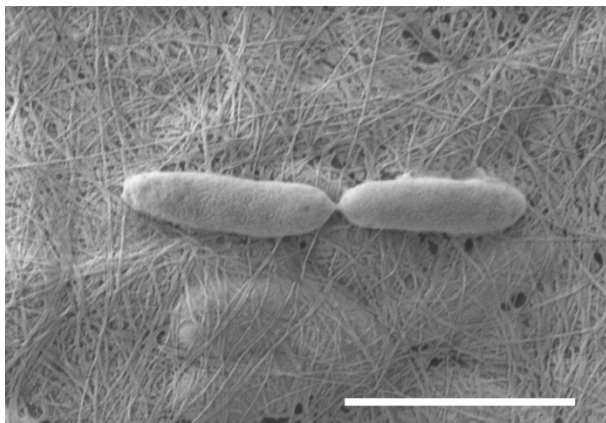


Abbildung 21. Fixierung des Biofilms über Nacht in 2,5 % Glutardialdehyd verbessert die Darstellung der eingeschlossenen Zellen, wirkt sich jedoch negativ auf die Darstellung des Cellulosenetzwerks aus. Gezeigt am Beispiel von *K. hansenii* ATCC 23769.

Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass – anders als bei den Zellen – die elektronenmikroskopische Auflösung der Cellulose-Netzwerke selbst nach Lagerung in 1xPBS über Nacht besser war, als nach Fixierung in 2,5 % Glutardialdehyd. Die

Fixierung dagegen lieferte eine optimale Auflösung der im Biofilm eingeschlossenen Zellen. Auf diese verbesserte Darstellung der Zellen wurde zu Gunsten der verbesserten Darstellung der Cellulose-Netzwerkstrukturen, verzichtet. Das Protokoll, welches die Lagerung der Proben über Nacht in 1xPBS und eine Entwässerung in EtOH vorsah, erzielte für Biofilme von *K. hansenii* ATCC 23769 sowie von *K. hansenii* ATCC 53582 die besten Ergebnisse.

3.4.1.2 Elektronenmikroskopische Darstellung des Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 im verbesserten Präparationsprotokoll

Entsprechend der Expression der entsprechenden CS-Gene waren in *K. hansenii* ATCC 23769 charakteristische Phänotypen der Biofilme auf der Mediumsoberfläche zu beobachten. Diese ließen sich bereits nach der Kultivierung den einzelnen CS-Genen exakt zuordnen und waren auch in der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Wildtyps nach Lagerung in 1x PBS und Dehydratisierung in EtOH gut zu erkennen. Die Aufnahmen deuteten darauf hin, dass einzig die Synthese von BcsAB1 dafür verantwortlich war, Cellulose-Fibrillen zu bilden (Abbildung 22 A). Diese kristallinen Cellulosefasern lagerten sich zu einem verwinkelten Netzwerk zusammen, in welchem die synthetisierenden Zellen eingeschlossen wurden. Einzelne Fasern aus unterschiedlichen Ebenen des Netzwerks waren offenbar an Knotenpunkten miteinander verbunden, was vermutlich in der hohen mechanischen Stabilität des Biofilms resultierte. Ergänzend dazu schien es sich bei BcsAB2 und BcsAB3 um Cellulosesynthasen mit komplementierenden Funktionen zu handeln. Die elektronenmikroskopische Aufnahme des Wildtyp-Biofilms (Abbildung 22 A) zeigte weniger Zwischenräume zwischen den einzelnen Fasern, als es der Biofilm nach alleiniger Synthese von BcsAB1 (Abbildung 22 B) tat. Dies wies auf die Bildung weiterer, als nfEPS-Strukturen angenommene Elemente durch *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* hin. Für das nfEPS, welches von BcsAB2 synthetisiert wurde, ließ sich die Anordnung dieses Polymers auf den Bereich zwischen den Zellen bestimmen, erkennbar dadurch, dass bei alleiniger Synthese von BcsAB2 die Zellen in eine Art schleimige Substanz eingebettet und so miteinander verbunden wurden (Abbildung 22 C). Dies resultierte im Wildtyp in einem Cellulose-Netzwerk, das keine großen Zwischenräume

Ergebnisse

zwischen den einzelnen Fasern besaß. Ein weiteres, angenommenes nfEPS, welches von BcsAB3 gebildet wurde, ist dagegen in vergleichsweise geringer Menge vorhanden (Abbildung 22 D). In *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$ beschränkt sich das Vorhandensein auf die unmittelbare Umgebung der Zellen und bedeckten unmittelbar die Zelloberfläche und weniger die Zwischenräume zwischen den Zellen, anders als es bei BcsAB2 der Fall war. Auch wenn der Anteil dieser zusätzlichen nfEPS im Vergleich zu den Cellulosefasern, die von BcsAB1 gebildet wurden, relativ gering war, so können diese zusätzlichen Strukturen dennoch einen wichtigen Beitrag zur Gesamtstruktur des Biofilms leisten und sich auf die Eigenschaften des Biofilms auswirken.

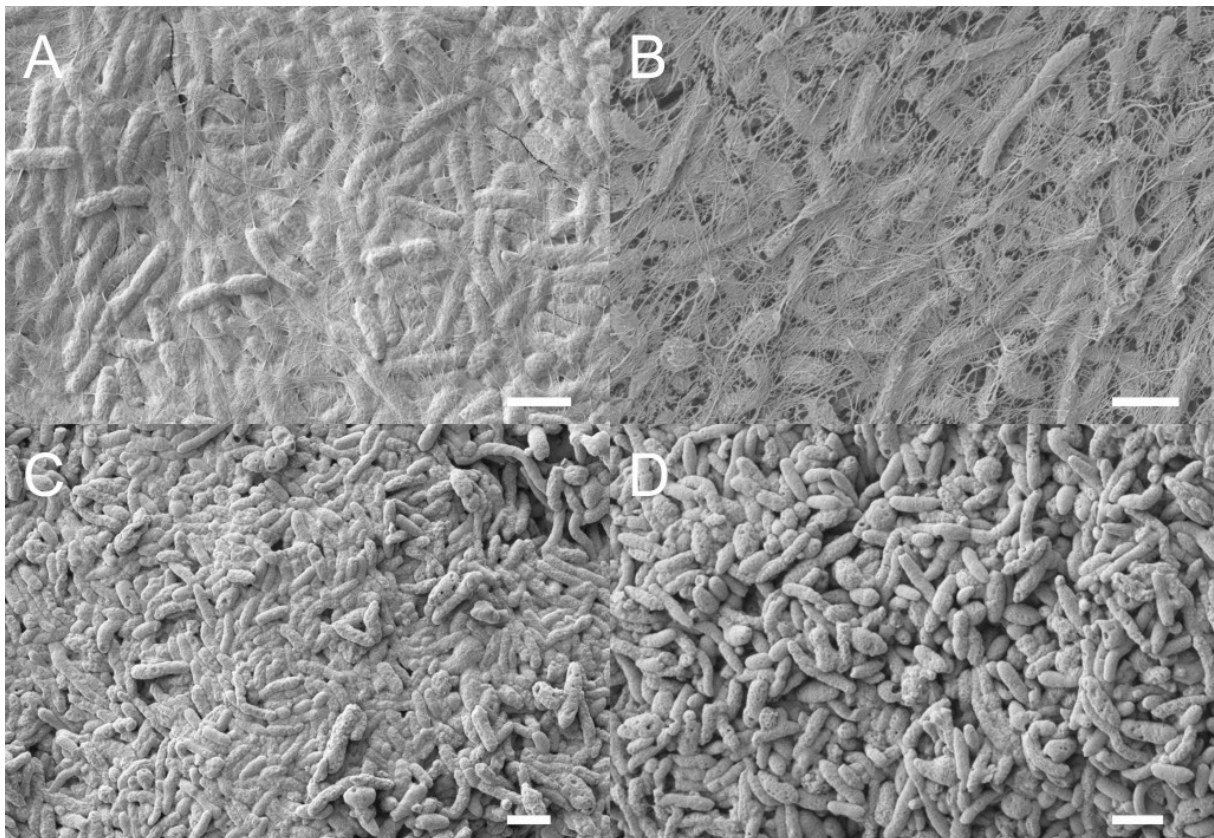


Abbildung 22. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Biofilmpflanzen aus *K. hansenii* ATCC 23769. A: *K. hansenii* ATCC 23769, B: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$, C: *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$, D: *K. hansenii* $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 2 μm . (Bimmer et al. (2022))

Eine REM-Aufnahme eines vertikalen Querschnitts des Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 wurde ebenso erstellt (Abbildung S 4). Diese Aufnahme lässt keine

unterschiedliche Verteilung der Zellen zwischen der mediumszugewandten und der luftzugewandten Seite erkennen.

3.4.1.3 Elektronenmikroskopische Darstellung des Biofilms von *K. hansenii* ATCC 53582 im verbesserten Präparationsprotokoll

Anders als *K. hansenii* ATCC 23769 zeichnete sich *K. hansenii* ATCC 53582 durch die schnellere Synthese einer großen Menge an Cellulose aus. Da bei alleiniger Synthese von BcsAB2 bzw. BcsAB3 nach Kultivierung ohne Schütteln keine EPS an der Oberfläche des Kulturmediums zu erkennen waren, bot die Rasterelektronenmikroskopie eine weitere Möglichkeit, um detailliert in die Mikrostruktur des Cellulosebiofilms zu blicken.

Das vom Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 gebildete Netzwerk aus Cellulosefibrillen wies einerseits mehrere eng gepackte Schichten auf, andererseits aber auch Lücken innerhalb des Netzwerks (Abbildung 23 A). Es waren, anders als zuvor für *K. hansenii* ATCC 23769 beschrieben, keine Hinweise auf von BcsAB2 bzw. BcsAB3 gebildete nfEPS erkennbar. Ferner war auffällig, dass im Vergleich zum Biofilm, der von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildet wurde, nach identischer Probenvorbereitung weniger Zellen zu erkennen waren. Die Synthese der kristallinen Cellulosefasern ließ sich bei Stamm ATCC 53582 ebenfalls eindeutig der Expression von *bcsAB1* zuordnen, wie es die Aufnahme nach Doppel-Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* zeigen konnte (Abbildung 23 D). Dieser Stamm bildete einen Cellulosebiofilm, welcher aus einem Netzwerk verknüpfter Cellulosefasern bestand. Andererseits schienen diese Fasern im Vergleich zum Wildtyp ein kompakteres Netzwerk mit enger zusammengelagerten Fasern zu bilden.

Wie bereits beschrieben führte die alleinige Synthese von BcsAB2 bzw. von BcsAB3 zu keinem Biofilm-bildenden Phänotyp. Daher konnte der Beitrag dieser zusätzlichen Cellulosesynthasen nur in Stämmen analysiert werden, die gleichzeitig die Haupt-Cellulosesynthase BcsAB1 exprimierten. Die REM-Aufnahmen dieser Stämme wiesen keine erkennbaren Substanzen auf, die als von BcsAB2 oder BcsAB3 gebildete EPS identifiziert werden konnten (Abbildung 23 B; C). Dennoch zeigten die mikroskopischen Aufnahmen Unterschiede im Zusammenlagern der einzelnen

Ergebnisse

Cellulosefasern in Abhängigkeit von den exprimierten CS-Genen. Sowohl nach Deletion von *bcsAB2* (Expression von *bcsAB1* und *bcsAB3*), als auch nach Deletion von *bcsAB3* (Expression von *bcsAB1* und *bcsAB2*) lagerten sich die einzelnen Fasern innerhalb des Cellulose-Netzwerks enger aneinander an und ließen sich im Vergleich zum Wildtyp weniger klar voneinander abgrenzen. Entsprechend dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass die zusätzlichen CS-Gene an der Bildung weiterer EPS beteiligt sind oder anderweitig die Modifikation der von BcsAB1 gebildeten Cellulose-Fasern induzieren. Dieser Beitrag wird an der veränderten Zusammenlagerung der Cellulosefasern sichtbar, ist aber aufgrund der gegenüber *K. hansenii* ATCC 23769 vermutlich reduzierten Menge nicht als separate Substanz zu erkennen, sondern wird möglicherweise von den kristallinen Cellulosefasern absorbiert.

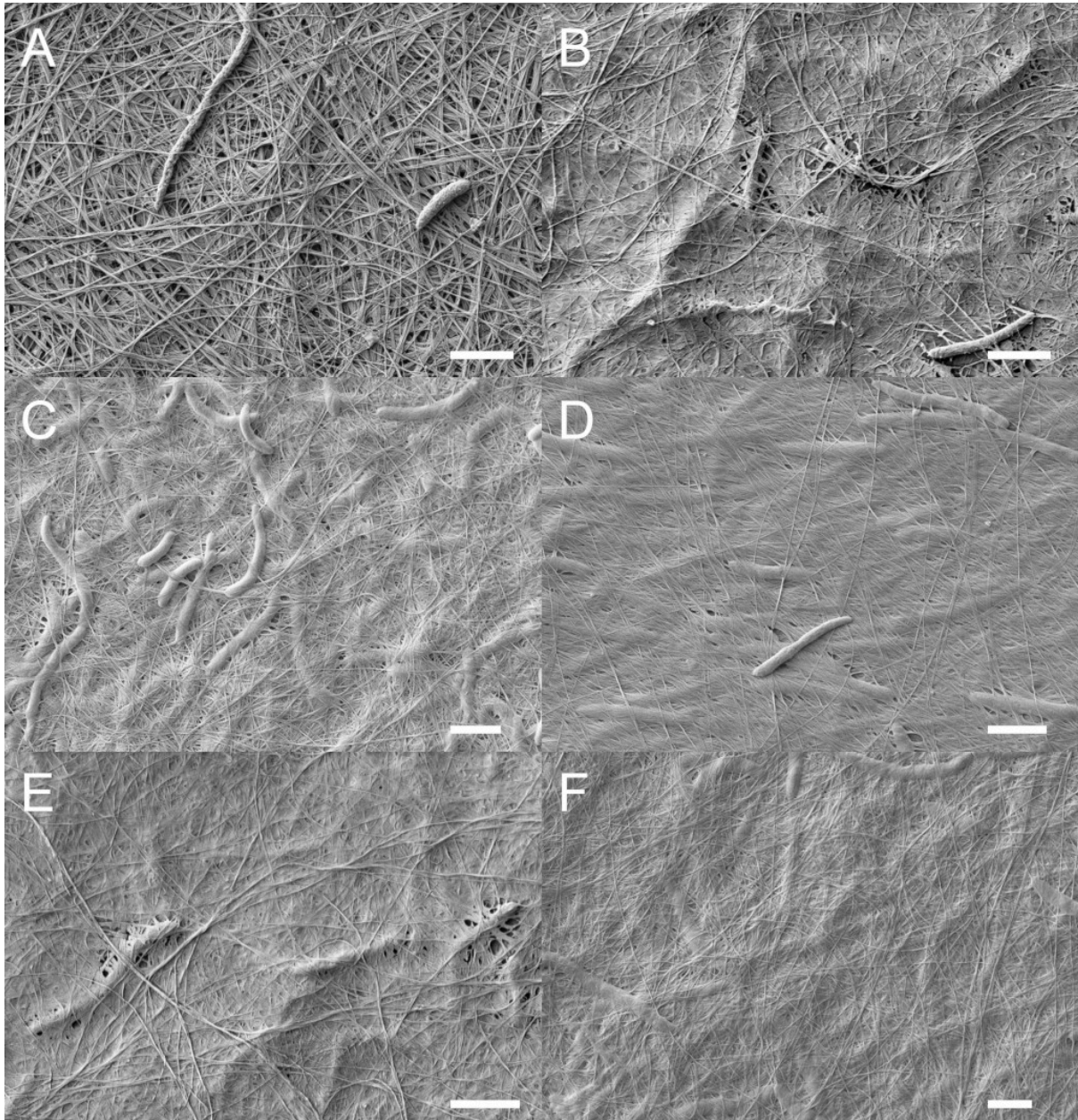


Abbildung 23. Rasterelektronenmikroskopie *K. hansenii* ATCC 53582. A: *K. hansenii* ATCC 53582; B: *K. hansenii* $\Delta bcsAB2$; C: *K. hansenii* $\Delta bcsAB3$; D: *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$; E: *K. hansenii* $\Delta bcsY$; F: *K. hansenii* $\Delta dgcA$. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 2 μm . Nach Bimmer et al. (2023).

Ebenso führte die Deletion der Acetyltransferase *bcsY* im zweiten CS-Gencluster zu einem engeren Zusammenlagern der einzelnen Cellulose-Fasern (Abbildung 23 E). Diese Komprimierung des Netzwerks war vergleichbar mit den bereits beschriebenen Beobachtungen, die nach alleiniger Deletion von *bcsAB2* zu sehen waren. Das Cellulose-Netzwerk wirkte kompakter, da jede einzelne Faser in engerem Kontakt zu ihren Nachbarfasern zu stehen schien. Gleichzeitig zeichnete sich eine Reduktion der räumlichen Tiefen-Auflösung ab. Ergänzend zum Beitrag der Cellulosesynthese auf

Ergebnisse

das 3D-Biofilmmnetzwerk wurde der Effekt, der durch Deletion der regulatorischen DGC *dgcA* entstand, analysiert. Der Beitrag von *dgcB* zur Netzwerk-Struktur konnte nicht bewertet werden, da dieser Deletionsstamm nicht in der Lage war Cellulose zu produzieren. Auch wenn, wie oben beschrieben, für *K. hansenii* $\Delta dgcA$ eine Zunahme des Elastizitätsmoduls und des Wassergehalts gezeigt wurde (3.3.6), so sind die im Elektronenmikroskop zu sehenden Unterschiede eher uneindeutig (Abbildung 23 F). Der erwartete, dem des Wildtyps entsprechende Phänotyp konnte nicht eindeutig erkannt werden, jedoch ist die Zusammenlagerung der einzelnen Cellulose-Fasern anscheinend etwas weniger dicht, als es nach Deletion von *bcsAB2*, *bcsY* und *bcsAB3* zu beobachten war, die Cellulose-Fibrillen aus unterschiedlichen Schichten des Netzwerks ließen sich in diesem Stamm besser unterscheiden, als nach Deletion der CS-Gene.

Die gezeigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden verwendet, um die beobachtete Abnahme des Faserdurchmessers nach Deletion von *bcsAB2*, *bcsAB3* bzw. *bcsY* zu quantifizieren. Hierzu wurde der Faserdurchmesser der Originalaufnahmen innerhalb der Software des Elektronenmikroskops durch unseren Kooperationspartner Andreas Klingl an einigen Fasern exemplarisch bestimmt. Die in Tabelle 28 gezeigten Messungen bestätigen den Eindruck, dass der Faserdurchmesser des Wildtyps von 160 nm sich nach Deletion von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* sich signifikant auf 78 nm bzw. 103 nm reduziert.

Tabelle 28. Veränderung des Cellulosefaser-Durchmessers in *K. hansenii* ATCC 53582 der Deletionsstämme nach Messung der REM-Aufnahmen mit dem Software-integrierten Maßstabs-Werkzeug. [n = 5; MW \pm SD] Modifiziert nach Bimmer et al. (2023).

	Durchmesser [nm] \pm SD
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	160 \pm 40
<i>K. hansenii</i> $\Delta bcsAB2$	78 \pm 22 **
<i>K. hansenii</i> $\Delta bcsAB3$	103 \pm 2 **
<i>K. hansenii</i> $\Delta bcsAB2$ $\Delta bcsAB3$	67 \pm 7 **
<i>K. hansenii</i> $\Delta bcsY$	67 \pm 14 **

3.4.2 Nachweis der unterschiedlichen Lokalisierung der Proteinsynthese der CS-Gene in Biofilmen von *K. hansenii* ATCC 23769

In *K. hansenii* ATCC 23769 konnten sowohl bei phänotypischer Betrachtung, als auch im Rasterelektronenmikroskop die Effekte unterschiedlicher Bestandteile des Cellulosebiofilms auf dessen Erscheinungsbild erkannt und der Expression der entsprechenden CS-Gene zugeordnet werden (3.3.1.1; 3.4.1.1). Der Haupt-Cellulosesynthase BcsAB1 wurde dabei die Synthese der Cellulose-Fasern zugeordnet, wohingegen bei BcsAB2 und BcsAB3 von der Synthese einer weiteren, offensichtlich andersartigen, vermutlich nicht-kristallinen Celluloseformen an der Oberfläche ausgegangen wird. Da der Biofilm bei *Komagataeibacter* an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft gebildet wird, kann innerhalb des Biofilms einerseits von einem Sauerstoff-, andererseits von einem Nährstoffgradienten ausgegangen werden, wodurch spezifische Nischen entstehen. Dieser Gradient konnte bereits von Hornung et al. (2006) empirisch charakterisiert werden und bietet möglicherweise Schwellenwerte, die die Expression der drei in *K. hansenii* ATCC 23769 kodierten CS-Gene regulieren könnten. Daher wurde die Lage der Expression der einzelnen CS-Gene innerhalb eines Biofilms mittels der translationalen Fusion von Genen für fluoreszierende Markerproteine an die CS-Gene bestimmt.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein *proof-of-principle* Experiment durchgeführt, um zu zeigen, dass ein Gen für *superfolder green fluorescent protein* (sfGFP) funktional in *Komagataeibacter* exprimiert werden und die Expression durch den Promotor der Cellulosesynthase gesteuert werden kann. Dazu wurde das Gen für sfGFP im Plasmid pMM3b mit der Promotorsequenz von BcsAB1 fusioniert und in *K. hansenii* ATCC 23769 exprimiert. Die Analyse der sfGFP-Synthese erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie an mehreren Tagen in Kolonien aus Flüssigkultur. Aufgrund des detektierten Fluoreszenzsignals, konnte gezeigt werden, dass sfGFP in *K. hansenii* ATCC 23769 unter Einfluss des nativen Promotors der Haupt-Cellulosesynthase exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Daten wurden anschließend durch genomische Insertionen der ORFs der Fluoreszenzmarker an die drei CS-Gene translationale Fusionen erstellt.

Ergebnisse

Die Auswahl geeigneter Fluoreszenz-Marker basierte auf deren möglichst unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen, um einer Wechselwirkung während der Messung des Fluoreszenzsignals vorzubeugen. Mittels triparentaler Konjugation und des *codBA*-Gegenselektionssystems konnten die Fluoreszenzproteingene zielgenau an den jeweiligen Bestimmungsort im Genom von *K. hansenii* ATCC 23769 inseriert werden – jeweils stromabwärts der zu analysierenden Cellulosesynthase (sfGFP an *bcsAB1*, mRFP1 an *bcsAB2* und mKalama1 an *bcsAB3*). Um eine Verschiebung des Leserahmens für nachfolgende Gene zu verhindern und eine Expression der Marker zu gewährleisten wurden die ORFs, beginnend mit dem Start-Codon, jeweils im Abstand von einer Aminosäure, also 3 Basenpaaren, zum Stoppcodon an das im Operon bzw. Gencluster vorangehende Gen fusioniert. Da sich das Ende von *bcsAB1* mit dem Beginn von *bcsC1* überschneidet, wurde die Insertionsstelle von sfGFP zwischen *bcsC1* und *bcsD* gelegt, um die Expression von *bcsC1* nicht negativ zu beeinflussen. Die Konstruktion der übrigen Insertionen der Fluoreszenzproteingene erfolgte analog zu der hier exemplarisch, am Schema für die Insertion des ORFs für sfGFP stromabwärts von *bcsC1*, gezeigten Insertion (siehe Abbildung 24). Die Generierung eines Dreifach-Insertions-Stamms sollte dabei helfen, gleichzeitig die zeitliche und die räumliche Verteilung der Expression der drei CS-Gene sichtbar zu machen.

Ergebnisse

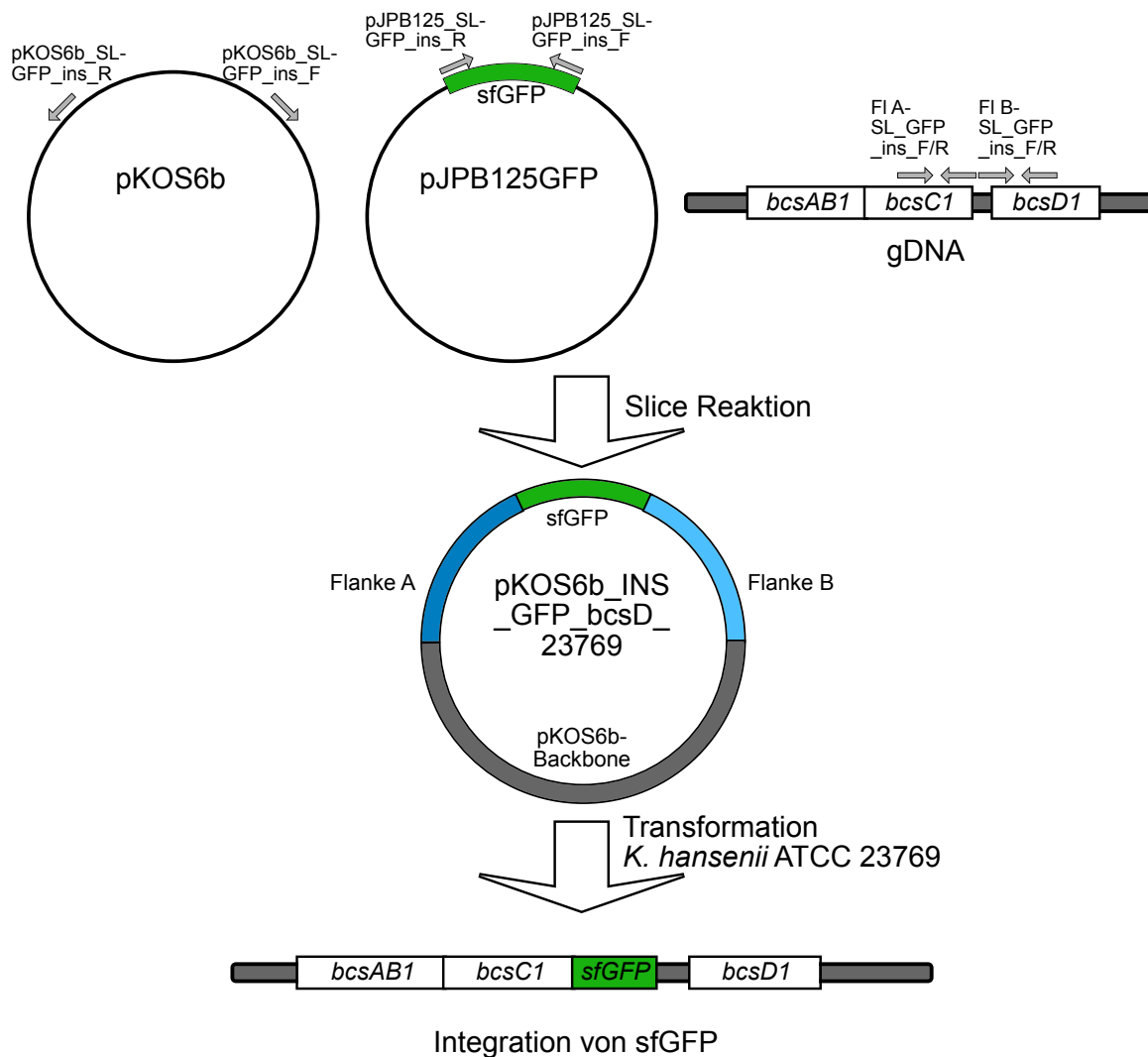


Abbildung 24. Schema zur Konstruktion der Insertion von Fluoreszenz-Reporter-Genen in *K. hansenii* ATCC 23769.

Die weitere Präparation der Proben mittels Fixierung und Dünnschnitt am Mikrotom erforderte die Nutzung und Einweisung in die Geräte der Professur für Pflanzliche Entwicklungsbiologie (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland). Die Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen wurden an einem Konfokal-Laser-Scanning Mikroskop an der Professur für Neuronale Kontrolle des Metabolismus (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) durchgeführt.

Die Expression der Fluoreszenzmarkergene hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Cellulosesynthese von *K. hansenii* ATCC 23769 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Die

Ergebnisse

an Tag 21 nach Beginn der Kultivierung entstandenen Aufnahmen zeigten deutliche Unterschiede in der Verteilung der Fluoreszenzsignale entsprechend der einzelnen Fusionen (Abbildung 25). Die fortwährende Expression von *bcsAB1* und die damit verbundene Synthese von Cellulosefasern zeigte sich durch das über den gesamten Querschnitt des Biofilms verteilte sfGFP-Signal. Jedoch ist anzumerken, dass die Intensität des sfGP-Signals sowohl in Richtung der mediumszugewandten Seite (unten in Abbildung 25), als auch in Richtung der luftzugewandten Seite des Biofilms (oben in Abbildung 25) im Vergleich zu weiter innen liegenden Bereichen zunahm. Diese Zunahme entspricht einer relativ gesehen höheren Synthese von BcsAB1 entlang der beiden Grenzflächen. Dagegen zeigte das mRFP1-Signals in derselben Biofilm-Probe, dass die Synthese von BcsAB2 auf die mediumszugewandte Seite des Biofilms beschränkt war. Vergleichbar verhielt es sich mit dem Signal für BcsAB3. Eine Fluoreszenz von mKalama1 konnte besonders intensiv nur an der mediumszugewandten Seite festgestellt werden. Die in dieser Arbeit gemachten Aufnahmen dienen lediglich der qualitativen Einschätzung der Lokalisierung der Expression der drei CS-Gene innerhalb des Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769. Eine quantitative Aussage bezüglich der Expressionsstärke der drei CS-Gene ist aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe sowie aufgrund des gewählten Experiment-Designs nicht möglich und war zu diesem Zeitpunkt auch nicht beabsichtigt. Der tatsächliche Vergleich der Stärke der Transkription der CS-Gene erforderte die Analyse mittels RT-qPCR.

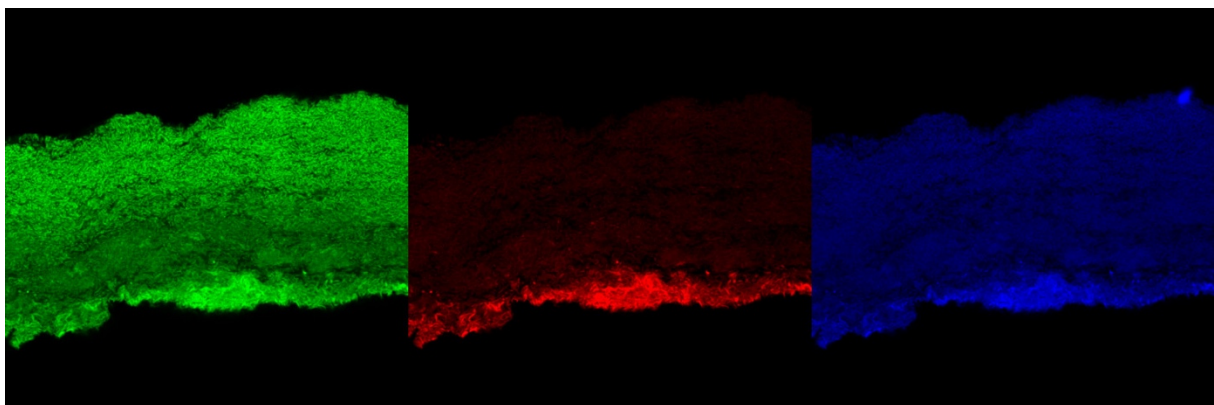


Abbildung 25. Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie nach Fusion der ORF von sfGFP an (*bcsD*) *bcsAB1*, mRFP1 an *bcsAB2* und mKalama1 an *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCC 23769. Ausrichtung: oben = luftzugewandte Seite, unten = mediumszugewandte Seite (Bimmer et al. 2022).

3.5 Expression der CS-Gene – RT-qPCR

Im vorangegangenen Kapitel wurde die tatsächliche Expression der drei CS-Loci in *K. hansenii* ATCC 23769 anhand der Fusionen der ORFs von Fluoreszenz-Reportern an die drei CS-Gene gezeigt. Diesem Versuch schloss sich eine Quantifizierung der Expressionsstärke der drei CS-Gene mittels RT-qPCR an. Aufgrund der unterschiedlichen Cellulosesynthese-Rate beider Stämme wurden an beide Stämme angepasste Zeitpunkte für die Analyse verwendet. Im niedrig-Cellulose-Expressionsstamm *K. hansenii* ATCC 23769 erfolgte die Probennahme an mehreren Tagen bzw. an Tag 21 aus unbewegter Flüssigkultur. Dagegen wurde die Analyse der Expression der Cellulosesynthasen im Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 auf einen Tag beschränkt. Hier erfolgte die Kultivierung für drei Tage in einer Flüssigkultur in HS-Medium unter Zugabe von 6 U/mL Cellulase (*T. reesei*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei 30 °C und 60 rpm. Zur Bestätigung, dass unter diesen Bedingungen Cellulose gebildet wurde, wurde eine parallele Kontrolle ohne Zugabe von Cellulase durchgeführt. Diese Kultur ohne Cellulasezusatz wies nach Ende der Inkubationszeit einen Cellulosebiofilm auf. Zur Extraktion der RNA wurde für beide Stämme das TRIzol-Extraktionsprotokoll von ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. In der RT-qPCR-Reaktion wurden Fragmente (~100 bp) der CS-Gene mit Primern spezifisch amplifiziert und mit der Expression der ausgewählten Referenzgene (*gyrA*, *recA*, *rpoB*) verglichen. In *K. hansenii* ATCC 23769 erfolgte dies mittels relativer Quantifizierung. Dazu wurde am jeweiligen Tag die Expression des Zielgens mit der des Referenzgens *gyrA* ins Verhältnis gesetzt. Die Quantifizierung in *K. hansenii* ATCC 53582 erfolgte mittels absoluter Quantifizierung nach einer Standardkurve und wurde ebenfalls mit der Expression des Referenzgens *gyrA* verglichen. Aufgrund der starken Sequenzhomologie beider Stämme konnten die für *K. hansenii* ATCC 23769 entworfenen Primer auch in *K. hansenii* ATCC 53582 verwendet werden. Eine optimale Amplifikation (Verdopplung in jedem Zyklus) der Fragmente erforderte die Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. Dazu war in *K. hansenii* ATCC 23769 ein gesonderter Annealing-Schritt bei 55 °C erforderlich, dagegen konnte in *K. hansenii* ATCC 53582 das Standardprotokoll des Herstellers, bei welchem das Annealing bei 60 °C erfolgt, verwendet werden. Für beide Stämme

lag die selbst-bestimmte Effizienz der PCR im optimalen Bereich von 0,9 – 1,1 (Taylor et al. 2010).

3.5.1 Relative Bestimmung der Expression in *K. hansenii* ATCC 23769

Die Cellulosesynthese in *K. hansenii* ATCC 23769 nahm eine deutlich längere Zeit in Anspruch, als es bei *K. hansenii* ATCC 53582 der Fall war. Da für ATCC 23769 die Synthese von weiteren, offensichtlich andersartigen, vermutlich nicht-kristallinen Celluloseformen an der Oberfläche durch BcsAB2 und BcsAB3 gezeigt werden konnte, wurde der zeitliche Verlauf der Expression aller CS-Gene gemessen. Anhand eines möglichen zeitlichen Musters der Expression könnte ein Zusammenhang zur Reihenfolge der Biofilmmodifikation hergestellt werden.

Die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der relativ zum Referenzgen *gyrA* berechneten Expression der drei CS-Gene zeigte in *K. hansenii* ATCC 23769 eine gleichmäßige und vergleichbare Expression aller CS-Gene über den Kultivierungszeitraum. Entgegen der Erwartungen zeigte sich an keinem der Tage die höchste Expression für *bcsAB1*. Die im Mittel höchste relative Expressionsstärke konnte stattdessen zunächst für *bcsAB2* und *bcsAB3* gemessen werden (Abbildung 26). An Tag 12 nach Beginn der Kultivierung nahm die Expressionsstärke für *bcsAB2* und *bcsAB3* im Mittel ab, so dass die mittlere Expression von *bcsAB1* ab Tag 16 über der von *bcsAB3* lag. Wird die Standardabweichung der einzelnen Proben im Verlauf ebenfalls berücksichtigt, so ergeben sich Korridore des Verlaufs, die sich bei allen drei Cellulosesynthasen überschneiden (nicht gezeigt).

Ergebnisse

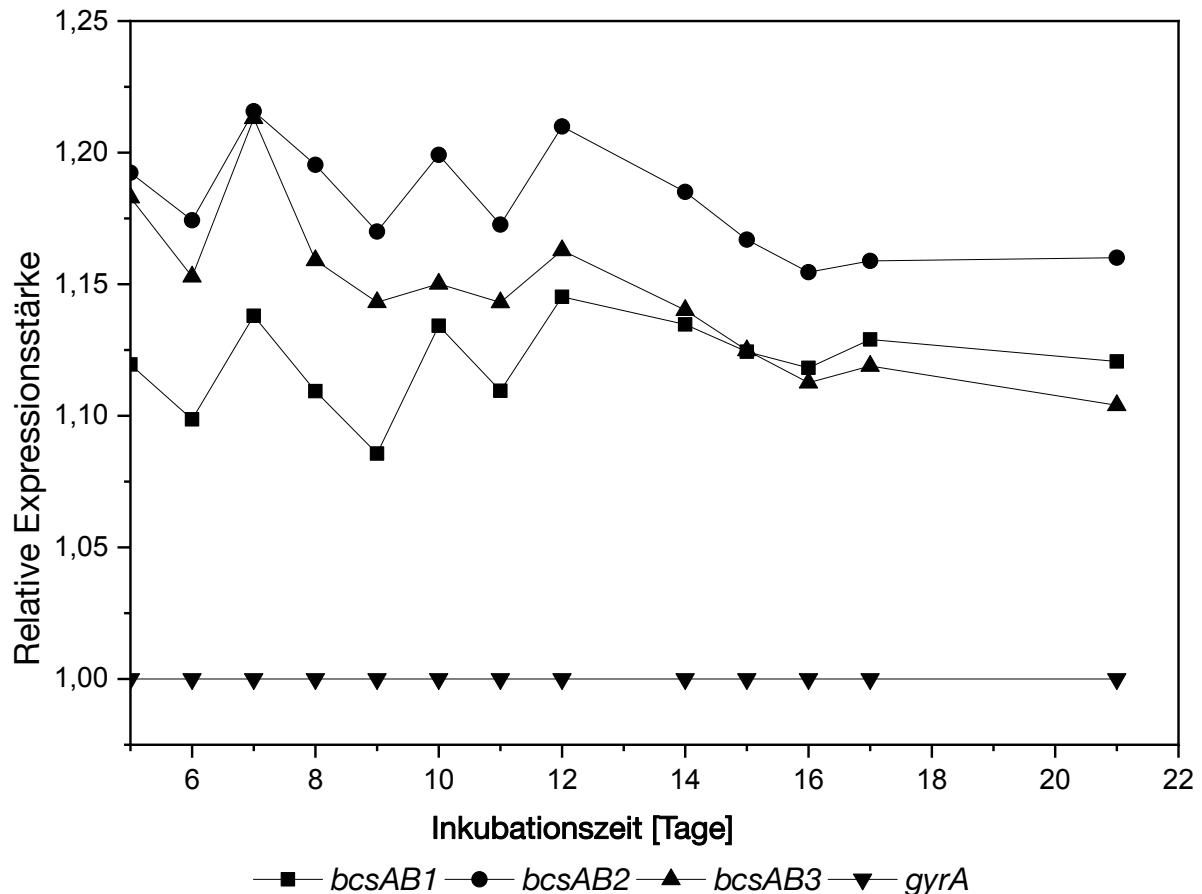


Abbildung 26. Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionsstärke der CS-Gene *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* im Bezug zum ausgewählten Referenzgens *gyrA* in *K. hansenii* ATCC 23769 über drei Wochen bei unbewegter, statischer Kultivierung [MW; n=4≤8]. Nach Bimmer et al. (2022).

Die relativ gesehen leicht niedrigere Expressionsstärke von *bcsAB1* im Vergleich zu den beiden anderen CS-Genen erscheint nach den bisher gemachten, v. a. phänotypischen Eindrücken überraschend, da stets der größte Beitrag zur Synthese des Cellulosebiofilms auf die von *bcsAB1* gebildeten Cellulosefasern entfiel. Die vergleichsweise geringen Unterschiede zwischen den drei CS-Genen wurden bei Analyse der Transkriptionsstärke an Tag 21 deutlich (Abbildung 27). *bcsAB1* wies eine im Vergleich zu *bcsAB2* etwas geringere Expressionstärke auf, die vergleichbar zur Expression von *bcsAB3* war, einer CS, deren Produkt in *K. hansenii* ATCC 23769 nur einen geringen Beitrag zum Phänotyp zu leisten schien.

Ergebnisse

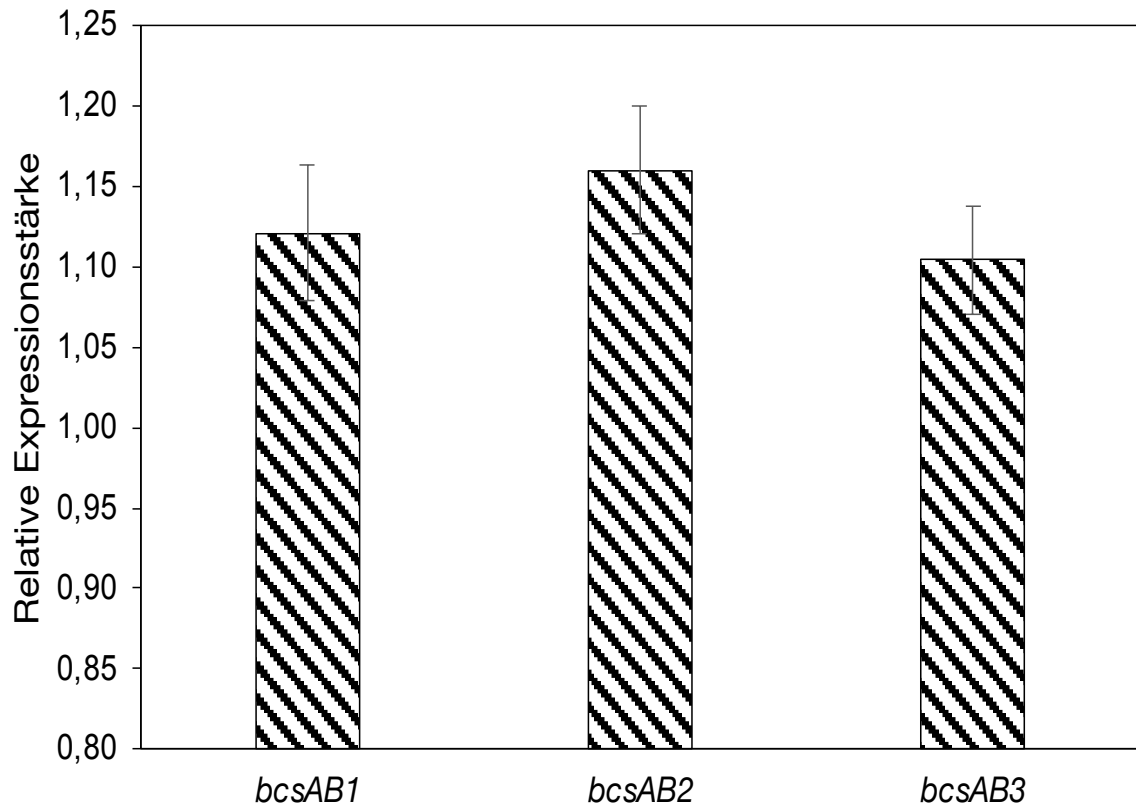


Abbildung 27. Relative Quantifizierung der Transkription der Cellulosesynthese-Gene in *K. hansenii* ATCC 23769 an Tag 21 in unbewegter Flüssigkultur [MW ±SD; n=8]. Nach Bimmer et al. (2022).

3.5.2 Absolute Quantifizierung der Transkription der CS-Gene in *K. hansenii* ATCC 53582

Anders als in *K. hansenii* ATCC 23769, benötigte die Cellulosesynthese in *K. hansenii* ATCC 53582 deutlich weniger Zeit. Bereits nach wenigen Tagen war ein Biofilm an der Mediumsoberfläche zu erkennen. Daher erfolgte die Quantifizierung der Expressionsstärke bereits nach 3 Tagen aus Flüssigkulturen, denen 6 U/mL Cellulase zugesetzt wurde. Die absolute Quantifizierung der Expressionsstärke der CS-Gene in *K. hansenii* ATCC 53582 ergab die höchste Transkriptmenge für *bcsAB1* ($4,54 \times 10^7$ Kopien μl^{-1}). Dies bekräftigte die herausragende Bedeutung von *bcsAB1* im Vergleich zu den beiden anderen CS, da die Transkription dieses Gens einen Großteil der Gesamt-Transkriptionsprodukte aller CS-Gene ausmachte (~66 %) (Abbildung 28).

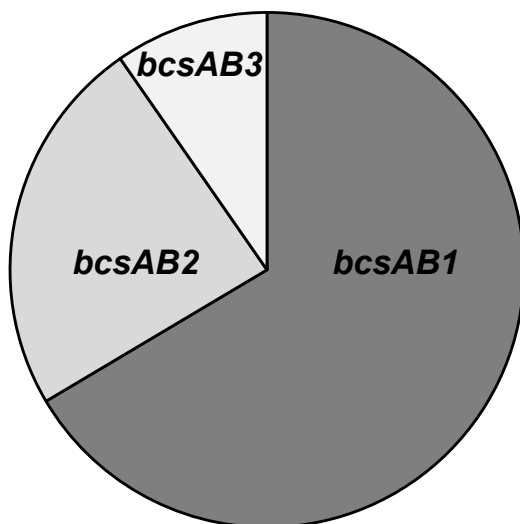


Abbildung 28. *K. hansenii* ATCC 53582 Expression der CS-Gene nach absoluter Quantifizierung der gebildeten Transkripte. [MW; n=8]. Nach Bimmer et al. (2023).

Auffällig war der deutliche Unterschied des Expressionsmusters der CS-Gene im Vergleich zu dem von *K. hansenii* ATCC 23769, in welchem die höchste Transkription für *bcsAB2* gemessen wurde. Dagegen war im Hoch-Cellulose-Produktionsstamm ATCC 53582 die Transkriptmenge von *bcsAB2* im Vergleich zu *bcsAB1* signifikant reduziert ($1,63 \times 10^7$ Kopien μl^{-1}), was einerseits der makroskopischen Beobachtungen des Phänotyps (Abbildung 11), andererseits auch den Beobachtungen im REM (Abbildung 18) entsprach. Nichtsdestotrotz zeigte die vergleichsweise hohe Expression der zweiten Cellulosesynthese, dass deren Beitrag zum Cellulosenetzwerk

Ergebnisse

scheinbar nicht zu vernachlässigen ist. Auffällig war die, im Vergleich zu den beiden anderen CS, besonders niedrige Transkriptmenge der dritten Cellulosesynthase *bcsAB3* ($6,61 \times 10^6$ Kopien μl^{-1}). Dies bestätigte den vorangegangenen Eindruck, dass *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCC 53582 nur von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Im Gegensatz zu *K. hansenii* ATCC 23769, wo die Expression von *bcsAB3* mit der von *bcsAB1* vergleichbar war. Dieses Ergebnis konnte auch in einer RT-qPCR-Reaktion bestätigt werden, die mit RNA durchgeführt wurde, die nach 6 Tagen unbewegter, statischer Kultur extrahiert wurde, aber keine optimalen Qualitätskriterien aufwies und deshalb nicht als Standardprozedur für die RT-qPCR verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

3.6 Proteomik-Analyse unterschiedlicher, mit der Cellulosesynthese assoziierter Proteine

Entsprechend der vorangegangenen Ergebnisse konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl in *K. hansenii* ATCC 23769, als auch in *K. hansenii* ATCC 53582 die Transkripte aller drei kodierten CS-Gene gebildet wurden. Jedoch unterschied sich der phänotypische Beitrag der einzelnen Cellulosesynthesen zum Cellulosebiofilm so deutlich, dass in beiden Stämmen nur BcsAB1 ein entscheidender Beitrag zum Aufbau des bakteriellen Cellulosenetzwerks zugerechnet werden konnte. Da jedoch die weiteren physikochemischen Messungen auch einen Beitrag von BcsAB2 und BcsAB3 zu den Eigenschaften des Cellulose-Netzwerks zeigten, wurde im weiteren Verlauf das tatsächliche Vorhandensein sowie die Abundanz der Cellulosesynthesen auf Ebene des Proteoms analysiert.

Hierzu wurde einerseits ein Vergleich zwischen *K. hansenii* ATCC 23769 und dem Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582, wie auch jeweils zwischen dem Wildtyp und dem *bcsAB1*-Einzelexpressionsstamm gezogen. Gleichzeitig liefern Messungen des Gesamtproteoms ausführliche Daten zum Gesamt-Metabolismus der Zelle zum Zeitpunkt der Probenahme. Diese Daten liefern weitere Hinweise, die auf weitere, noch unbekannte Ursachen für die starken Unterschiede in der Produktionsmenge und Produktionsgeschwindigkeit beider Stämme hindeuten könnten.

Die Proben von *K. hansenii* ATCC 23769 wurden nach 21 h Kultivierung in Cellulase-Kultur (6 U/ml; 60 rpm; 30 °C) genommen, in *K. hansenii* ATCC 53582 erfolgte die Probennahme bei gleicher OD₆₀₀ und ansonsten gleichen Bedingungen nach 3 Tagen. Eine zeitliche Auflösung zur Darstellung von Veränderungen des Proteoms erfolgte nicht. Die Probenvorbereitung, bestehend aus Proteinextraktion und Proteinquantifizierung, erfolgte am Lehrstuhl für Mikrobiologie, die anschließenden Proteomik-Messungen erfolgten durch Christina Ludwig am BayBioMS (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland). Die massenspektrometrischen Daten wurden im "ProteomeXchange Consortium" über das PRIDE Partner-Repository zur Verfügung gestellt. Die Identifikationsnummer des Datensatz lautet PXD037699 (Zugriff über den Gutachter Zugang möglich – Benutzername: reviewer_pxd037699@ebi.ac.uk, Passwort: RkhR8g6e).

Ergebnisse

Die Quantifizierung der einzelnen Proteine (Tabelle 15, Tabelle 16) erfolgte mittels relativer Quantifizierung durch Berechnung der Massenanteils, basierend auf iBAQ-Werten, die aus der Auswertungssoftware MaxQuant ausgegeben wurden (Schwanhäusser et al. 2011).

Neben den im CS-Operon bzw. -Genclustern kodierten Proteine und der akzessorischen Proteine, wurden die Proteine der DGCs und die an der Aktivierung der Glucose beteiligten Proteine untersucht. Darüber hinaus wurden die Daten auf Proteine untersucht, die einheitlich in allen vier gemessenen Replikaten eine signifikant unterschiedliche Abundanz zwischen den Proben des Wildtyps und den Proben bei Einzelexpression von *bcsAB1* zeigen, um so mögliche weitere regulatorische Aspekte der Cellulosesynthese in *K. hansenii* zu identifizieren.

3.6.1 Quantifizierung der Proteine der Cellulosesynthese-Gencluster

3.6.1.1 In Operon 1 (BcsAB1) kodierte Proteine

Der Vergleich der Abundanzen der einzelnen von den drei CS-Operons kodierten Proteine mit dem gesamten Proteom zeigte eine durchschnittliche Stärke der Bildung der Cellulosesynthesen. Dagegen war die Abundanz der akzessorischen Proteine sowohl in *K. hansenii* ATCC 23769 (Abbildung S 7; Abbildung S 8), als auch in *K. hansenii* ATCC 53582 (Abbildung S 9; Abbildung S 10) zum Teil überdurchschnittlich hoch.

Der Vergleich der Bildung der für die Synthese der fibrillären Cellulose in *K. hansenii* ATCC 23769 verantwortlichen Proteine (die in Operon 1 kodierten Proteine BcsAB1, BcsC und BcsD) zeigte keinen Einfluss der markerfreien Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* auf deren Proteinabundanz (Abbildung 29 A, B). Zuerst war festzuhalten, dass BcsAB1 im Wildtyp von *K. hansenii* ATCC 23769 eine vergleichbar hohe relative Abundanz aufwies wie wenn nur *bcsAB1* alleine exprimiert wurde. Auffällig waren jedoch zwei andere Befunde im Proteom des Wildtyps. Einerseits zeigten die akzessorischen Proteine CcpAx (4,5x / 4,7x) und BglxA (1,2x / 1,3x), eine deutlich höhere Abundanz im Vergleich zu BcsAB1 und BcsC1. Diese Beobachtung impliziert einen entscheidenden Beitrag der akzessorischen Proteine zur korrekten Synthese der kristallinen Cellulosefasern. Andererseits wurde BcsD, obwohl es im

Ergebnisse

beschriebenen *bcsABCD*-Operons kodiert wird (Römbling and Galperin 2015; Wong et al. 1990), um den Faktor 7,6 stärker produziert als BcsAB1, bzw. um 7,9x stärker als BcsC1. Die vorhergesagte Lokalisation von BcsD im Periplasma und die relativ starke Produktion dieses Proteins lässt eine entscheidende Rolle im Zusammenlagern der Cellulose-Fibrillen vermuten.

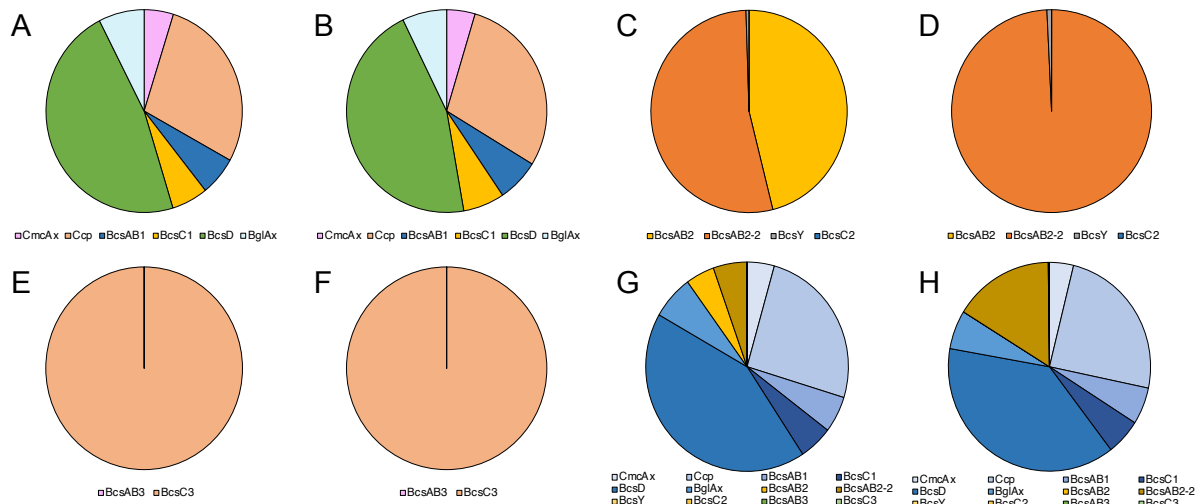


Abbildung 29. Charakterisierung der Proteinsynthese in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$. Vergleich der Abundanz der drei CS-kodierenden Loci entsprechend der iBAQ Intensitäten. Dargestellt sind relative Häufigkeiten der mit BcsAB1 assoziierten Proteine in *K. hansenii* ATCC 23769 (A) und in *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (B), relative Häufigkeiten der mit BcsAB2 assoziierten Proteine in *K. hansenii* ATCC 23769 (C) und in *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (D), relative Häufigkeiten der mit BcsAB3 assoziierten Proteine in *K. hansenii* ATCC 23769 (E) und in *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (F), sowie relative Häufigkeiten aller CS-bezogenen Proteine in *K. hansenii* ATCC 23769 (G) und in *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (H). [MW \pm SD; n=4].

Die Verteilung der Proteinabundanzen der innerhalb des ersten CS-Operons des Hoch-Cellulose-Produktionsstamms *K. hansenii* ATCC 53582 kodierten Proteine verhielt sich vergleichbar (Abbildung 30 A; B). Die markerfreie Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* wirkte sich in diesem Stamm ebenfalls nicht auf die Produktion der in den verbleibenden CS-Operons kodierten Proteine aus. Ebenso wurde auch in diesem Stamm der essenzielle Beitrag der akzessorischen Proteine für eine korrekte Synthese der Cellulosefasern deutlich. Auffällig ist in diesem Stamm jedoch, dass die Faktoren, um die die Bildung der akzessorischen Proteine gegenüber BcsAB1 bzw. BcsC1 erhöht war, im Vergleich zu *K. hansenii* ATCC 23769 deutlich stiegen. Diese erhöhten sich im Wildtyp deutlich für die Produktion von CcpAx (6,1x / 5,2x) und BglxA

Ergebnisse

(5,2x / 4,4x), jeweils bezogen auf die Produktion von BcsAB1 bzw. BcsC1. Besonders stark stieg der Faktor für BcsD; dieses Protein wurde in *K. hansenii* ATCC 53582 um den Faktor 11 stärker produziert als BcsAB1 bzw. 7,6-fach stärker als BcsC1.

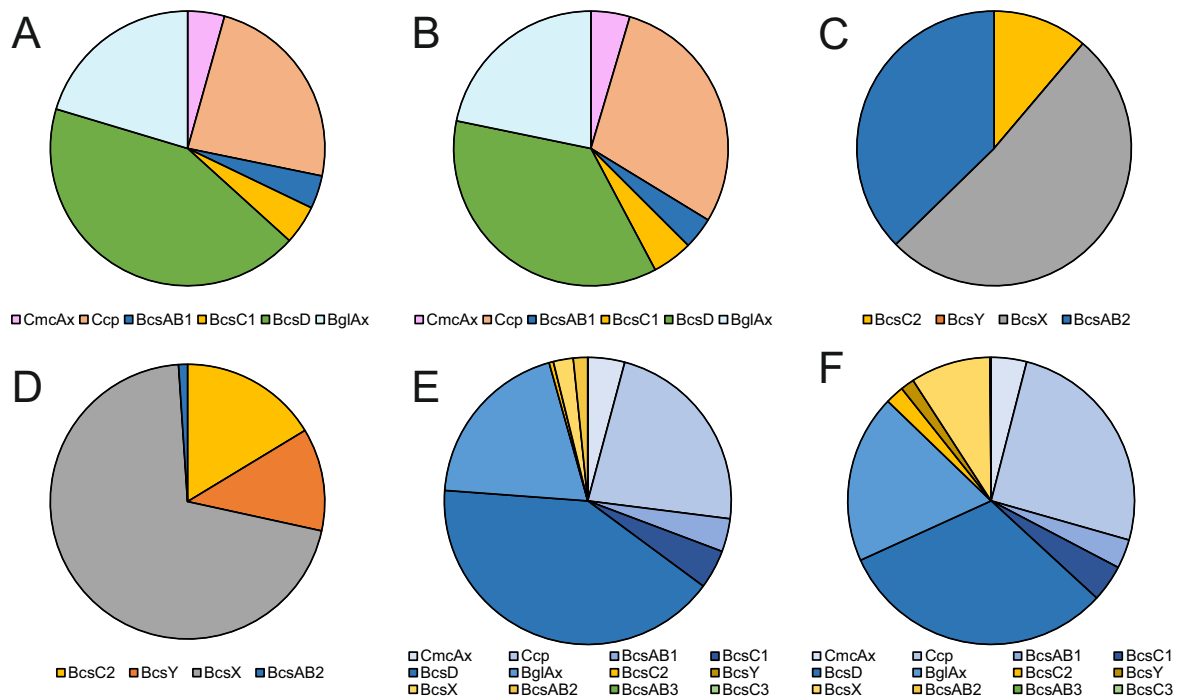


Abbildung 30. Charakterisierung der Proteinbildung in *K. hansenii* ATCC 53582 und *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$. Dargestellt sind die relative Häufigkeiten der mit BcsAB1 assoziierten Proteine in *K. hansenii* ATCC 53582 (A) und in *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (B), relative Häufigkeiten der mit BcsAB2 assoziierten Proteine in *K. hansenii* ATCC 53582 (C) und in *K. hansenii* ATCC 53582 $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (D), sowie die relativen Häufigkeiten aller CS-bezogenen Proteine in *K. hansenii* ATCC 53582 (E) und in *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (F). [MW \pm SD; n=4]. Nach Bimmer et al. (2023).

3.6.1.2 In Gencluster 2 (BcsAB2) kodierte Proteine

Der Aufbau des zweiten CS-Gencluster unterscheidet sich zwischen *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 in der Gen-Zusammensetzung leicht. In ersterem besteht dieses aus *bcsAB2*, *bcsAB2* ORF2, *bcsY* und *bcsC2* (Abbildung 3). In letzterem ist die Reihenfolge invertiert und wie folgt: *bcsAB2*, *bcsX*, *bcsY* und *bcsC2* (Abbildung 4). Zwischen beiden Stämmen weisen die Genprodukte von *bcsAB2* ORF2 und *bcsX* einerseits nur eine geringe Aminosäuresequenzähnlichkeit auf, andererseits konnten beide nach Blast-Analyse der SGNH/GDSL-Hydrolase Familie zugeordnet werden. Der Bewertung der Ergebnisse muss vorausgeschickt

Ergebnisse

werden, dass in beiden Stämmen trotz markerfreier Deletion von *bcsAB2* jeweils in einem der vier biologischen Replikate ein einzelnes Peptid dieses Proteins detektiert wurde. Hierbei handelte es sich um ein Peptid, welches im Wildtyp in ausgesprochen niedriger Abundanz vorkam. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die markerfreie Deletion von *bcsAB2* in beiden Stämmen dennoch erfolgreich war und es sich hierbei um einen falsch-positiven Treffer handelte. Dennoch wurde darauf verzichtet dieses Replikat aus der Auswertung auszuschließen.

Auch für BcsAB2 gilt in beiden Stämmen, dass es sich hierbei nicht um das am stärksten gebildete Protein des Genclusters handelte. In beiden Stämmen wurde stattdessen das jeweils im Anschluss an BcsAB2 kodierte Protein, BcsAB2 ORF2 bzw. BcsX, am höchsten exprimiert. Über die Produktion des zweiten Kanalproteins BcsC2 lässt sich leider kaum eine Aussage treffen, da dieses in *K. hansenii* ATCC 23769 weder im Wildtyp noch im *bcsAB1*-Einzelexpressions-Stamm detektiert werden konnte. Wird ergänzend für diese Bewertung die Zunahme der Bildung von BcsC2 nach den Deletionen in *K. hansenii* ATCC 53582 betrachtet, so stieg diese im Deletionsstamm gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 4,3 und verhielt sich ähnlich, wie die bereits beschriebene Zunahme bei BcsX (Faktor 4,0). Entsprechend der Zunahme der Abundanz von BcsAB2 ORF2 von Wildtyp hin zur Mutante um den Faktor 3,4 lässt sich vermuten, dass sich die Bildung von BcsC2 ebenfalls erhöhte, aber dennoch kein zugehöriges Peptid detektiert wurde. Die umgekehrte Situation stellte sich für BcsY dar. Hier konnte das Protein in *K. hansenii* ATCC 53582 lediglich in einem Replikat nach Doppeldeletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* detektiert werden. In *K. hansenii* ATCC 23769 konnte es in beiden Stämmen jeweils in geringen Mengen detektiert werden. Im Wildtyp entsprach die gemessene Intensität 1 % der Intensität von BcsAB2.

3.6.1.3 In Gencluster 3 (BcsAB3) kodierte Proteine

Die Aussage über die relativen Abundanzen von BcsAB3 und BcsC3 ist sowohl für *K. hansenii* ATCC 23769, als auch für *K. hansenii* ATCC 53582 begrenzt. Einzig in ersterem war es möglich das Kanalprotein BcsC3 mittels MS zu detektieren. Dagegen konnte in letzterem keines der beiden Proteine detektiert werden. Die gemessene

Abundanz von BcsC3 lag im Vergleich zu BcsC1 bei 1 % und könnte so in *K. hansenii* ATCC 53582 zu einem Signal unterhalb der Detektionsgrenze geführt haben.

3.6.1.4 Vergleich der Proteinmengen der Cellulosesynthesen

Die deutlichen Unterschiede im Beitrag der zusätzlichen Cellulosesynthesen zum Phänotyp der produzierten Cellulose könnte auf unterschiedliche Produktionsstärken der Cellulosesynthesen in beiden Stämmen zurückzuführen sein. Sowohl in *K. hansenii* ATCC 23769, als auch in *K. hansenii* ATCC 53582 ließen sich die Abundanzen der einzelnen Cellulosesynthesen gut miteinander vergleichen, um weitere Daten zu deren hierarchischen Beziehung zu generieren. Dabei fiel auf, dass in *K. hansenii* ATCC 23769 die Bildung von BcsAB2 nur geringfügig weniger war als die von BcsAB1 (Faktor 0,8x). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Menge in *K. hansenii* ATCC 53582 deutlich, hier lag die Abundanz von BcsAB2 bei der 0,4-fachen Abundanz von BcsAB1. Die reduzierte Proteinmenge von BcsAB2 in *K. hansenii* ATCC 53582 zeigt erneut die Besonderheit dieses Stamms, der auf die Bildung großer Mengen kristalliner Cellulose spezialisiert zu sein scheint und weniger nfEPS synthetisiert.

3.6.2 Detektion der an der Aktivierung der Glucose beteiligten Proteine

Nach Aufnahme der Glucose in die Zelle laufen drei enzymatische Reaktionen ab, bevor im finalen Schritt die Polymerisierung von UDP-Glucose zu Cellulose durch die Cellulosesynthase erfolgt. Im ersten Schritt erfolgt eine ATP-abhängige Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch eine Glucokinase (Glk; ATCC 23769: WP_003618365.1; ATCC 53582: CUW46742.1 oder CUW48521.1). Anschließend erfolgt die Isomerisierung durch eine Phosphoglucomutase (Pgm; ATCC 23769: WP_003619969.1; ATCC 53582: CUW46964.1) zu Glucose-1-Phosphat, welches abschließend durch eine UDPG-Pyrophosphorylase (UTP) (Ugp1; ATCC 23769 WP_040511958.1; ATCC 53582: CUW47019.1) zu UDP-Glucose aktiviert wird (Ross et al. 1991) (Abbildung 2). Hierbei ließ sich weder für *K. hansenii* ATCC 23769, noch für *K. hansenii* ATCC 53582 eine deutliche Veränderung der Bildungsstärke der beteiligten Proteine beobachten. In beiden Stämmen blieb die Synthesestärke aller gemessenen Proteine konstant (Tabelle 29). Die beobachteten geringen Unterschiede sind im Rahmen der Messgenauigkeit der massenspektrometrischen Analyse nicht deutlich genug, um eine Beeinflussung der Proteinbildung nachzuweisen.

Tabelle 29. Relative Änderungen der Synthese der an der Glucose-Aktivierung beteiligten Enzyme in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 zwischen Wildtyp und BcsAB2-BcsAB3-Doppel-Deletionsstamm.

	ATCC 23769 Synthesestärke WT/ Δ bcsAB2 Δ bcsAB3	ATCC 53582 Synthesestärke WT/ Δ bcsAB2 Δ bcsAB3
GlkA	---	2,0
Glk	1,0	0,7
Pgm	1,0	0,8
Ugp1	1,0	1,0

3.6.3 Produktion der regulatorischen Diguanylatcyclasen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde außerdem der Effekt der regulatorischen DGCs DgcA und DgcB, auf die Fähigkeit von *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 Cellulose bilden zu können, analysiert. Bei Betrachtung des Phänotyps nach stehender Kultivierung war nach Deletion von DgcB das Fehlen eines Cellulosebiofilms, bzw. nach Deletion von DgcA zum Teil ein Rückgang der Cellulosemenge zu beobachten. Um die Beziehung zwischen regulatorischen DGCs und Cellulosesynthesen besser zu verstehen wurde der Einfluss der Doppeldeletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* auf die Synthese von DgcA und DgcB untersucht. In beiden Stämmen konnte keine deutliche Veränderung im Synthesemuster zwischen Wildtyp und Doppeldeletionsmutante beobachtet werden (Tabelle 30).

Tabelle 30. Relative Veränderung der regulatorischen DGCs in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 jeweils bezogen auf die Änderung von Wildtyp zur CS-Doppel-Deletionsstamm.

	ATCC 23769 Synthesestärke WT/ $\Delta bcsAB2$ $\Delta bcsAB3$	ATCC 53582 Synthesestärke WT/ $\Delta bcsAB2$ $\Delta bcsAB3$
DgcA	0,9	0,8
DgcB	1,2	0,7

3.6.4 Identifizierung weiterer Proteine mit signifikant unterschiedlichen Abundanzen

Die statistische Auswertung des gesamten Proteoms von *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 bildete die Grundlage, um weitere Proteine zu identifizieren, deren Abundanzen vor allem mit dem Wildtyp-Stamm bzw. der *bcsAB2-bcsAB3*-Doppel-Deletionsmutante korrelierten. Die Auswertung basierte jeweils auf allen vier biologischen Replikaten, bei denen für eine eindeutige Aussage die Bestimmung von vier gültigen Messwerten in den Replikaten des Wildtyp-Stamms oder in denen des Doppeldeletionsstamms erforderlich waren. Außerdem ist zu beachten, dass hier, aufgrund der automatisierten Auswertung innerhalb der Analysesoftware, standardmäßig ein anderer Algorithmus zur Auswertung verwendet wurde, welcher auf den LFQ-Werten und nicht auf iBAQ-Werten basiert. Der für die Interpretation der Auswertung entscheidende Unterschied ist dabei die Tatsache, dass im LFQ-Algorithmus nur Peptide gezählt werden, bei denen in allen Replikaten die identischen Peptide detektiert werden. Im iBAQ-Algorithmus erfolgt die Auswahl dagegen weniger streng, wodurch ein Protein in mehreren Proben anhand unterschiedlicher Peptide eindeutig detektiert werden kann.

Die Ergebnisse aus Tabelle 31 zeigen, dass in *K. hansenii* ATCC 23769 das Auftreten einzelner Proteine sowohl in signifikant erhöhter Häufigkeit dem Wildtyp, als auch der Doppeldeletionsmutante zugeordnet werden konnten. Dagegen ließ sich in *K. hansenii* ATCC 53582 nur ein Protein identifizieren, welches im Wildtyp mit höherer Abundanz als in der Doppeldeletionsmutante auftrat.

Ergebnisse

Tabelle 31. Proteinnachweis eindeutig beschränkt auf den Wildtyp oder die CS-Doppeldeletionsmutante in *K. hansenii* ATCC 23769 bzw. *K. hansenii* ATCC.

	Bildung im Wildtyp höher als in Mutante	Bildung in Mutante höher als im Wildtyp
<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	WP_003619561.1 D-tagatose-bisphosphate aldolase	WP_003621572.1 SGNH/GDSL hydrolase family protein
	WP_141312762.1 carbohydrate porin	WP_040511872.1 FCD domain-containing protein
		WP_155116159.1 hypothetical protein
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	CUW47672.1 Cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	---

Bei näherer Betrachtung der Proteine lässt sich lediglich in *K. hansenii* ATCC 23769 eines der im Wildtyp und Doppeldeletionsmutante unterschiedlich exprimierten Proteine eindeutig dem bisher beschriebenen Metabolismus zur Cellulosesynthese zuordnen. Das bereits oben beschriebene Protein BcsAB2 ORF 2 (WP_003621572.1), dem die bisher nicht näher charakterisierte Funktion einer Hydrolase der SGNH/GDSL-Familie vorhergesagt ist, trat nach Doppeldeletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* signifikant stärker auf als im Wildtyp. Wird zusätzlich der dem Vergleich zugrundeliegende Algorithmus mit einbezogen, so konnten für WP_003621572.1 sowohl bei Auswertung entsprechend des LFQ-, als auch entsprechend des iBAQ-Algorithmus Abundanzen des Proteins bestimmt werden. Diese überstiegen in der Doppeldeletionsmutante jeweils deutlich die Bildung im Wildtyp. Da es sich hierbei um das Protein handelt, welches in *K. hansenii* ATCC 23769 unmittelbar nach *bcsAB2* kodiert ist, liegt nahe, dass sich die Deletion von *bcsAB2* verstärkend auf die Expression von *bcsAB2* ORF 2 ausgewirkt hat. Dagegen lässt sich bei den anderen Proteinen vermuten, dass ein Teil der genannten Proteine falsch-positive Treffer sind. Insbesondere ist dies für WP_003619561.1, WP_141312762.1, WP_040511872.1 und CUW47672.1 wahrscheinlich. Der fehlenden Identifikation durch den LFQ-Algorithmus steht der Nachweis dieser Proteine durch den iBAQ-Algorithmus entgegen, nach welchem die Proteine sowohl im Wildtyp, als auch in der Doppeldeletionsmutante eine vergleichbare Bildungsstärke aufweisen. Einzig das bisher nicht charakterisierte Protein WP_155116159.1 kann für die weitere

Ergebnisse

Charakterisierung von *K. hansenii* ATCC 23769 interessantes Protein darstellen, da die deutlich erhöhte Bildung des Proteins in der Doppeldeletionsmutante, im Vergleich zur Synthese im Wildtyp, durch beide Auswertungsalgorithmen bestätigt wurde. Um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des bisher nicht charakterisierten Proteins zu bekommen erfolgte eine BLASTp-Analyse. Aus dieser ergab sich 66% *query cover* und 90,87% *identity* mit BcsC2 aus *K. hansenii* ATCC 53582. Da sich in der Sequenz des Referenzproteoms (2.4.5; Tabelle 15) mit WP_064478823.1 bereits ein Kanalprotein BcsC2 enthalten ist und die Sequenzlänge des nicht charakterisierten Proteins mit 355 AS recht kurz ist, könnte es sich hierbei auch um ein fehlerhaft annotiertes Fragment eines anderen Proteins handeln.

3.7 Einfluss von cyclischem di-GMP auf die Motilität der Zellen

Die Synthese von Cellulose in Essigsäurebakterien wird durch den sekundären Botenstoff cyclisches di-GMP, welches von DGCs gebildet wird, reguliert (Dahlstrom and O'Toole 2017), weshalb es von Interesse war, die dafür zuständigen Gene bzw. Enzymproteine in den in dieser Arbeit untersuchten *K. hansenii* Stämmen unter die Lupe zu nehmen. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei mutmaßliche DGCs im Genom von *K. hansenii* ATCC 23769 identifiziert. Als Grundlage hierfür diente die Suche nach Proteinen mit GGDEF- und EAL-Motiven in der Genomsequenz, die nach Boyd and O'Toole (2012) bei gemeinsamem Vorkommen DGCs definieren. Auf diese Weise konnten *dgcA* und *dgcB* als entsprechende Zielgene definiert werden. Im Sequenzvergleich mit *K. hansenii* ATCC 53582 ergaben sich zu *dgcA* und *dgcB* homologe Gene, wodurch die Auswirkung von markerfreien Einzeldelationen der Gene in beiden Stämmen miteinander verglichen werden konnte. Eine Doppeldelation beider Gene konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erzeugt werden. Es wird angenommen, dass die Doppeldelation beider DGCs letale Folgen für beide Organismen hat, da cyclisches di-GMP als globaler Regulator in zahlreichen Stoffwechselwegen involviert ist. Die Auswirkung der Deletionen auf die Fähigkeit beider Stämme einen Biofilm zu bilden wurde bereits in 3.3.3 und 3.3.4 beschrieben. Als weitere wichtige Eigenschaft wird die Motilität der Zellen durch den sekundären Botenstoff gesteuert. Um ein möglichst umfassendes Bild des Regulationsmechanismus zu erhalten, wurde in diesem Kontext die Ausbreitung der Kolonien gemessen. Dazu wurden Proben von Flüssigkulturen von *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 auf Agarplatten mit reduzierter Agarkonzentration betrachtet. Durch die Reduktion der Agarkonzentration auf 0,3 % bzw. 0,5 % wird die Oberflächenfeuchtigkeit erhöht, was genutzt werden kann, um die Fähigkeit der Zellen sich schwimmend bzw. schwärmend auszubreiten zu charakterisieren. Die Messung erfolgte unter Zuhilfenahme der Maßstabsfunktion in GIMP (Open Source).

Ergebnisse

Die Ergebnisse nach markerfreier Deletion von *dgcA* bzw. *dgcB* unterschieden sich deutlich zwischen *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582. Trotz verschiedener experimenteller Ansätze konnte im Wildtyp von ATCC 23769 weder eine Schwimm-, noch eine Schwarmaktivität beobachtet werden. Die Ausbreitungsfläche der Kolonien blieb auch in Folge der Deletionen der DGCs unverändert (Abbildung 31).

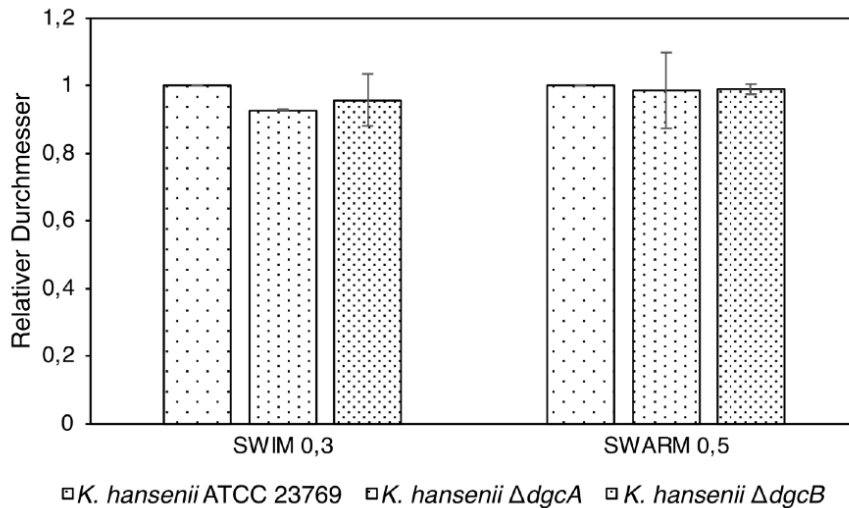


Abbildung 31. Schwimm- und Schwarmaktivität von *K. hansenii* ATCC 23769 und der erzeugten DGC-Deletionsstämme nach 12 Tagen Inkubation auf Komplexmedium mit 0,3 % (SWIM 0,3) bzw. 0,5 % (SWARM 0,5) Agarkonzentration. Der Durchmesser jeder Kolonie wurde horizontal und vertikal mit der Messfunktion von GIMP gemessen [n=2; \pm SD].

Ergebnisse

In *K. hansenii* ATCC 53582 bewirkte die Deletion der DGCs *dgcA* und *dgcB* dagegen einen deutlichen Rückgang der Ausbreitungsfläche auf der Agaroberfläche (Abbildung 32). Diese nahm auf Agarplatten mit 0,3 % (Schwimm-Assay) im Vergleich zum Wildtyp nach Deletion von *dgcA* signifikant um 35 % bzw. nach Deletion von *dgcB* um 40 % ab. Analog zeigte sich die Auswirkung auf das Schwarmverhalten der Zellen. Die Reduktion der Ausbreitungsfläche fällt in diesem Fall einerseits geringer aus, dennoch führten die Deletionen im Vergleich zum Wildtyp zu ebenfalls zu einem signifikanten Rückgang um 28 % ($\Delta dgcA$) bzw. 29 % ($\Delta dgcB$) in *K. hansenii* ATCC 53582 (Abbildung 32).

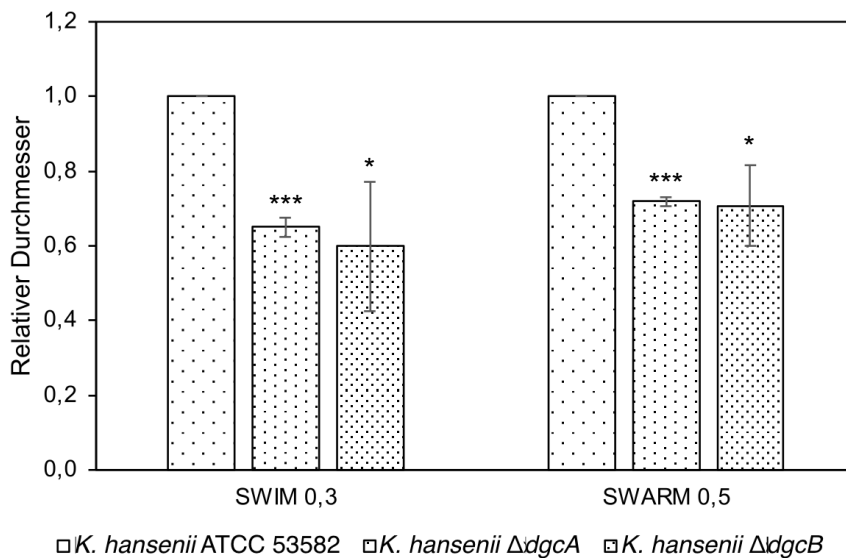


Abbildung 32. Motilität von *K. hansenii* ATCC 53582 und den DGC-Deletionsstämmen. Die Schwimmaktivität (*swim*) wurde auf Komplexmedium mit einer reduzierten Agarkonzentration von 0,3 % und einem Wachstum von 12 Tagen bewertet. Die Schwärmaktivität (*swarm*) unter gleichen Bedingungen bei 0,5 % Agar-Konzentration. Der Durchmesser jeder Kolonie wurde horizontal und vertikal mit der Messfunktion von GIMP gemessen [n=4; \pm SD].

4. Diskussion

4.1 Einführung in die Thematik

Bakterielle Cellulose ist ein erneuerbares, recyclefähiges Biomaterial welches aufgrund seiner herausragenden Eigenschaften besonders gut für zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der Biomedizin, Biotechnologie sowie in der Lebensmitteltechnologie geeignet ist. Aufgrund einer homologen Enzymatik der Cellulosesynthese in Pflanzen und Bakterien stellen *Komagataeibacter* Stämme besonders interessante Stämme für Studien zu den Grundlagen der Cellulosesynthese dar. Das Vorhandensein mehrerer CS-Gene in *K. hansenii* Stämmen wurde mit der Verfügbarkeit der vollständigen Genomsequenzen von *K. hansenii* ATCC 23769 (Iyer et al. 2010) und *K. hansenii* ATCC 53582 (Florea et al. 2016b) bestätigt. Weshalb die drei kodierten Cellulosesynthasen als Ziel für weitere Analysen ausgewählt wurden. Die Auswirkung von Deletionen der einzelnen CS-Gene wurde bereits in unterschiedlichen Cellulose-produzierenden Essigsäurebakterien untersucht. Jedoch ist die Aussagekraft bisheriger Ergebnisse dadurch begrenzt, dass sämtliche bisher verwendeten Ansätze auf Gendisruptionsexperimenten beruhten, die durch Einführen eines Transposons, einer Antibiotikaresistenz-Kassette oder Integration eines Plasmids erzeugt wurden (Deng et al. 2013; Jacek et al. 2018; Saxena and Brown 1995). All diese Geninaktivierungstechniken weisen den gemeinsamen Nachteil auf, dass es zu Verschiebungen im Leserahmen kommen kann, wodurch unbeabsichtigte polare Effekte in der Expression von nachgelagerten Genen induziert werden können und der anschließend beobachtete Phänotyp nicht zwangsläufig auf den alleinigen Beitrag des Zielgens zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, chromosomale, markerfreie Deletionen der einzelnen CS-Gene in beiden Hoch-Cellulose-Produktionsstämmen zu erzeugen. In diesen wurde anschließend der Beitrag der einzelnen Cellulosesynthasen zum komplexen Biofilmmnetzwerk näher charakterisiert. Hierzu wurde das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte und bereits in zahlreichen Gram-positiven und Gram-negativen Organismen etablierte *codBA*-Gegenselektionssystem verwendet und an die Anforderungen celluloseproduzierender Essigsäurebakterien angepasst (Huang et al. 2018; Kostner et al. 2013; Kostner et al. 2017; Surger et al. 2020). Anschließend

Diskussion

wurden die Stämme bezogen auf ihre freigesetzte Cellulosemenge physikochemisch, mikroskopisch und auf Transkriptions- sowie Proteinebene analysiert.

4.2 Bioinformatische Charakterisierung der *K. hansenii* Genome

Essigsäurebakterien sind bekannte Biofilmbildner. Insbesondere das Auftreten in Form der Essigmutter im traditionellen Herstellungsprozess von Essig aus Wein zeigt deren charakteristisches Vorkommen als Biofilm an der Grenzfläche zwischen Luft und Medium (Bourgeois and Barja 2009; Mas et al. 2014). Darüber hinaus können Essigsäurebakterien auch in den übrigen natürlichen, zuckerreichen Habitaten Biofilme bilden. Die Zusammensetzung der Biofilme von Essigsäurebakterien kann komplex sein und wird durch die Fähigkeit der jeweiligen Stämme unterschiedliche Exopolysaccharide zu synthetisieren, beeinflusst. Vertreter der Gattung *Gluconobacter* bilden z. B. Levane (Deppenmeier and Ehrenreich 2009), wohingegen bei *Acetobacter* die Synthese eines Biofilms aus Glucose und Rhamnose beschrieben wurde (Tonouchi 2016). Eine Besonderheit innerhalb der Essigsäurebakterien bilden die Vertreter des Genus *Komagataeibacter*. Diese sind in der Lage Cellulose, meist als einziges extrazelluläres Polysaccharid, zu synthetisieren (Fang and Catchmark 2015).

4.2.1 Vergleich des Gesamtgenoms

Für diese Arbeit wurden innerhalb des Genus *Komagataeibacter* die beiden Stämme *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 ausgewählt, aufgrund der Fähigkeit große Mengen kristalliner, bakterieller Cellulose synthetisieren zu können sowie der Verfügbarkeit einer vollständigen Genomsequenz. Besonders entscheidend für die Auswahl dieser Stämme war die Tatsache, dass beide Stämme einen bemerkenswerten Unterschied in der produzierten Cellulosemenge aufweisen (3.3.3; 3.3.4), auch wenn beide durch enge phylogenetische Verwandtschaft (3.1.2.1) und eine vergleichbare genetische Organisation in drei (putativen) CS-Operons gekennzeichnet sind (1.4). Innerhalb eines Stamms weisen diese Operons bzw. Gencluster nur geringe Übereinstimmungen auf Protein- sowie Nucleotidsequenzebene auf (<50 %). Dagegen zeigen die Cellulosesynthesen der jeweiligen Operons bzw. Gencluster eine hohe Homologie zwischen beiden Stämmen auf (>99,5 %). Die sehr enge Verwandtschaft beider Stämme war bereits Inhalt einer Studie von Kawano et al. (2002), in der physiologische Unterschiede zwischen beiden

Stämmen untersucht wurden. Dabei wurde festgestellt, dass einerseits *K. hansenii* ATCC 53582 innerhalb von 7 Tagen die fünffache Menge an Cellulose bildet, andererseits sich *K. hansenii* ATCC 23769 durch ein doppelt so schnelles Wachstum auszeichnet. Dies konnte durch die Beobachtungen, die während dieser Arbeit gemacht wurden, bestätigt werden und bekräftigen die Auswahl beider Stämme für eine tiefere Analyse der Cellulosesynthese in Essigsäurebakterien: Während *K. hansenii* ATCC 23769 mehr Biomasse produziert, ist *K. hansenii* ATCC 53582 ein sehr starker Celluloseproduzent.

4.2.2 ATCC 23769 und ATCC 53582 unterscheiden sich nur durch wenige AS-Austausche innerhalb der Haupt-Cellulosesynthese

Das zentrale Element des bakteriellen Cellulosesynthese-Komplexes bildet die aus zwei Untereinheiten bestehende Cellulosesynthase BcsAB (McManus et al. 2016). Bereits geringe Unterschiede, darunter der Austausch einzelner Aminosäuren, können die Funktion und Effizienz eines Proteins erheblich beeinflussen, daher ist eine genauere Analyse der für die Synthese der Cellulosefasern verantwortliche Cellulosesynthase erforderlich. In *K. hansenii* ATCC 23769 handelt es sich bei BcsAB1 um das Protein mit der UniProt-Accession number Q76KJ8, bei *K. hansenii* ATCC 53582 um das Protein P0CW87. Im direkten Vergleich wurden insbesondere die Aminosäuren verglichen, die an der Ausbildung der Substrat-Bindestelle, dem katalytischen Zentrum und der regulatorischen PilZ-Domäne beteiligt sind (Abbildung S 3). Der Vergleich der gesamten Proteinsequenz von BcsAB1 zeigt einen Unterschied an sieben Sequenzpositionen zwischen *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582. Diese sind gleichmäßig auf beide Untereinheiten (BcsA und BcsB) verteilt, wovon drei der Aminosäuresequenzunterschiede in BcsB liegen. Die Aminosäureaustausche von *K. hansenii* ATCC 23769 zu *K. hansenii* ATCC 53582 lauten wie folgt: I30T, S717L, S796A, D802N, F1048L, I1208V und A1537T. Zur besseren Vermittlung der räumlichen Lage der einzelnen Aminosäuren ist das Proteinschema von BcsAB1 aus *K. hansenii* ATCC 23769 in Abbildung 33 dargestellt.

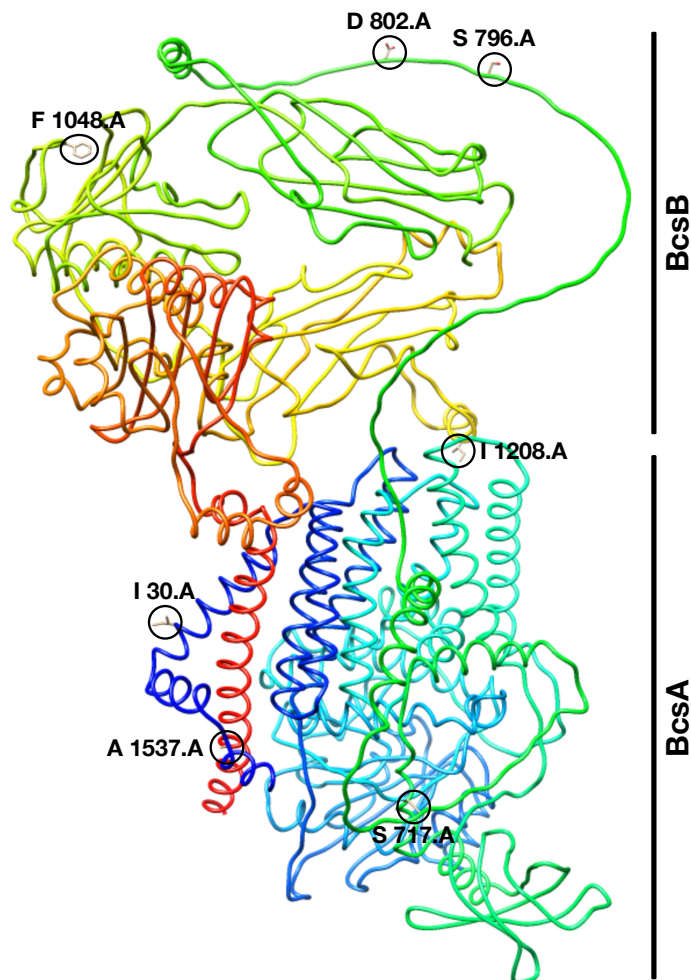


Abbildung 33. Proteinstruktur von BcsAB1 in *K. hansenii* ATCC 23769. Hervorgehoben wurden diejenigen Aminosäuren, die sich zwischen diesem Stamm und *K. hansenii* ATCC 53582 unterscheiden. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot entspricht Beginn, Mitte bzw. Ende der Proteinsequenz. Das Modell wurde aus der in dieser Arbeit verwendeten Proteinsequenz von BcsAB1 (UniProt Accession number: Q76KJ8) in der Software UCSF Chimera mittels AlphaFold (Open Source, Pettersen et al. (2004)) erzeugt.

Austausche I30T und A1537T führen jeweils zu einem Austausch einer unpolaren/hydrophoben AS zu einer polaren/hydrophilen Aminosäure. Durch D802N wird eine saure AS durch eine polare/hydrophile AS ersetzt. Gegensätzlich verhält es sich bei S717L und S796A, hier wird jeweils eine polare/hydrophile AS mit einer unpolaren/hydrophoben AS ausgetauscht. Dagegen bleiben bei F1048L und I1208V der hydrophobe Charakter der Seitenketten erhalten, allerdings ist anzumerken, dass die Seitengruppe bei F1048L im *K. hansenii* ATCC 23769 Enzym größer ist als im

Diskussion

K. hansenii ATCC 53582 Enzym. Des Weiteren wurden die Positionen der einzelnen Aminosäuren entsprechend der bei AlphaFold (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2021) hinterlegten Proteinstruktur zugeordnet und bewertet. Die einzelnen Positionen der Aminosäuren innerhalb des Modells wurden entsprechend der Zuverlässigkeit der Vorhersage von ‚sehr gering‘ bis ‚sicher‘ bewertet. Entsprechend dieser Skala liegen die meisten Aminosäureaustausche im sehr unsicheren Bereich (vier von sieben). Keine der beschriebenen Positionen ist innen liegend, was vermuten lässt, dass weder die Bindung des Substrats UDP-Glucose, noch die Bindung von cyclischem di-GMP an die PilZ-Domäne direkt beeinträchtigt wird. Ebenso liegt kein Austausch innerhalb der von den Helices gebildeten Pore vor, welche am Weitertransport der Glucankette beteiligt ist. Die beiden Aminosäureaustausche S796A und D802N befinden sich jedoch in räumlicher Nähe, innerhalb einer im Periplasma liegenden *loop*-Struktur. Bei S796A findet der Austausch einer hydrophilen zu einer hydrophoben Aminosäure statt, dagegen bei D802N der Tausch einer sauren zu einer hydrophilen Aminosäure. Diese Veränderung der Ladung könnte möglicherweise eine Auswirkung auf die Interaktion mit der wachsenden amphiphilen Cellulosefaser haben und in einer verminderten Freisetzung der Cellulosefibrillen resultieren (Medronho and Lindman 2015).

Vergleichbare Studien in Essigsäurebakterien, die sich mit der Auswirkung einzelner Aminosäureaustausche beschäftigen, gibt es kaum. Lediglich für *K. oboediens* wurde für einzelne Aminosäureaustausche innerhalb von BcsC1 ein Zusammenhang zwischen der produzierten Cellulosemenge und veränderten Aminosäuren in mehreren Revertanten hergestellt (Taweecheep et al. 2019a; Taweecheep et al. 2019b). Ein Austausch innerhalb von TPR_7 (*tetratricopeptide repeat*) führte zur Wiederherstellung der Cellulosesynthesefähigkeit bzw. konnte die Cellulosemenge im Vergleich zum ursprünglichen Wildtyp-Stamm weiter steigern. Die entsprechenden Aminosäuren befanden sich jedoch in einer innen liegenden Helix, die unmittelbar an der Ausbildung der Kanalpore beteiligt ist. Aufgrund dieser Lage kann eine Interaktion mit der wachsenden Cellulosefaser vermutet werden und folglich ist ein unmittelbarer Zusammenhang mit der Biofilmbildung naheliegend. Eine Zuordnung zu spezifischen Aminosäureaustauschen innerhalb von BcsAB wurde für Essigsäurebakterien bisher noch nicht beschrieben.

Diskussion

Ein Vergleich zu anderen Cellulose-bildenden Bakterien wie *Pseudomonas*, *Agrobacterium radiobacter* (syn. *A. tumefaciens*) oder *E. coli* ergab ebenfalls keine Zuordnung einzelner Aminosäureaustausche zur Menge an synthetisierter Cellulose. Die Mehrzahl der bisherigen Studien befasste sich auch in diesen Stämmen mit der gesamten Cellulosesynthese z. B. durch Transposon-Mutagenese (Matthysse et al. 1995; Spiers et al. 2003; Weiss-Muszkat et al. 2010). Dagegen fokussierte sich die Analyse des CS-Komplexes (CesA) in Pflanzen stärker auf die Auswirkungen von Aminosäureaustauschen auf die Synthese von Cellulose, als dies bei der Synthese bakterieller Cellulose der Fall war. Diese bezogen sich jedoch hauptsächlich auf Aminosäuren, die in den katalytischen Regionen des CS-Komplexes oder anderen konservierten Regionen liegen (Daras et al. 2021).

So bleibt weiterhin ungeklärt, ob bereits aus den geringen Unterschieden innerhalb der Aminosäuresequenz von BcsAB1 in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 Rückschlüsse auf die unterschiedliche Menge an synthetisierter Cellulose gezogen werden können. Tiefgreifendere Einblicke könnten hier durch die Sequenzierung von spontan auftretenden Mutanten im Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 erhalten werden, welche sich durch einen veränderten Umfang der Celluloseproduktion auszeichnen.

4.3 Charakterisierung der Celluloseproduktion

4.3.1 Auswahl geeigneter Methoden zur Charakterisierung bakterieller Cellulose

Die von beiden *K. hansenii* Stämmen synthetisierte Cellulose unterscheidet sich phänotypisch lediglich in ihrer charakteristischen Menge, die für *K. hansenii* ATCC 53582 deutlich über der von *K. hansenii* ATCC 23769 liegt (3.3.1). Daher war es erforderlich, geeignete Methoden zu validieren, um die einzelnen Biofilme zuverlässig und reproduzierbar zu charakterisieren. Außerdem war es wichtig, diese Methoden ebenfalls zur Charakterisierung der Cellulosebildungsmutanten einsetzen zu können. Diese Mutanten wurden durch markerfreie Deletion so erstellt, dass einerseits durch alleinige Expression der Beitrag jeder einzelnen der drei kodierten CS-Gene bestimmt werden konnte, andererseits sämtliche Kombinationen entstanden, um die gemeinsame Wirkung von jeweils zwei Cellulosesynthasen zu charakterisieren. Dazu wurden die Methoden so gewählt, dass diese sich ergänzen, um eine möglichst vollständige und vielfältige Charakterisierung der Biofilme zu ermöglichen. Die Suche nach Methoden fokussierte sich zunächst auf eine Literaturrecherche, um diejenigen Methoden auszuwählen, die zur Charakterisierung von bakterieller Cellulose üblich sind. Hierunter fallen neben der Quantifizierung die Messung der Wasser-Bindekapazität, FTIR, XRD und die Bestimmung Mechanischer Eigenschaften. Diese wurden erweitert durch eine räumliche Auflösung mit Hilfe von REM und Fluoreszenzmikroskopie sowie einer Charakterisierung der Genexpression und der gebildeten Proteinmengen mittels RT-qPCR bzw. Proteomik-Analyse (Feng et al. 2015; Hernández-Arriaga et al. 2019; Mohite and Patil 2014).

4.3.2 Phänotypischer Vergleich – *bcsAB1* in beiden Stämmen nötig zur Synthese kristalliner Cellulose

Frühere Studien konzentrierten sich auf die Cellulosesyntheserate von Essigsäurebakterien lediglich im Hinblick auf die Optimierung von Kohlenstoffquellen und Kultivierungsbedingungen (Augimeri and Strap 2015; Bae et al. 2004; Keshk and Sameshima 2006; Park et al. 2003), wodurch Erträge von bis zu 60 g/L Cellulose für *K. hansenii* ATCC 53582 erzielt wurden (Jozala et al. 2015). Die hier vorliegende Arbeit konzentrierte sich dagegen auf die grundlegende Genetik der Cellulosesynthese und weniger auf die Optimierung der produzierten Gesamtmenge. Daher war es ausreichend, die Standardbedingungen der Kultivierung zu verwenden, bei welcher Glucose als Kohlenstoffquelle dient, wie es erstmals von Hestrin and Schramm (1954) beschrieben wurde.

Der phänotypische Eindruck der gebildeten Cellulosebiofilme unterscheidet sich je nach Stamm und Deletionsmutante deutlich in Bezug auf die entstandene Dicke und den für die Synthese erforderlichen Zeitraum (3.3.1). In *K. hansenii* ATCC 23769 kann bei Kultivierung in HS-Medium bei 25 °C der Beginn der Bildung des Pellicels nach etwa 5 – 7 Tagen beobachtet werden. Das Schließen des Biofilms und vollständige Bedecken der Luft-Medium-Grenze konnte im Regelfall nach etwa 14 Tagen beobachtet werden. Aus diesem Grund und angesichts der Tatsache, dass vergleichsweise dünne Biofilme entstehen, wurde die Inkubationszeit auf 21 Tagen verlängert. Die verlängerte Inkubationszeit wurde ebenfalls gewählt, um auszuschließen, dass die Cellulosesynthese bei alleiniger Expression von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* im Vergleich zum Wildtyp nur verlangsamt stattfindet.

Deutlich anders verhält es sich im Gegensatz dazu bei der Biofilmbildung in *K. hansenii* ATCC 53582. Unter identischen Kultivierungsbedingungen ist die Synthese von Cellulose innerhalb weniger Tage zu beobachten, z. T. findet diese bereits über Nacht statt. Aus diesem Grund konnte die Inkubationszeit für *K. hansenii* ATCC 53582 auf 6 Tage verkürzt werden. Bei alleiniger Expression von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* in entsprechenden Mutanten dieses Stamms bewirkte auch eine Verlängerung auf 21 Tage keine Biofilmbildung.

Diskussion

Darüber hinaus zeigt der Vergleich beider Stämme, dass jeweils lediglich der Stamm, der *bcsAB1* (bei gleichzeitigem Fehlen von *bcsAB2* und *bcsAB3*) exprimiert, in der Lage ist, einen festen, elastischen Biofilm an der Mediumsoberfläche zu bilden (Abbildung 11; Abbildung 12). Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den bereits in der Literatur für andere Stämme beschriebenen Ergebnissen, bei denen die Inaktivierung der Cellulosesynthese mittels Transposonmutagenese, Plasmidinsertion oder Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette erfolgte (Deng et al. 2013; Jacek et al. 2018; Saxena and Brown 1995; Saxena et al. 1994).

Obwohl *bcsAB2* bereits von Saxena and Brown (1995) in *Acetobacter xylinum* AY201 identifiziert wurde, fehlt in sämtlichen bisherigen Studien eine nähere Beschäftigung mit den bei *Komagataeibacter* zusätzlich kodierten CS-Genen *bcsAB2* und *bcsAB3*. Wie oben gezeigt unterscheiden sich beide Stämme trotz der hohen Homologie der Proteinsequenz (>99,5 %) im phänotypischen Erscheinungsbild deutlich. Für *K. hansenii* ATCC 23769 lässt sich sowohl bei alleiniger Expression von *bcsAB2* als auch von *bcsAB3* die Synthese eines mutmaßlich amorphen, nicht-fibrillären EPS (nfEPS) nachweisen. Dagegen weisen unbewegte, statische Kulturen von *K. hansenii* ATCC 53582 unter identischen Kultivierungsbedingungen bei alleiniger Expression von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* keine EPS-Bildung an der Oberfläche des Kulturmediums auf.

Der Vergleich der Zellmorphologie nach Deletion der CS- und DGC-Gene zeigte keine Auswirkung auf die Zellform beider Stämme. Die vorherrschende Form bildete weiterhin gerade Stäbchen, welche zum Teil paarweise zusammengelagert oder als verlängerte Zellen vorliegen können. Hieraus kann geschlossen werden, dass die erzeugten Mutationen keine Veränderung der Zellwand-Synthese bzw. der Peptidoglykanbildung bewirken. Anders wurde es von Deng et al. (2015) für Cellulose-negative Stämme von *K. hansenii* ATCC 23769 beschrieben. Diese waren aufgrund von Mutationen in der Peptidoglykan-Synthese nicht in der Lage hoch-kristalline Cellulosefasern auszubilden.

4.3.3 Entwicklung angepasster Quantifizierungstechniken

Die Auswahl der für die Quantifizierung der Biofilm verwendeten Methoden richtete sich nach der freigesetzten Menge an Cellulose. Da für die Einzeldominanzstämme der zusätzlichen CS-Gene in *K. hansenii* ATCC 23769 auch nach Hochskalierung des Kultivierungsmaßstabs keine für eine gravimetrische Messung ausreichend große Trockenmasse erreicht werden konnte, wurde ein kolorimetrischer Ansatz zur Quantifizierung gewählt. Auf persönliche Empfehlung von Ajeet Chaudhary (Entwicklungsbiologie der Pflanzen, TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) wurde ein für *Arabidopsis thaliana* verwendetes Protokoll (Kumar and Turner 2015b; Trevelyan et al. 1952) an die Bedürfnisse von BC angepasst. Als kritischer Punkt für ein erfolgreiches Prozedere wurde hierbei die saure Hydrolyse der Cellulose nach Saeman (1945) identifiziert. In diesem Schritt war es entscheidend, ein vollständiges Schwellen der Cellulose sicherzustellen. Dies wurde durch eine Verlängerung der Inkubationszeit (60 min, RT) und gleichzeitiges, regelmäßiges und sorgfältiges Mischen erreicht. Im Anthron-Assay wurde anschließend die Veränderung der Absorption bei 620 nm gemessen, die aufgrund der Komplexbildung zwischen 5-Hydroxymethylfurfural und Anthron entsteht (Färbung von gelb nach blau-grün) (3.3.3). Aufgrund der Quantifizierung konnte festgestellt werden, dass bei Fehlen von *bcsAB1* lediglich 11,3 % der Cellulosemenge des Wildtyps gebildet wird. Dies kann zum Teil als Hintergrundsignal des Assays gesehen werden, da eine vergleichbar geringe Menge ebenfalls bei Quantifizierung des *bcsAB1*-, *bcsAB2*- und *bcsAB3*-Multi-Deletionsstamm gemessen wurde. Zum anderen bildete dieser Stamm nach 21 Tagen nicht näher charakterisierte EPS-Fragmente an der Mediumsoberfläche, die ebenfalls zur Komplexbildung mit Anthron führen könnten und möglicherweise im Anthron-Assay gemessen wurden. Die hohe Standardabweichung, die für die Cellulosemenge von *K. hansenii* ATCC 23769 bestimmt wurde, kann durch zahlreiche Faktoren beeinflusst worden sein. Neben dem experimentellen Prozedere der Analyse, limitiert der Umstand, dass dieser Stamm besonders häufig zu spontanen Cellulose-negativen Mutationen neigt, ein reproduzierbares, gleichmäßiges Wachstum des Biofilms während der Kultivierung ohne Bewegung (Hestrin and Schramm 1954; Nguyen et al. 2010).

Diskussion

Die Quantifizierung der Trockenmasse im Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 konnte aufgrund der großen Menge an Cellulose mittels einer Feinwaage durchgeführt werden (3.3.4). Dies bestätigte den phänotypischen Eindruck, dass bei Anwesenheit von BcsAB1, unabhängig von der Expression der daneben vorhandenen CS-Gene, jeweils eine vergleichbar große Menge an Cellulose gebildet wurde. Die Deletion von *bcsY*, einem weiteren Element des zweiten CS-Gen-Locus, hatte ebenfalls keine signifikante Verringerung der Cellulosemenge zur Folge. Aufgrund der Tatsache, dass lediglich bei Expression von *bcsAB1* ein Biofilm gebildet wurde und kein weiteres EPS der Expression von *bcsAB2* und *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCC 53582 zugeordnet werden konnte, kann die kristalline Eigenschaft der BC bestätigt und die große Wichtigkeit zur Cellulosesynthese hervorgehoben werden. Für eine weitere Charakterisierung des Beitrags der zusätzlichen CS-Gene schloss sich die Darstellung des Cellulosenetzwerks im Rasterelektronenmikroskop an.

4.4 Synthese zusätzlicher nicht-fibrillärer Exopolysaccharide in *Komagataeibacter hansenii*

4.4.1 Räumliche Auflösung des Cellulosebiofilms zur Identifikation zusätzlicher Polysaccharide (nfEPS) in *K. hansenii* ATCC 23769

Aufgrund der nach unbewegter, statischer Kultivierung der *bcsAB2-/bcsAB3*-Einzelexpressionstämme von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten weiteren, offensichtlich andersartigen, vermutlich nicht-kristallinen Celluloseformen an der Oberfläche der Kulturflüssigkeit, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Beitrag dieser EPS zur Gestaltung des Cellulosenetzwerkes darzustellen. Hierzu diente im ersten Schritt die räumliche Darstellung der Cellulose im Rasterelektronenmikroskop, im weiteren Verlauf wurde die Identifikation des Polymers angestrebt.

Grundsätzlich können die Auswirkungen von Mutationen wie auch von Mediumoptimierungen auf die Biofilmstruktur mit einem für die Elektronenmikroskopie standardmäßig verwendeten Protokoll räumlich dargestellt werden. Dazu werden Zellen mittels NaOH-Behandlung entfernt, Aceton als Lösungsmittel zur Dehydratisierung der BC verwendet und die Proben gefriergetrocknet (Deng et al. 2015; Fang and Catchmark 2014; Jozala et al. 2015) (sowie persönliche Kommunikation Gerhard Wanner und Andreas Klingl, LMU München, Martinsried, Deutschland). Unterschiedliche Behandlungen des Biofilms vor Gefriertrocknung zeigten bereits bei Hu and M Catchmark (2009) eine Veränderung der Netzwerk-Dichte im REM. Ebenso zeigten die REM-Aufnahmen eines nicht näher definierten *A. xylinum* Stamms von Gea et al. (2011) nach Behandlung über Nacht mit 2,5 % NaOH, gefolgt von einer Inkubation in Natriumhypochlorid (NaOCl) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine deutliche Abnahme von Nicht-Cellulose-Elementen des Biofilms, bei gleichzeitigem Bewahren der Cellulose I Konformation.

Die Veränderung des Cellulosenetzwerkes zeigte sich auch in dieser Arbeit. Die Proben von *K. hansenii* ATCC 23769 waren anfangs kurz (5 – 10 min) und anschließend länger (während der aufsteigenden Dehydratisierung und Lagerung) in Kontakt mit Aceton. Infolge der Zunahme der Inkubationsdauer in Aceton wurde ein erkennbares Auflösen der zusätzlichen EPS-Elemente sowie des Faserdurchmessers im Wildtyp

Diskussion

beobachtet, konnte aber aufgrund von technischen Einschränkungen nicht quantifiziert werden (Abbildung 19 → Abbildung 18 → Abbildung 22). Aufgrund dieses „Verschwindens“ der zusätzlichen EPS wird vermutet, dass die von BcsAB2 und BcsAB3 gebildeten, und in dieser Arbeit als nfEPS bezeichneten Substanzen nicht acetonbeständig sind. Dementsprechend wurde das Protokoll auf EtOH als Lösungsmittel zur Entwässerung umgestellt. Auf die Fixierung der Biofilm-Proben in Glutardialdehyd wurde verzichtet, da dadurch zwar einerseits im direkten Vergleich der Proben eine bessere Darstellung der im Biofilm eingebetteten Zellen erreicht wurde, andererseits jedoch die Auflösung des Cellulose-Netzwerks, insbesondere in Bezug auf die Tiefenschärfe der Fasern, abnahm (Abbildung 21). Stattdessen wurden die Proben über Nacht in 1x PBS gelagert, um Mediumsbestandteile sowie Zelltrümmer zu entfernen. Die Trocknung der Biofilme erfolgte statt durch Gefriertrocknung durch Lufttrocknung, da so vollständig auf den Einsatz von Aceton verzichtet werden konnte. Der Vergleich mit REM-Aufnahmen von bakterieller Cellulose aus anderen Arbeiten bestätigt die in dieser Arbeit genannten Beobachtungen, da die bisher gezeigten Aufnahmen nach Behandlung mit Aceton ebenfalls deutlich dünnere Fasern mit großen Zwischenräumen aufwiesen (Czaja et al. 2004; Fang and Catchmark 2015; Jacek et al. 2021). In diesen Arbeiten erfolgte zwar keine Gegenüberstellung mit einer Behandlung ohne Aceton, dennoch weisen die Aufnahmen einen reduzierten Faserdurchmesser und das Fehlen von vernetzenden EPS auf. Merkmale, die in der hier vorliegenden Arbeit nur nach Behandlung mit Aceton, nicht aber nach Behandlung mit EtOH beobachtet werden konnten. Aus diesem Grund ist zur besseren Darstellung eines nativen BC-Biofilms ein schonendes Protokoll zur Probenvorbereitung zu empfehlen, um den möglichen Beitrag von nicht-lösungsmittelbeständigen Polysacchariden zu bewahren.

Die von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildete Cellulose entspricht bei Vorhandensein von *bcsAB1* dem bekannten Erscheinungsbild bakterieller Cellulosefasern. Dagegen wurde in dieser Arbeit für die weiteren, offensichtlich andersartigen, vermutlich nicht-kristallinen Celluloseformen an der Oberfläche, die bei alleinigem Vorhandensein eines der zusätzlichen Cellulosesynthase-Gene (und gleichzeitiger Abwesenheit von *bcsAB1*) zu beobachten ist, die Bezeichnung eines nicht-fibrillären EPS (nfEPS) neu eingeführt. Der Stamm *K. hansenii* $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$, der *bcsAB2* als einziges

Diskussion

intaktes Cellulosesynthase-Gen trägt, produziert keine kristallinen Fibrillen, sondern ein erkennbar amorphes nfEPS, welches die einzelnen Zellen bedeckt und miteinander vernetzt (Abbildung 22). Dieses nfEPS kann auch in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme des Wildtyp-Biofilms identifiziert werden, wo es offenbar die zwischen den Cellulosefasern befindlichen Zellen und Zwischenräume bedeckt. Zur eindeutigen Abgrenzung ist festzustellen, dass ein solches nfEPS bei alleiniger Expression von *bcsAB1* oder *bcsAB3* nicht zu sehen ist.

Der Stamm *K. hansenii* ATCC 23769 $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$ bildet, bei alleiniger Expression von *bcsAB3*, einen deutlich abgrenzbaren, eigenen Typ von nfEPS (Abbildung 22). Dieses nfEPS unterscheidet sich deutlich von dem, welches von dem durch *bcsAB2* kodierten Enzym synthetisiert wird, indem dieses nfEPS jede einzelne Zelle als kapselartige Struktur zu bedecken scheint, dagegen der Zwischenraum zwischen den Zellen frei bleibt.

Im Cellulosenetzwerk, das von *K. hansenii* ATCC 23769 WT gebildet wird, lassen sich alle drei Polymere eindeutig erkennen, wodurch die von BcsAB2 und BcsAB3 gebildeten nfEPS einen kumulativen Effekt im Biofilmmnetzwerk entfalten können. Es wird vermutet, dass durch die zusätzlichen nfEPS der hohe Wassergehalt des gesamten Biofilms gesteuert wird (Gullo et al. 2017). Dies resultiert im weiteren darin, dass durch das enge Einschließen der Zellen, wie auch durch das vernetzende Einbetten der Zellen in einen Biofilm, eine verstärkte Schutzfunktion erreicht wird, die die Zellen im natürlichen, aeroben Lebensraum (Essigmutter) vor Umwelteinflüssen, insbesondere vor Austrocknung und Strahlung schützt (Kerstens et al. 2006). Andererseits können die für *K. hansenii* ATCC 23769 beschriebenen Modifikationen sich durch weitere, bisher noch unbekannte Effekte auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Biofilms auswirken. Diese beobachteten nfEPS wiesen dennoch im REM keine Ähnlichkeit zu natürlichen Cellulosefasern vom Typ I und Typ II auf (Klemm et al. 2005), weshalb eine weitere Analyse der chemischen Zusammensetzung des Biofilms mittels FTIR und XRD erforderlich war.

Da bisher sowohl in *Komagataeibacter*, als auch in anderen *Acetobacteraceae* keine vergleichbaren Polymere beschrieben wurden, müssen zum Vergleich der Substanzen die Produkte aus anderen Familien herangezogen werden. Besonders

Diskussion

deutlich konnte für *E. coli* die Abhängigkeit der Synthese von schützenden, aus stark aggregiertem Protein bestehenden *curli*-Fasern von der aktuellen Nährstoffversorgung der Zellen gezeigt werden. Entsprechend der Lage in den unterschiedlichen Zonen einer Makrokolonie weisen die einzelnen Zellen die Morphologie wachsender Zellen auf, charakterisiert durch Flagellen (enger Kontakt zum Substrat) oder stationärer Zellen, die durch die Synthese von *curli*-Fasern gekennzeichnet sind (Serra et al. 2013b). Darüber hinaus konnte eine unterschiedliche Verteilung der entsprechenden *curli*- und Cellulose-Elemente in hochauflösenden REM-Aufnahmen einzelner *E. coli* Kolonien beobachtet werden. Diese zeigen wiederum einen Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Lage und Orientierung entsprechend der Substrat-Versorgung innerhalb der Makrokolonie (Serra et al. 2013a). Die Synthese chemisch modifizierter Cellulose-Fasern wurde außerdem auch in *E. coli* von Thongsomboon et al. (2018) beschrieben. Die in *E. coli*, anders als in *K. hansenii*, zusätzlich vorhandenen Elemente des CS-Operons, *bcsEFG*, führen zur natürlichen Modifikation der gebildeten Cellulose-Fasern mittels pEtN-Transferase im Periplasma, wodurch Phosphoethanolamin-Cellulose freigesetzt wird. Überdies sind *Salmonella* Spezies beschrieben, die ebenfalls das *bcsEFG*-Operon exprimieren und natürlicherweise modifizierte Cellulose bilden können (Thongsomboon et al. 2018). Zu den in *Enterobacteriaceae* beschriebenen Genen gibt es jedoch keine Homologe in *Komagataeibacter*.

4.4.2 BcsAB2 und BcsAB3 wirken modulierend auf die von BcsAB1 gebildeten Cellulosefasern in *K. hansenii* ATCC 53582

Im Vergleich zu *K. hansenii* ATCC 23769 zeigten sich bei *K. hansenii* ATCC 53583 auch im Rasterelektronenmikroskop deutliche Unterschiede (Abbildung 23). Nach unbewegter, statischer Kultur und nach Quantifizierung der Cellulose beim Wildtyp-Stamm und den *bcsAB*-Deletionsmutanten konnte für diesen Stamm kein erkennbarer Beitrag der zusätzlichen CS-Gene beobachtet werden. Bezogen auf den Vergleich mit *K. hansenii* ATCC 23769, in dem nfEPS deutlich erkennbar sind, bestätigte sich dieser Eindruck bei der Analyse mit REM. Anders als zuvor in *K. hansenii* ATCC 23769 beobachtet, konnten im Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 keine Strukturen erkannt werden, die sich vergleichbaren nfEPS zuordnen ließen. Einzig direkt erkennbar bleibt die Synthese kristalliner Cellulosefasern bei Bildung von BcsAB1. Dennoch wird ein noch nicht beschriebener Unterschied in der Zusammenlagerung der Fasern deutlich, der eindeutig auf eine Abhängigkeit von der Expression der zusätzlichen CS-Gene zurückzuführen ist. Diese Beobachtung lässt auf einen modifizierenden Beitrag der beiden zusätzlichen Cellulosesynthasen BcsAB2 und BcsAB3 schließen, auch wenn dieser nicht auf die Synthese visuell erkennbarer EPS zurückzuführen ist. Der modulierende Effekt zeigt sich in der REM-Aufnahme durch eine Variation der Dicke der einzelnen Cellulosefasern, welche auf die Expression der zusätzlichen CS-Gene zurückgeführt werden kann. Die von BcsAB2 und BcsAB3 gebildete Substanz kann möglicherweise vollständig von den von BcsAB1 gebildeten Cellulosefasern aufgesaugt werden, wodurch dieser Substanz der Effekt eines ‚Bindemittels‘ zuschreibbar ist. Diese Modifikationen könnten sich im weiteren Verlauf auf die mechanischen Eigenschaften der Cellulose auswirken und möglicherweise auch die Gleitfähigkeit der einzelnen Fasern zueinander modulieren. Bis zu einer genauen Identifizierung der gebildeten Substanz bleibt es unklar, ob dieser Effekt tatsächlich auf ein zusätzlich synthetisiertes EPS oder auf eine eingefügte chemische Modifikation der Cellulosefasern zurückgeht.

Im Vergleich zum Durchmesser der Cellulosefasern des Wildtyps des Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 wiesen die Fasern nach Deletion von

bcsAB2 und *bcsAB3* sowie *bcsY* im REM einen signifikant geringeren Durchmesser auf. Anhand dieser beobachteten Verringerung entwickelte sich die Hypothese, dass diese nfEPS in *K. hansenii* ATCC 53582 sich verknüpfend zwischen den einzelnen Cellulosefasern einlagern und so deren Durchmesser erhöhen können. Zur Illustration wurde das in Abbildung 34 gezeigte Schema entworfen, welches anschaulich die komplexe Zusammenlagerung der von BcsAB1 gebildeten Cellulosefasern und der von BcsAB2 sowie von BcsAB3 freigesetzten nfEPS zeigt.

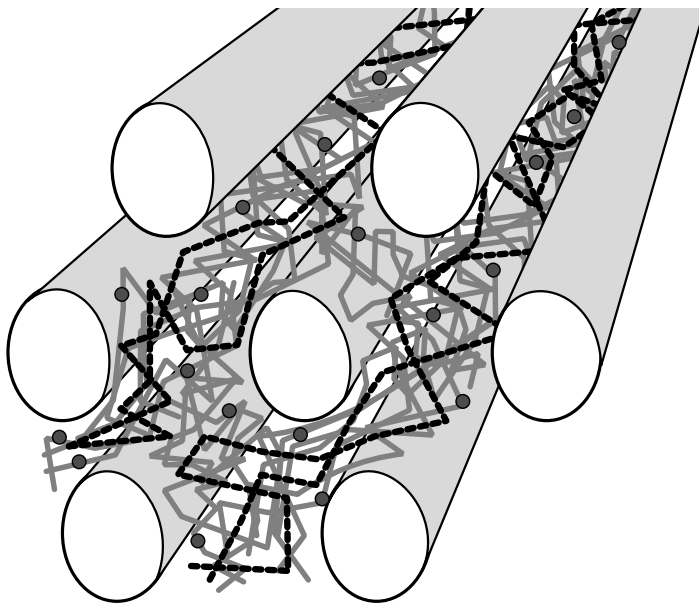


Abbildung 34. Schema der möglichen Zusammenlagerung der Cellulosefasern in *K. hansenii* ATCC 53582. Hellgraue Röhren = Cellulosefasern (Produkt BcsAB1), graue Linien = nfEPS Produkt BcsAB2, graue Punkte = putative Modifikationen durch BcsY am Produkt von BcsAB2, gestrichelte schwarze Linie = nfEPS Produkt BcsAB3. Das Verhältnis von grauen zu schwarzen, gestrichelten Linien spiegelt den angenommenen, reduzierten Anteil an BcsAB3-Produkten gegenüber BcsAB2-Produkten wider. (Bimmer et al. 2023)

Daraus leitet sich für diese Arbeit die Hypothese ab, dass die in *Komagataeibacter hansenii* beschriebenen nfEPS eine funktionelle Ähnlichkeit zur Funktion von Hemicellulosen in pflanzlicher Lignocellulose besitzen könnten. Während in Pflanzen Hemicellulosen die Zusammenlagerung von Cellulosefasern zur Bildung der Zellwand regulieren (Atalla et al. 1993; Scheller and Ulvskov 2010), scheinen die Effekte, die auf die Produkte von BcsAB2 und BcsAB3 zurückzuführen sind, bakterielle Cellulose in analoger Weise zu modifizieren – was wohl die Porosität des Fasernetzwerks

Diskussion

verändert und folglich die Wasserbindekapazität der bakteriellen Cellulose sowie deren Festigkeit beeinflusst.

Im Gegensatz zur hier für den Hochproduzenten gezeigten Annahme wird vermutet, dass die Menge an freigesetzten nfEPS in *K. hansenii* ATCC 23769 im Verhältnis zur Menge an gebildeten kristallinen Cellulosefasern größer ist, so dass diese nfEPS nicht nur die einzelnen Fasern verknüpfen, sondern auch aus den Zwischenräumen heraustreten und so an der Oberfläche als eindeutig erkennbares Polymer sichtbar werden.

4.4.3 Räumliche Verteilung der CS-Genexpression zeigt Lokalisation von BcsAB2 und BcsAB3 an Medium-zugewandter Seite des Biofilms in *K. hansenii* ATCC 23769

Der Nachweis unterschiedlicher Polysaccharidstrukturen in den REM-Aufnahmen der von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten Biofilme führte zur Frage nach der räumlich-zeitlichen Expression der einzelnen CS-Gene. Zur näheren Analyse wurden *in-frame* Fluoreszenzreporter-Genfusionen erstellt und die Lokalisierung der entsprechenden fluoreszierenden Fusionsproteine mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet, um den tatsächlichen Ort der Proteinbildung im Biofilm nachzuweisen. Aufgrund des Präparationsprotokolls und der Tatsache, dass Dünnschnitte des Biofilms analysiert wurden, war die Darstellung des Biofilms nur nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultivierung möglich. Der anfangs angedachte zeitliche Verlauf konnte nicht erfolgen, da die vor Tag 21 gebildeten, sehr fragilen Pellicel bei der Erstellung des Dünnschnitts nicht zuverlässig in der gewünschten Orientierung gehalten werden konnten und anfällig für die mechanische Belastung während des Schnitts waren. Folglich war die Zuordnung der Expression zur mediumszugewandten bzw. mediumsabgewandten Seite nur im stabilen Biofilm von Tag 21 möglich (Abbildung 25).

Die räumliche Verteilung der Synthese von BcsAB2 und BcsAB3 zeigt deutlich, dass die beiden zusätzlichen Cellulosesynthasen bereits im frisch gebildeten, dem Medium zugewandten Biofilm exprimiert wurden. Die Synthese von BcsAB1 fand dagegen im gesamten Biofilm statt, wobei die Intensität hin zu beiden Oberflächen zunahm. Diese Beobachtungen verstärken den Eindruck, dass die modifizierten Elemente des Cellulosebiofilms mit der Feuchtigkeitsregulation der Zellen in Zusammenhang stehen. In der mediumszugewandten Seite des Biofilms herrschen optimale Substratbedingungen vor, jedoch entfernen sich die eingeschlossenen Zellen aufgrund des Wachstums stetig von diesen. Dadurch ist die Anpassung möglicherweise bereits unter optimalen Bedingungen nötig, um Feuchtigkeit zu speichern und die Zellen vor Austrocknung in den oberen Schichten des Biofilms zu schützen. Da die zusätzlichen modifizierenden nfEPS nicht in den REM-Aufnahmen von *K. hansenii* ATCC 53582 detektiert wurden, wurde auf die Konstruktion entsprechender Reporter-Fluoreszenz-Fusionen in diesem Stamm verzichtet.

4.4.4 Physikochemische Eigenschaften Bakterieller Cellulose

4.4.4.1 Beitrag der Cellulosesynthasen zur Kristallinität

Die räumliche Darstellung des von beiden *K. hansenii* Stämmen gebildeten Cellulosenetzwerks mittels Rasterelektronenmikroskopie lieferte unterschiedliche, aber dennoch eindeutige Hinweise auf einen Beitrag der zusätzlichen CS-Gene in den untersuchten *K. hansenii* Stämmen. Diese werden in Form von nfEPS in *K. hansenii* ATCC 23769 sichtbar, oder sind Modifikationen, die sich im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 auf das Zusammenlagern der kristallinen Cellulosefasern auswirken. Auch wenn bisher keine eindeutige Identifikation der gebildeten Substanzen möglich war, können durch die Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften der Biofilme weitere Indizien zur Aufklärung ihrer Funktion(en) sammeln.

In *K. hansenii* ATCC 23769 erwies sich die Bestimmung der Kristallinität des Biofilms als schwierig. Die sehr dünnen getrockneten Biofilme befanden sich an der unteren Grenze dessen, was bei Proben mit dem genutzten Apparat vermessen werden konnte. So scheint sich die gleichzeitige Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3* in *K. hansenii* ATCC 23769 nicht auf die Kristallinität des Biofilms auszuwirken, bzw. lässt sich der Einfluss aufgrund der großen biologischen Schwankung der Proben der Doppel-Deletionsmutante nicht eindeutig klären (3.3.6.2).

Im Gegensatz hierzu wiesen Biofilmproben von *K. hansenii* ATCC 53582 signifikante Unterschiede der Kristallinität infolge der erzeugten Deletionen auf. Diese nahm sowohl nach Deletion von *bcsAB3*, nach gleichzeitiger Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3*, sowie nach Deletion von *bcsY* ab. Bei alleiniger Bildung von *BcsAB1* zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp dagegen lediglich eine geringe Reduktion der Kristallinität (3.3.6.2).

In weiteren, bisher durchgeführten Studien konnte die Reduktion der Kristallinität bakterieller Cellulose nach Transposon-Mutagenese beobachtet werden. Diese zielten allerdings nicht auf CS-Gene ab, sondern bezogen sich auf Mutation der Lysin-Decarboxylase bzw. der Alanin-Racemase (Deng et al. 2015). Die durch die Mutagenese reduzierte Kristallinität konnte in Komplementierungsexperimenten wiederhergestellt werden. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit beschriebenen CS-

Diskussion

Deletionen betrafen die beiden von Deng et al. beschriebenen Transposon-Mutationen wichtige Enzyme der Peptidoglykansynthese. Hieraus leitet sich die Vermutung ab, dass in der Arbeit von Deng et al. keine modifizierende Veränderung der Cellulosesynthese induziert wurde, sondern der Aufbau der Gram-negativen Zellwand gestört wurde, was in einer Beeinträchtigung der Extrusion der Fibrillen resultierte. Ferner zeigten Abral et al. (2021) einen Zusammenhang zwischen der bei der Trocknung vorhandenen Luftfeuchtigkeit und der Kettenstruktur der Cellulose. Hierbei korrelierte eine höhere Feuchtigkeit mit einer höheren Kristallinität der Cellulose-Proben. Da die äußeren Bedingungen während der Messungen dieser Arbeit den jahreszeitlichen Schwankungen unterlagen, können Auswirkungen durch Schwankungen der Luftfeuchtigkeit während der Messung nicht ausgeschlossen werden. Dies ist ein Punkt, der für zukünftige Experimente berücksichtigt werden sollte. Ebenso könnte in weiteren Experimenten durch Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen CS-Gene eine noch stärkere Veränderung der Kristallinität erreicht werden, wodurch wiederum der Einfluss des Störfaktors Luftfeuchtigkeit reduziert werden kann. Neben der Kristallstrukturanalyse (XRD) wurde bei Deng et al. (2015) die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR: CP-TOSS) zur Bestimmung der Kristallinität verwendet, welche eine sensitivere Auflösung der Molekülstruktur verspricht. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten geringfügigen Unterschiede innerhalb der Kristallinität der Cellulose des Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 und der von *K. hansenii* ATCC 23769 sollten zukünftige Analysen durch diese sensitivere Methode ergänzt werden. Eine sensitivere Messung ermöglicht es den Beitrag, den die niedrig abundanten zusätzlichen CS-Gene *bcsAB2* und *bcsAB3* leisten, valider zu bestimmen. Die höhere Auflösung der sensitiveren Methode ist insbesondere deshalb wichtig, da die bisher gewonnenen Daten so deutlich erweitert werden können und sich Unterschiede detektieren lassen können, die bisher im XRD nicht detektierbar waren.

Neben der Auflösung der Kristallinität kann NMR auch zum Nachweis von Nicht-Cellulose-Polysacchariden eingesetzt werden und die FTIR-Messungen ergänzen (Deng et al. 2015). In der Literatur wurde der Hochproduzent *K. hansenii* ATCC 53582, anders als *K. hansenii* ATCC 23769, bereits als Stamm beschrieben, welcher in der Lage ist weitere wasserlösliche ‚schwer zu extrahierende‘ EPS (HE-EPS) zu bilden

(Fang and Catchmark 2015). Jedoch beruhte das Protokoll zur Extraktion von HE-EPS, in den entsprechenden Experimenten, auf einer Inkubation der Cellulose in 0,1 M NaOH und Gefriertrocknung, wodurch weitere modifizierende nfEPS bereits vor der NMR-Analyse entfernt worden sein könnten (Fang and Catchmark 2014). Die Behandlung mit NaOH kann die Hydrolyse der Acetyl-Gruppen von putativem Celluloseacetat zur Folge haben und einzig anders modifizierte Cellulose zurücklassen (Feist et al. 1970; Fischer et al. 2008; Jackson 1977). Hinzu kommt, dass sich der Beitrag der einzelnen modifizierenden EPS auf die von *K. hansenii* gebildete Cellulose, wie hier gezeigt, erst bei Analyse von Einzel-Expressionsstämmen der Cellulosesynthesen verdeutlicht.

4.4.4.2 Deletion von *bcsAB2* bewirkt die Steigerung des Elastizitätsmoduls in *K. hansenii* ATCC 53582

Ebenso lässt sich anhand der Bestimmung des Elastizitätsmoduls bei dem Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 ein Zusammenhang zwischen den generierten markerfreien Deletionsstämmen und dem Vorhandensein von entsprechenden Modifikationen herstellen (3.3.6.3). Die deutliche Zunahme des Elastizitätsmoduls um im Mittel etwa 80 % nach Deletion eines der Elemente des zweiten CS-Locus zeigt deren deutlichen Beitrag zur Modifikation des Cellulose-Netzwerks. Dagegen führt die alleinige Deletion von BcsAB3 zu einer geringfügigen Abnahme des Elastizitätsmoduls im Vergleich zum Wildtyp. Dies stärkt die Annahme, dass insbesondere BcsAB2, und die in dessen Nachbarschaft kodierten Proteine, einen großen Einfluss auf die Modifikation des Cellulosenetzwerks in *K. hansenii* ATCC 53582 haben. Zusammen mit den Folgerungen aus den REM-Aufnahmen kann ein Zusammenwirken der drei Cellulosesynthesen zur Gestaltung und Anpassung des Biofilms angenommen werden (4.4.2). Der reduzierte Abstand der Fibrillen und die reduzierte Dicke der Cellulosefasern scheint die Interaktion der Fibrillen untereinander zu erhöhen, wodurch die mechanische Stabilität des gesamten Netzwerks deutlich steigt. Bei den von BcsAB2 und BcsAB3 gebildeten Substanzen könnte es sich folglich um eine Art ‚Kleister‘ handeln, der eine Wirkung auf die von BcsAB1 gebildeten Cellulosefasern entfaltet.

Aufgrund der bereits angesprochenen großen Variabilität in der Fähigkeit von *K. hansenii* ATCC 23769 Cellulosebiofilme auszubilden, lassen die Ergebnisse zu diesem Stamm keinen eindeutigen Rückschluss auf einen Beitrag der zusätzlichen CS-Gene zur mechanischen Stabilität dieses Biofilms zu.

4.4.5 Celluloseacetat als natürlich vorkommendes, mögliches Cellulosederivat in *K. hansenii* ATCC 23769

Biofilme, die von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildet werden, zeichnen sich durch ein komplexes Netzwerk aus Cellulosefibrillen und vernetzenden nEPS-Elementen aus. Die Beobachtung, dass die Biofilme entsprechend der verwendeten, unterschiedlichen Protokolle zur Vorbereitung der REM-Proben keine Aceton-Beständigkeit der Nicht-Faser-Elemente aufweisen, deutet an, dass es sich bei dieser Substanz um Celluloseacetat handeln könnte. Die Analyse des Biofilms des Wildtyps mittels FTIR lieferte hierfür allerdings keine Bestätigung, da in den gemessenen Spektren keine Hinweise auf Acetylgruppen gefunden werden konnten. Eine Messung war bei alleiniger Synthese von BcsAB2 bzw. von BcsAB3 aufgrund der amorphen Beschaffenheit des Polymers mit der verwendeten Apparatur nicht möglich. Möglicherweise geht das fehlende Signal auf einen sehr geringen Acetylierungsgrad der Cellulose zurück, welcher unterhalb des Detektionslimits des FTIRs liegt. Eine Abhängigkeit der Messung vom Substituierungsgrad der Cellulose wurde bereits für die Messung von künstlich acetylierter Cellulose gezeigt. In diesem Ansatz wiesen Proben mit einem niedrigen Substituierungsgrad ($DS < 0,1$) keine im FTIR detektierbaren Signale auf (Kim et al. 2002).

Für eine weitere Analyse bezüglich des Vorhandenseins von Celluloseacetat wurde eine Messung in Zusammenarbeit mit Broder Rühmann (Lehrstuhl Chemie Biogener Rohstoffe, TUM Campus Straubing) durchgeführt. Das zellfreie und in 250 mM H_2SO_4 hydrolysierte Polymer wurde mittels HPLC und einer Rezex ROA- H^+ -Säule aufgetrennt. Die Lage der Peaks wurde für Proben des Wildtyp-Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 mit einem kommerziellen Celluloseacetat-Standard verglichen. Die Messungen mittels UV-Detektor und RI-Detektor wiesen für eine von drei biologisch unabhängigen Proben ein Schulter-signal im Bereich der Essigsäure

Diskussion

auf. Da aber weitere Peaks detektiert werden konnten, ist keine endgültige Aussage zur An- bzw. Abwesenheit von Celluloseacetat möglich (Abbildung S 5; Abbildung S 6). Dieses schwache Signal lässt weiterhin vermuten, dass es sich, falls vorhanden, um Celluloseacetat mit einem geringen Acetylierungsgrad handelt, welches sich in diesem Fall nicht ausreichend sicher mittels der verwendeten HPLC-Methode nachweisen lässt.

Als weitere Nachweismöglichkeit für Celluloseacetat wurde der enzymatische Nachweis der Essigsäure gewählt. Hierzu wurden Biofilmproben mit der Esterase *AxeA* (Drzewiecki et al. 2010) bis zu 24 h bei 55 °C inkubiert und der Überstand im Kit ‚Acetic acid, UV method‘ der Firma NZYTech (#AK00081; Lissabon, Portugal) gemessen. Das Prinzip des Nachweises beruht auf einer kombinierten Umsetzung von Acetat mittels Acetyl-CoA-Synthetase, Citrat-Synthase und L-Malat-Dehydrogenase zu NADH, welches aufgrund einer veränderten Absorption bei 340 nm detektiert werden kann. Allerdings ist festzustellen, dass auf diese Weise der Nachweis von Acetat für die Biofilmproben ebenfalls nicht möglich war. Es gelang lediglich der Nachweis der Essigsäure in kommerziell erworbenem Celluloseacetat. Die im Herstellerprotokoll beschriebene Detektionsgrenze liegt bei 0,14 mg/L Essigsäure. Eine alkalische Hydrolyse (Feist et al. 1970; Jackson 1977) zeigte ebenfalls nur für den Celluloseacetat-Standard ein positives Ergebnis, dagegen ließ sich wiederum kein Hinweis auf Essigsäure nach Hydrolyse des Biofilms von *K. hansenii* ATCC 23769 finden. Ebenfalls brachte der enzymatische Verdau bakterieller Cellulose mit einer kommerziellen Cellulase 9D aus *Ruminococcus flavefaciens* (NZYTech, Lissabon, Portugal), einer kommerziellen Cellobiohydrolase 48A aus *Clostridium cellulolyticum* (NZYTech, Lissabon, Portugal) sowie einer Cellulase CelK aus der Sammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie (TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) keine Ergebnisse, die bezüglich des Vorhandenseins von Celluloseacetat verwertbar waren. Im Vergleich zu den am Lehrstuhl üblicherweise genutzten Standard-Substraten (Barley- β -Glucan, Carboxymethylcellulose, Phosphoric Acid Swollen Cellulose, Mikrokristalline Cellulose - Avicel) konnte auf bakterieller Cellulose keine hydrolytische Aktivität der Enzyme gemessen werden.

Diskussion

Eine sensitivere Auflösung bieten dagegen Messungen mittels NMR. Hierzu wurde die Biofilmprobe in Tetrahydrofuran (THF) hydrolysiert und zur Messung an Oliver Frank (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, TUM School of Life Sciences, Freising, Deutschland) weitergegeben. Die hier durchgeführte Messung zeigte leider ebenso keinen eindeutigen Hinweis auf das Vorhandensein von Celluloseacetat im von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten Biofilm. Für zukünftige Analysen ist eine Optimierung der Nachweismethoden angezeigt. Diese könnte auf biologischer Ebene durch die Überexpression des für die Acetylierung vermuteten zweiten CS-Locus verbessert werden.

Das natürliche Vorkommen von acetylierter Cellulose konnte bereits für *Pseudomonas fluorescens* gezeigt werden (Spiers et al. 2003). Das für die Cellulosesynthese kodierende *wss*-Operon besteht hier aus deutlich mehr Genen als das *bcs*-Operon in *Komagataeibacter* und umfasst *wssABCDEFGHIJ* (Spiers et al. 2002). Die Untereinheiten der Cellulosesynthase werden hier aus WssBCDE aufgebaut, wogegen WssF, WssG, WssH und Wssl mit einem Beitrag zur Acetylierung der Cellulose vorhergesagt werden (Spiers et al. 2003). Ein Vergleich der Proteinsequenzen mittels Blastp ergab für WssF eine Homologie zu Proteinen der SGNH/GDSL Hydrolase Familie, wie es auch für BcsAB2 ORF2 bzw. BcsX in *K. hansenii* der Fall ist. WssG, WssH und Wssl weisen dagegen keine Homologie zu den Proteinen der in dieser Arbeit näher betrachteten *K. hansenii* Stämmen auf. *wssG* kodiert das Alginat Biosynthese Protein AlgF, *wssH* eine putative Alginat-O-Acetylase sowie *wssl* ein nicht näher spezifiziertes Protein der Alginat-Biosynthese. Damit fehlen in beiden *K. hansenii* Stämmen jedoch Homologien zu Proteinen, die für die Synthese acetylierter Cellulose entscheidend sind. Da Pseudomonaden (*Pseudomonadales*) zur Klasse der Gammaproteobacteria zählen, Essigsäurebakterien jedoch zu den Alphaproteobacteria (*Rhodospirales*), weisen beide Gattungen keine enge Verwandtschaft auf, weshalb auch keine außergewöhnlich große Homologie der Synthesysteme zu erwarten ist.

4.5 Translation des Cellulosesynthase-Komplexes in *K. hansenii*

4.5.1 Von den Transkriptionsdaten zur Analyse der Translation

Die Auswertung der Transkriptionsdaten von *K. hansenii* ATCC 23769 lieferte wie beschrieben (3.5.1) keine eindeutigen Hinweise auf eine unterschiedliche Abundanz der einzelnen Cellulosesynthasen, aus welcher sich eine Hierarchie der Wichtigkeit ableiten ließe. Die Expressionsstärke von *bcsAB1*, *bcsAB2* und *bcsAB3* ist im Verlauf der Kultivierung relativ konstant. Ebenso übertrifft die Expression der für die Synthese der Fasern notwendige Cellulosesynthase *bcsAB1* nicht die der übrigen Gene, sondern liegt teilweise niedriger. Bemerkenswerterweise wies die Cellulosesynthase des zweiten Genclusters, *bcsAB2*, die höchste Abundanz auf.

Im Gegensatz hierzu zeigte die Transkriptionsanalyse des Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 signifikante Unterschiede in der Abundanz der Transkripte der CS-Gene (3.5.2). Hieraus leitet sich bereits eine erste Annahme bezüglich der Hierarchie der einzelnen Cellulosesynthasen ab. Die Expression von *bcsAB1* konnte als am höchsten quantifiziert werden, weshalb dieser der größte Beitrag zur Cellulosesynthese zugerechnet werden kann. Dagegen liegt die Expression von *bcsAB2* signifikant darunter. Obwohl *bcsAB2* nicht zur Synthese eines eindeutig erkennbaren Polymers nötig zu sein scheint, wirkt sich – wie gezeigt – ein Vorhandensein dennoch modifizierend auf die Zusammenlagerung der Fasern aus (3.4.1.3). Des Weiteren lag die Expression der dritten Cellulosesynthase-Genkopie, *bcsAB3*, deutlich niedriger als die der anderen beiden CS-Gene. Wie bereits für *bcsAB2* beschrieben, können auch für *bcsAB3* keine phänotypisch unterscheidbaren Polymere nach unbewegter, statischer Kultivierung sowie im REM erkannt werden, dennoch zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Beitrag zur Zusammenlagerung der Cellulosefasern. In den meisten Fällen erfolgt die Regulation bakterieller Genexpression durch Steuerung der Transkription, dennoch können Regulationen während der Translation oder in post-translationalen Prozessen ablaufen, wenngleich hiermit aber auch ein deutlich erhöhter Energieaufwand verbunden ist (Duval et al. 2015; Tollerson and Ibbá 2020).

4.5.2 Akzessorische Proteine des Haupt-Cellulosesynthese-Operons zeichnen sich durch besonders erhöhte Proteinsynthese aus

Zur abschließenden Klärung der tatsächlichen Abundanz der Proteine wurde das Proteom beider Stämme quantifiziert. Weitere Ursachen in der Geschwindigkeit und Stärke der Cellulosesynthese zwischen beiden Stämmen konnten so differenziert werden, sowie Rückschlüsse auf die Modifikation der Cellulosefasern getroffen werden.

Der grundsätzliche Vergleich der Quantifizierung der drei CS-Loci zeigt in beiden Stämmen die herausragende Bedeutung des ersten Gen-Locus um *bcsAB1*. Die Abundanz dieser Proteine macht in *K. hansenii* ATCC 23769 90 % bzw. bei alleiniger Expression von *bcsAB1* 84 % aller in den drei CS-Loci kodierten Proteine aus. Noch deutlicher ist deren Anteil im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 (96 % bzw. 87 %). Interessanterweise konnte, trotz zuvor eindeutig gemessener Transkription, ein Anteil von BcsAB3 innerhalb des Proteoms in beiden Stämmen nicht nachgewiesen werden, was in beiden Stämmen dem phänotypisch sichtbaren Beitrag des Proteins widerspricht. Folglich kann diese Beobachtung auf eine unterhalb der Detektionsgrenze des Massenspektrometers liegende Stärke der Bildung des Proteins hinweisen. Lediglich in *K. hansenii* ATCC 23769 konnte die Anwesenheit von BcsC3, dem Kanal-Protein des dritten CS-Genclusters, in niedriger Abundanz nachgewiesen werden. Alle übrigen Proteine, von denen ein unmittelbarer Beitrag zur Cellulosesynthese in *K. hansenii* ATCC 53582 angenommen wird, wurden im Massenspektrometer detektiert.

Dagegen konnte in *K. hansenii* ATCC 23769 weder im Wildtyp, noch im *bcsAB1*-Einzelexpressionsstamm ein BcsC2 zuzurechnendes Peptid erfasst werden. Hierfür kann es mehrere Ursachen geben. Die Transkription von *bcsC2* wurde nicht mittels RT-qPCR untersucht, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Transkription im zweiten Cellulosesynthese-Gencluster von *K. hansenii* ATCC 23769 auf die Transkription der Cellulosesynthasen beschränkt. Da aber bei alleiniger Expression von *bcsAB2* ein nfEPS Phänotyp beobachtet werden kann, ist eine fehlende Expression von *bcsC2* eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass sich die Tatsache, dass es sich hierbei um ein membranständiges Protein handelt,

Diskussion

negativ auf den Protein-Extraktions- und Aufreinigungsprozess ausgewirkt hat. Die unpolaren Abschnitte des Proteins adsorbieren aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung häufig an die Innenwände der Kunststoff (PP)-Reaktionsgefäße, wodurch die Anzahl an detektierbaren Peptiden unter die Detektionsgrenze des Massenspektrometers fallen kann.

Die akzessorischen Proteine (Abbildung 3; Abbildung 4), die unmittelbar vor bzw. nach BcsAB1 kodiert sind, zeigten eine bisher nicht beschriebene, deutlich erhöhte Abundanz im Vergleich zu der der Cellulosesynthase 1 selbst. Deren Bedeutung zeigte sich unter anderem dadurch, dass diese Proteine in *K. hansenii* ATCC 23769 41 % und im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 49 % aller im ersten Operon kodierten Proteine ausmachten. Vom verbleibenden, auf BcsABCD entfallenden Anteil machte BcsD wiederum 80 bzw. 84 % aus. Die Funktion sowie der Beitrag zum Cellulosenetzwerk ist lediglich für einen Teil der akzessorischen Proteine bereits experimentell beschrieben worden. Dieser entfällt insbesondere auf einen Anteil zur korrekten Zusammenlagerung der Cellulose-Makrofibrillen aus Mikrofibrillen. So zeigten weitere markerfreie Deletionen dieser Gene in *K. hansenii* ATCC 23769, dass einerseits Stämme nach Deletion von *ccpAx* oder *cmcAx* nicht in der Lage waren einen geschlossenen Biofilm zu bilden. Andererseits führte eine Deletion von *bglxA* zu einer deutlichen Reduktion des Biofilms gegenüber dem Wildtyp (Mientus, unveröffentlichte Daten).

Bereits bei Standal et al. (1994) zeigte sich der essentielle Beitrag von CcpAx zur *in vivo* Cellulosesynthese von *Acetobacter*. Der Beitrag des *Cellulose complementing factor* (*ccp*) für *Acetobacter* wurde anschließend im Detail von Sunagawa et al. (2013) und McManus et al. (2016) charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass CcpAx auf einer Seite der Zelle in einer linearen Anordnung innerhalb der Membran lokalisiert ist und zur korrekten Lokalisation von BcsD beiträgt. Diese Anordnung konnte kürzlich von Nicolas et al. (2021) bei der Beschreibung des *cortical belts* für zwei *Gluconacetobacter* Spezies bestätigt werden. Nichtsdestotrotz bleibt die exakte Funktion von CcpAx während der Cellulosesynthese unklar.

Die Beteiligung von CmcAx (Carboxymethyl-Cellulase) an der Ausbildung des terminalen Komplexes der Cellulosesynthase konnte bereits früh, ebenfalls durch

Diskussion

Standal et al. (1994), nachgewiesen werden. Dazu wurde eine Insertion im Gen für dieses Enzym in *A. xylinum* ATCC 23769, welche einen Cellulose-negativen Phänotyp zur Folge hatte, näher charakterisiert. Ungewöhnlich für Gram-negative Bakterien ist die Tatsache, dass es sich bei diesem Protein um ein in das Medium sekretiertes Enzym handelt. Die bioinformatische Vorhersage konnte bereits früh durch die experimentelle Zugabe von Antikörpern bestätigt werden, was in einer deutlichen Reduktion der Cellulosesynthese resultierte (Koo et al. 1998). Ferner zeigt sich die Wichtigkeit von CmcAx für die Cellulosesynthese dadurch, dass sich zum einen die produzierte Menge an Cellulose in Folge der Überexpression steigern ließ. Zum anderen zeigt sie sich dadurch, dass die Bildung von BglxA verstärkend auf die Bildung von CmcAx wirkt (Kawano et al. 2008). Des Weiteren weist die Analyse nach Disruption von CmcAx in *G. xylinus* BPR2001 darauf hin, dass das Fehlen dieses Enzyms zu einem ungeordneten Zusammenlagern der Cellulosefasern führt, wodurch folglich statt Cellulosefasern vom Typ I_α, überdrehte Cellulosefasern ähnlich zu Cellulose Typ II gebildet werden (Nakai et al. 2013).

Die Bedeutung von BglxA für die Synthese von bakterieller Cellulose wird durch die bereits genannte regulatorische Wirkung auf die Synthese von CmcAx deutlich. Außerdem wurde die eigenständige Funktion von BglxA als Beta-Glucosidase erstmals von Tonouchi et al. (1997) sowie von Tajima et al. (2001) beschrieben. Wenn auch die hydrolysierende Wirkung auf Cellotriase und längere Cello-Oligosaccharide, nicht aber auf Cellobiose, gezeigt werden konnte, bleibt der genaue Beitrag des Enzyms zur Synthese von Cellulose in *Komagataeibacter* noch immer unklar (Tahara et al. 1998; Tajima et al. 2001).

4.5.3 BcsD als zentrales Protein des Haupt-Cellulosesynthese-Operons

Innerhalb der Proteine des Haupt-Cellulosesynthese-Operons (*bcsABCD*) weist BcsD die höchste Abundanz aller gemessenen Proteine auf. Auch wenn dieses Protein nicht unmittelbar an der Polymerisierung der β -1,4-verknüpften Glucose-Einheiten beteiligt ist, deutet sich eine besondere Wichtigkeit dieses kleinen Proteins (17 kDa) an. Der Beitrag von BcsD zur Synthese und Kristallisierung von bakterieller Cellulose wurde erstmals bei der Analyse von Insertionsmutanten gezeigt (Saxena et al. 1994). Wie bereits zuvor beschrieben ist die Lokalisation von BcsD entlang der Zellachse eng an die Lage von CcpAx gekoppelt und relevant für die Fähigkeit Cellulose zu synthetisieren (McManus et al. 2016; Sunagawa et al. 2013). BcsD bildet ein zylinderförmiges Oktamer im Periplasma und dient als Tunnel zur Bündelung der wachsenden Glucankette während des Weitertransports hin zu BcsC (Hu et al. 2010; Iyer et al. 2011). Die Ausbildung von Cellulosefasern erfolgt in einem mehrstufigen, hierarchischen Prozess durch Zusammenlagerung der Cellulose-Microfibrillen, welcher möglicherweise im Periplasma durch BcsD vermittelt wird (Koizumi et al. 2009). Durch die Kopplung an die Lage von CcpAx entlang der Zellachse wird möglicherweise auch die letzte Stufe der extrazellulären Zusammenlagerung durch BcsD angetrieben, indem die korrekte Anordnung des terminalen Komplexes entlang der Längsachse der Zelle sichergestellt wird (Mehta et al. 2015).

4.5.4 Hierarchie der drei Cellulosesynthase-Gencluster

Der Vergleich der drei im Genom kodierten Cellulosesynthasen auf Ebene des Proteoms bestätigt die bereits am Phänotyp beschriebenen Annahmen zur hierarchischen Rangfolge der Enzyme. In *K. hansenii* ATCC 23769, wie auch im Hochproduzenten ATCC 53582 handelt es sich bei BcsAB1 um die Haupt-Cellulosesynthase, die für die Synthese der bakteriellen Cellulosefasern verantwortlich ist. Dieses Enzym ist im komplexesten der drei Cellulosesynthase-Gencluster kodiert, bestehend aus einem Operon mit *bcsAB*, *bcsC* und *bcsD*, sowie den Genen für die akzessorischen Proteine *cmcAx*, *ccpAx* und *bglxA*.

Bei BcsAB2 unterscheidet sich der phänotypische Beitrag deutlich hinsichtlich der beiden hier analysierten Stämme. In *K. hansenii* ATCC 23769 wird eine relativ große Menge an nicht-fibrillärem EPS (nfEPS) synthetisiert, welches im Wildtyp die Zellen und Zwischenräume des Cellulosefaser-Netzwerks bedeckt. Dagegen tritt dieses Polymer in *K. hansenii* ATCC 53582 phänotypisch nicht so deutlich in Erscheinung. Im Elektronenmikroskop, wie auch bei Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften zeigte sich der Beitrag zur Zusammenlagerung der Cellulosefasern. Jedoch zeigte sich bei alleiniger Expression von *bcsAB2* kein Polymer an der Oberfläche des Kulturmediums.

Vergleichbar scheint der Beitrag von BcsAB3 zu sein. In *K. hansenii* ATCC 23769 bedeckt das synthetisierte EPS offenbar die Einzelzellen und trägt zur natürlichen Gestaltung des Biofilms bei. Im Gegensatz dazu ließ sich in *K. hansenii* ATCC 53582 wie schon bei alleiniger Expression von *bcsAB2* auch bei alleiniger Expression von *bcsAB3* phänotypisch kein Polymer erkennen. Wie bereits für BcsAB2 beschrieben beschränkt sich der Beitrag von BcsAB3 anscheinend auf die Zusammenlagerung der Mikrofibrillen zu Cellulose-Makrofibrillen und bewirkt gemeinsam mit BcsAB2 wie eine Art ‚Kleister-Substanz‘ die Verbindung der Fasern. Zusammen mit den bisher genannten Ergebnissen und der besonders niedrigen Abundanz des Proteins scheint die Bedeutung von BcsAB3 besonders gering zu sein und kann wohl nur als akzessorische Cellulosesynthase betrachtet werden.

4.5.5 Beitrag des zweiten Cellulosesynthase-Clusters und Auswirkungen der Deletionen auf dessen Proteinsynthese

Auffällige Ergebnisse liefert die Betrachtung von BcsAB2 ORF2 bzw. BcsX, zwei Proteinen, deren Wichtigkeit in bestehender Literatur bisher nicht näher beleuchtet wurde. Deren Aktivität konnte bisher nur bioinformatisch als Protein der SGNH/GDSL-Hydrolase-Familie vorhergesagt werden, wobei die intrazelluläre Lokalisation des Proteins aufgrund eines unklaren pSortb-Ergebnisses nicht bestimmbar war. Dennoch bildet dieses Protein sowohl in *K. hansenii* ATCC 23769 als auch im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 einen großen Anteil der Proteine des zweiten Cellulosesynthase-Genclusters. Entsprechend der vorhergesagten Funktion könnten die Proteine lipolytische Aktivität aufweisen (Akoh et al. 2004). Ihre physiologische Rolle wird einerseits mit der Acetylierung von Peptidoglycan beschrieben (Sychantha et al. 2018), andererseits ist der konkrete Beitrag zum Großteil noch immer nicht vollständig verstanden (Le et al. 2020) und für Vertreter der *Acetobacteraceae* bisher auch noch nicht näher untersucht worden. Daher bildet dieses Protein in beiden Stämmen ein interessantes Ziel für zukünftige Arbeiten an modifizierten Formen bakterieller Cellulose. Möglicherweise kann ein Zusammenwirken mit der ebenfalls im zweiten CS-Gencluster kodierten Acetyltransferase BcsY, hergestellt werden.

Des Weiteren zeigt sich eine weitere Auffälligkeit bezüglich der Abundanz der vom BcsAB2-Gencluster kodierten Proteine. Als putativ Cellulose-modifizierendes Element weist die Genomsequenz beider Stämme das Gen einer Acetyltransferase auf (Florea et al. 2016b; Iyer et al. 2010; Umeda et al. 1999). Die vorhergesagte zytoplasmatische Acetyltransferase, BcsY, konnte eindeutig in allen vier Replikaten der Proben von *K. hansenii* ATCC 23769 sowie in dessen Doppeldeletionsmutante nachgewiesen werden. Diese Daten weisen auf die Rolle des Enzyms für die mögliche Acetylierung der in diesem Stamm synthetisierten Cellulose. Das Vorhandensein von Celluloseacetat stünde in Einklang mit den zuvor gemachten Beobachtungen zur Auswirkung von Aceton auf die Intaktheit des Cellulosenetzwerks im Elektronenmikroskop (3.4.1; 4.4.5). Gegensätzlich verhält es sich mit den entsprechenden Ergebnissen zu BcsY in *K. hansenii* ATCC 53582. Kein einziges

Probenreplikate des Wildtyps zeigten Hinweise auf die Bildung dieses Proteins. Lediglich in einer Probe der Doppeldeletionsmutante wurde ein einzelnes zu BcsY gehörendes Peptid identifiziert, was einer äußerst geringen Sequenzabdeckung von 5,5% entspricht. Die geringe Zuverlässigkeit dieses Ergebnisses bestätigt die Betrachtung des internen Scores der Software von 1,43 bei einem erreichbaren Maximum von 323,31. Diese Beobachtung verdeutlicht die Unterschiede der beiden in dieser Arbeit untersuchten Stämme und legt die Hypothese nahe, dass es sich bei *K. hansenii* ATCC 53582 um einen Abkömmling von *K. hansenii* ATCC 23769 handeln könnte, bei welchem durch Mutation(en) die Celluloseproduktion deutlich erhöht ist, dagegen die Bildung nicht essenzieller Proteine des Cellulosenetzwerks signifikant reduziert ist.

4.5.6 Auswirkung der Deletionen der Cellulosesynthasen auf die Abundanzen weiterer Proteine

Neben den bisher beschriebenen Proteinen, die aufgrund ihrer Lage im Cellulosesynthase-Operon bzw. -Gencluster unmittelbar der Cellulosesynthese zugerechnet werden können, ermöglichen die umfangreichen Proteomik-Daten den Vergleich sämtlicher Proteine und so eine Charakterisierung der Auswirkung der gleichzeitigen Deletion von *bcsAB2* und *bcsAB3*. Bereits Deng et al. (2015) konnte zeigen, dass Proteine, die nicht unmittelbar im Zusammenhang zur Cellulosesynthese stehen, für diese notwendig sind. So bewirkten Insertionen innerhalb einer Lysin-Decarboxylase (EFG85846) oder einer Alanin-Racemase (EFG85940) das Fehlen der Cellulosesynthese. In dieser Arbeit wirkte sich die Deletion der zusätzlichen CS-Gene *bcsAB2* und *bcsAB3* weder in *K. hansenii* ATCC 23769 noch im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 modifizierend auf die Bildung von denjenigen Proteinen aus, welche homolog zu denen bei Deng et al. (2015) beschriebenen sind, namentlich WP_003616935.1 & WP_003619443.1 bzw. CUW46040.1 & CUW47741.1.

Stattdessen konnte eine signifikant veränderte Abundanz zwischen Wildtyp und Doppel-Deletionsmutante bei anderen Proteinen beobachtet werden. Da es sich hierbei, außer bei *bcsAB2* ORF2, um Proteine handelt, deren Beitrag zur Cellulosesynthese bisher nicht beschrieben wurde, sind die Ergebnisse mit Vorsicht

Diskussion

zu betrachten und weitere detaillierte Analysen erforderlich, um einen tatsächlich kausalen Zusammenhang herstellen zu können. Besonders interessant für weitere Analysen erscheint hierbei in *K. hansenii* ATCC 23769 eine Tagatose 6-phosphat Kinase (WP_003619561.1), welche in jeder Probe des Wildtyps deutlich detektiert wurde, jedoch in keiner Probe der Doppeldelentionsmutante. Die Funktion einer Tagatose 6-phosphat Kinase wurde bisher in keinem Vertreter der *Acetobacteraceae* näher charakterisiert. Vergleicht man dagegen die bisher gemachte, detaillierte Analyse zum entsprechenden Protein in *Staphylococcus aureus*, so ist festzustellen, dass dieses Protein dort am Abbau von Lactose und Galactose beteiligt ist (Bissett and Anderson 1974). Bisher konnte kein Zusammenhang zur Biofilmbildung bzw. zur Synthese von EPS hergestellt werden.

Für *K. hansenii* ATCC 53582 konnte mit einer Corrinoid Adenosyltransferase (CUW47672.1) ebenfalls ein Protein identifiziert werden, welches nur im Wildtyp und nicht in der Doppeldelentionsmutante detektiert werden konnte. Auch dieses Protein wurde bisher nicht näher in *Acetobacteraceae*-Stämmen untersucht, lediglich in anderen Gattungen, wie *Salmonella* oder *Lactobacillus* wurde die Beteiligung an der *de novo*-Synthese des Vitamin B₁₂-Derivats Adenosylcobalamin beschrieben (Escalante-Semerena et al. 1990; Park et al. 2012).

Im Gegensatz dazu wurde in beiden Stämmen kein Protein gefunden, welches in allen Replikaten der CS-Doppeldelentionsmutante, nicht aber in allen Proben des Wildtyps gemessen werden konnte.

4.6 Regulation der Cellulosesynthese – cyclisches di-GMP

Cyclisches di-GMP stellt den für die Synthese von bakterieller Cellulose verantwortlichen sekundären Botenstoff dar, der dabei den Übergang von motilen zu sessilen Zellen reguliert (Ross et al. 1990; Ross et al. 1987). Eine hohe intrazelluläre Konzentration an cyclischem di-GMP korreliert dabei mit Biofilmbildung, wohingegen eine niedrige Konzentration einen motilen Phänotyp bewirkt (Opoku-Temeng and Sintim 2017). Die Aktivierung der Cellulosesynthase erfolgt durch Binden der C-terminalen PiLZ-Domäne von BcsA (Amikam and Galperin 2005; Ryjenkov et al. 2006). Anhand der Proteinsequenz wurden in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 zwei mögliche Diguanylatcyclasen identifiziert, die sowohl das charakteristische GGDEF-, als auch das EAL-Motiv tragen (Ausmees et al. 2001; Römling and Galperin 2017; Simm et al. 2004). Beide Enzyme, DgcA (WP_003617106.1; CUW46099.1) und DgcB (WP_003621901.1; CUW48224.1), weisen zwar eine Homologie zu den DGCs auf, die von Tal et al. (1998) bei der Analyse nach Insertionsmutagenese beschrieben wurden; jedoch fehlen bisher Daten nach markerfreier *in-frame* Deletion, wie sie im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurden. Besonderes Interesse liegt in der Beantwortung der Frage, ob der c-di-GMP-Regulationsmechanismus als weiteres biotechnologisches Werkzeug verwendet werden kann, um die deutlichen Unterschiede in der Geschwindigkeit und Menge der Cellulosesynthese beider Stämme zu charakterisieren.

Einerseits weisen *K. hansenii* ATCC 23769 und Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 Gemeinsamkeiten in Folge der Deletion von *dgcA* bzw. *dgcB* auf: In beiden Stämmen war es nicht möglich, gleichzeitig beide DGC-Gene zu deletieren. Hierin begründet sich die Annahme, dass das Vorhandensein mindestens einer der beiden DGCs essentiell für das Überleben der Zelle ist und sich folglich die gleichzeitige Deletion beider Enzyme letal auswirkt. Ebenso deuten die Ergebnisse einen vergleichbaren Beitrag von *dgcB* zur Aktivierung der Cellulosesynthese in beiden Stämmen an. Nach Deletion dieses Gens sind beide Stämme nicht mehr in der Lage einen Biofilm an der Oberfläche unbewegter Flüssigkulturen zu bilden (Abbildung 14; Abbildung 15).

Diskussion

Andererseits unterscheidet sich der phänotypische Beitrag von *dgcA* zur Cellulosesynthese deutlich in beiden Stämmen. Die Deletion wirkte sich nicht auf die Cellulosemenge in *K. hansenii* ATCC 23769 aus (Abbildung 14), wogegen sich im Hochproduzenten *K. hansenii* ATCC 53582 die Masse der gebildeten Cellulose nahezu halbierte (Abbildung 15).

Als weiterer Vergleichsparameter wurde die Motilität der Deletionsstämmen auf Softagarplatten untersucht. Bereits die Wildtyp-Proben von *K. hansenii* ATCC 23769 waren unter verschiedenen experimentellen Bedingungen nicht in der Lage sich schwärmend über die feuchte Mediumsoberfläche auszubreiten. Ebenso wiesen die DGC-Deletionsstämmen keine Unterschiede bezüglich der Fähigkeit zur Ausbreitung auf (Abbildung 31). Anders verhielt es sich mit der Motilität der Zellen von *K. hansenii* ATCC 53582. Die Kolonien des Wildtyps waren in der Lage sich über die feuchte Oberfläche des Agars auszubreiten, jedoch ging diese Fähigkeit sowohl nach Deletion von *dgcA*, als auch nach Deletion von *dgcB* vollständig verloren (Abbildung 32).

Bisher wurden als Grundlage für die Regulation der Cellulosesynthese mittels cyclischen di-GMP zwei theoretische Modelle postuliert: einen globalen und einen lokalen Regulationsmechanismus des sekundären Botenstoffs (Dahlstrom and O'Toole 2017). Dem globalen Signal-Modell liegt die Annahme eines gemeinsam genutzten, allgemeinen Grundniveaus an cyclischem di-GMP zu Grunde, welches durch die Gesamtheit aller zellulären Diguanylatcyclasen aufgebaut wird. Dagegen geht das Modell der lokalen Signalübertragung von einer direkten Interaktion der DGCs und ihres Effektors, bzw. einer lokal begrenzten Wirkung des freigesetzten cyclischen di-GMPs aus. Bisherige Studien zur Regulation der Cellulosesynthese in *Komagataeibacter* bevorzugen das globale Regulationsmodell, da die Insertions-Mutagenese dreier DGCs in *A. xylinum* lediglich in einem geringen Rückgang der gesamten Cellulosesynthese resultierte (Jacek et al. 2019; Tal et al. 1998).

Kürzlich durchgeführte Analysen zur Regulation der Biofilmsynthese in *E. coli* K12 legen dagegen dort einen komplexen, lokalen Signalmechanismus nahe. In diesem Stamm scheint die Synthese von pEtN-Cellulose durch eine direkte Interaktion von DgcC und PdeK mit BcsB gesteuert zu werden (Richter et al. 2020). Aufgrund der in dieser Studie gemachten Ergebnisse finden sich Hinweise darauf, die die Hypothese

Diskussion

bekräftigen, dass die Cellulosesynthese sowohl in *K. hansenii* ATCC 23769, als auch in *K. hansenii* ATCC 53582 über einen lokalen Regulationsmechanismus gesteuert wird. Hierbei ist diese insbesondere von der Aktivität von DgcB abhängig. Zwar wurde in *E. coli* K12 eine räumliche Nähe der Kodierung von DgcC und PdeK zu BcsB gezeigt, dennoch sind Interaktionen mit dem Effektor auch ohne diese Nähe möglich (Richter et al. 2020). Mit Identifikation von weiteren komplexen c-di-GMP gesteuerten Regulationsmechanismen in unterschiedlichen Genera erscheint ein vergleichbar komplexer Aktivierungsmechanismus auch für die Cellulosesynthese in *K. hansenii* ATCC 23769 und *K. hansenii* ATCC 53582 als wahrscheinlich (Jenal 2013; Lindenberg et al. 2013; Pfiffer et al. 2019).

Eine genauere Aussage, ob die Annahme eines lokalen c-di-GMP Regulationsmechanismus zutreffend ist, können zukünftige Experimente liefern, die die von Hengge (2021) beschriebenen drei Hauptkriterien des lokalen Mechanismus näher betrachten: I. spezifischer Phänotyp nach Deletion, II. direkte Interaktion von DGC, PDE und Effektor und III. gleichbleibende, bzw. signifikant reduzierte c-di-GMP Konzentrationen. Daneben liefern Untersuchungen zur räumlichen Steuerung des c-di-GMP Signalwegs in zahlreichen anderen Organismen, wie u. a. *P. aeruginosa*, *V. cholerae* oder *B. subtilis* ergänzende Ansatzpunkte zur näheren Analyse der Regulation durch den sekundären Botenstoff in *K. hansenii* (Kunz and Graumann 2020).

5. Fazit und Ausblick

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von bakterieller Cellulose in Biotechnologie, Biomedizin und Lebensmitteltechnologie wurden frühzeitig erkannt und erforscht. Im Vergleich zu Cellulose pflanzlichen Ursprungs profitiert bakterielle Cellulose von der besonders hohen Kristallinität, einfacher Aufreinigung und natürlichen Modifikationen, wodurch auf teure und umweltschädliche Aufreinigungsprozesse verzichtet werden kann (Knöller et al. 2020; Sommer et al. 2021).

Die erfolgreiche Entwicklung eines genetischen Systems für einen *K. hansenii* Stamm mit Celluloseproduktion und zusätzlich auch für einen zweiten Stamm mit besonders hoher Celluloseproduktion im Rahmen dieser Arbeit bildet eine gute Grundlage für zukünftige zielgerichtete Anpassung der ursprünglich nur als Essigmutter bekannten EPS (Pasteur 1864).

Die von BcsAB1 gebildeten stark kristallinen Cellulosefasern bilden das Hauptelement dieses Biofilms, der sich durch ein sehr hohes Elastizitätsmodul und einen hohen Wassergehalt auszeichnet. Die von BcsAB2 und BcsAB3 gebildeten zusätzlichen EPS scheinen sich modifizierend auf die Netzwerkstruktur auszuwirken. Einerseits kann in *K. hansenii* ATCC 23769 davon ausgegangen werden, dass diese andere, scheinbar amorphe Form der Cellulose (nfEPS) aufgrund ihrer Lage im Cellulosenetzwerk auf den Feuchtigkeitshaushalt der Zellen regulierend wirkt. Andererseits wirken sich die beiden zusätzlichen Cellulosesynthasen besonders modifizierend auf die mechanischen Eigenschaften der vom Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 gebildeten Cellulose aus. Diese Eigenschaften können zukünftig genutzt und im Zuge von rekombinanter Stammentwicklung neu zusammengesetzt werden, um neue, regenerative Materialien für Spezialanwendungen zu erzeugen. Durch die spezifische Kombination der einzelnen CS-Gene beider Stämme kann versucht werden, insbesondere die vielfältigen Herausforderungen wie Stoff-Diffusion, Steifheit oder Biokompatibilität gezielt zu verändern und so insbesondere neue Anwendungsmöglichkeiten in der Biomedizin und dem Tissue-Engineering zu schaffen (Griffith and Naughton 2002; Klemm et al. 2021; Rozenberga et al. 2016). Ein weiteres, eher neuartiges Feld, in dem bakterielle

Fazit und Ausblick

Cellulose aufgrund der vielfältigen Eigenschaften Verwendung findet, ist die optische Industrie. Hier kann die Licht-Leitfähigkeit bakterieller Cellulose genutzt werden, um auf Erdöl basierende Polymere durch nachhaltige Biopolymere zu ersetzen (Reimer and Zollfrank 2021).

Auffällig, aber bisher nicht näher betrachtet und daher noch ungeklärt, bleibt die Beobachtung, dass sich die in beiden hier untersuchten Stämmen die zur Induktion der Cellulosesynthese notwendige Zellzahl deutlich unterschied (abgeleitet aus dem unterschiedlichen Inokulum und den REM-Aufnahmen). Dies liefert neue Ansatzpunkte für weitere detaillierte Analysen zur Steuerung der Cellulosebildung sowie einen Hinweis auf die Beteiligung von *Quorum Sensing* an der Synthese bakterieller Cellulose. Als entsprechender Botenstoff wurden vor kurzem N-Acyl-Homoserin-Lactone in *Gluconacetobacter* identifiziert (Liu et al. 2019). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression des an der Regulation des *Quorum sensing* beteiligten Gens (*luxR*) zur Steigerung der gebildeten Cellulosemenge führt (Zhang et al. 2021).

6. Literaturverzeichnis

- Abidi W, Torres-Sánchez L, Siroy A, Krasteva PV (2021) Weaving of bacterial cellulose by the Bcs secretion systems. *FEMS Microbiol Rev* doi:10.1093/femsre/fuab051
- Abral H, Chairani MK, Rizki MD, Mahardika M, Handayani D, Sugiarti E, Muslimin AN, Sapuan SM, Ilyas RA (2021) Characterization of compressed bacterial cellulose nanopaper film after exposure to dry and humid conditions. *J Mater Sci Technol* 11:896-904 doi:10.1016/j.jmrt.2021.01.057
- Ahvenainen P, Kontro I, Svedström K (2016) Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials. *Cellulose* 23(2):1073-1086 doi:10.1007/s10570-016-0881-6
- Ai HW, Shaner NC, Cheng Z, Tsien RY, Campbell RE (2007) Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry-US* 46(20):5904-10 doi:10.1021/bi700199g
- Akoh CC, Lee G-C, Liaw Y-C, Huang T-H, Shaw J-F (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* 43(6):534-552 doi:10.1016/j.plipres.2004.09.002
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403-410 doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amikam D, Galperin MY (2005) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22(1):3-6 doi:10.1093/bioinformatics/bti739
- Aschner M (1937) Cultivation of Cellulose-splitting Bacteria on Membranes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 33(3):249-252 doi:10.1128/jb.33.3.249-252.1937
- Atalla RH, Hackney JM, Uhlin I, Thompson NS (1993) Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int J Biol Macromol* 15(2):109-112 doi:10.1016/0141-8130(93)90007-9
- Augimeri RV, Strap JL (2015) The phytohormone ethylene enhances cellulose production, regulates *CRP/FNRKx* transcription and causes differential gene expression within the bacterial cellulose synthesis operon of *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) xylinus* ATCC 53582. *Front Microbiol* 6:1459 doi:10.3389/fmicb.2015.01459
- Ausmees N, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M, Lindberg M (2001) Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* 204(1):163-167 doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10880.x
- Bae S, Sugano Y, Shoda M (2004) Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *J Biosci Bioeng* 97(1):33-38 doi:10.1016/S1389-1723(04)70162-0
- Bartowsky EJ, Henschke PA (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *Int J Food Microbiol* 125(1):60-70 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016
- Benziman M, Haigler CH, Brown RM, Jr., White AR, Cooper KM (1980) Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *P Natl Acad Sci USA* 77(11):6678-6682 doi:10.1073/pnas.77.11.6678
- Bernardo EB, Neilan BA, Couperwhite I (1998) Characterization, Differentiation and Identification of Wild-type Cellulose-synthesizing *Acetobacter* strains Involved

- in Nata de Coco Production. Syst Appl Microbiol 21(4):599-608
doi:10.1016/S0723-2020(98)80073-8
- Bimmer M (2017) Characterization of cellulose synthesis in *Komagataeibacter hansenii*. Master Thesis, Technical University Munich
- Bimmer M, Mientus M, Klingl A, Ehrenreich A, Liebl W (2022) The Roles of the Various Cellulose Biosynthesis Operons in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. Appl Environ Microb 88(7):e02460-21 doi:10.1128/aem.02460-21
- Bimmer M, Reimer M, Klingl A, Ludwig C, Zollfrank C, Liebl W, Ehrenreich A (2023) Analysis of cellulose synthesis in a high-producing acetic acid bacterium *Komagataeibacter hansenii*. Appl Microbiol Biot 107(9):2947-2967 doi:10.1007/s00253-023-12461-z
- Bissett DL, Anderson RL (1974) Genetic Evidence for the Physiological Significance of the D-Tagatose 6-Phosphate Pathway of Lactose and D-Galactose Degradation in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 119(3):698-704 doi:10.1128/jb.119.3.698-704.1974
- Bode S (2021) Entwicklung neuer Ganzzellbiokatalysatoren mit Essigsäurebakterien. Doktorarbeit, Technische Universität München
- Bourgeois JF, Barja F (2009) The history of vinegar and of its acetification systems. Arch Sci 62:147-160
- Boyd CD, O'Toole GA (2012) Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. Annu Rev Cell Dev Bi 28:439-462 doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155705
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol 41(3):459-72 doi:10.1016/0022-2836(69)90288-5
- Brandão PR, Crespo MTB, Nascimento FX (2022) Phylogenomic and comparative analyses support the reclassification of several *Komagataeibacter* species as novel members of the *Novacetimonas* gen. nov. and bring new insights into the evolution of cellulose synthase genes. Int J Syst Evol Microbiol 72(2) doi:10.1099/ijsem.0.005252
- Brown AJ (1886) XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. Journal of the Chemical Society, Transactions 49:432-439 doi:10.1039/CT8864900432
- Brown Jr. RM (2004) Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 42(3):487-495 doi:10.1002/pola.10877
- Brown RM (1996) The Biosynthesis of Cellulose. Journal of Macromolecular Science, Part A 33(10):1345-1373 doi:10.1080/10601329608014912
- Brown RM, Jr., Montezinos D (1976) Cellulose microfibrils: visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. P Natl Acad Sci USA 73(1):143-147 doi:10.1073/pnas.73.1.143
- Brown RM, Jr., Willison JH, Richardson CL (1976) Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. Proc Natl Acad Sci U S A 73(12):4565-9 doi:10.1073/pnas.73.12.4565
- Buchert J, Viikari L (1988) Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biot 29(4):375-379 doi:10.1007/BF00265822
- Bundalovic-Torma C, Whitfield GB, Marmont LS, Howell PL, Parkinson J (2020) A systematic pipeline for classifying bacterial operons reveals the evolutionary landscape of biofilm machineries. PLoS Comput Biol 16(4):e1007721 doi:10.1371/journal.pcbi.1007721

- Burger C, Kessler C, Gruber S, Ehrenreich A, Liebl W, Weuster-Botz D (2019) L-Erythrose production with a multideletion strain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biot* 103(11):4393-4404 doi:10.1007/s00253-019-09824-w
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55(4):611-622 doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M, Gilles-Gonzalez M-A (2001) Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, Is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry-US* 40(12):3420-3426 doi:10.1021/bi0100236
- Collins AJ, Smith TJ, Sondermann H, O'Toole GA (2020) From Input to Output: The Lap/c-di-GMP Biofilm Regulatory Circuit. *Annu Rev Microbiol* 74(1):607-631 doi:10.1146/annurev-micro-011520-094214
- Conner DE, Kotrola JS (1995) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl Environ Microb* 61(1):382-385 doi:10.1128/aem.61.1.382-385.1995
- Costa AF, Almeida FC, Vinhas GM, Sarubbo LA (2017) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. *Front Microbiol* 8:2027 doi:10.3389/fmicb.2017.02027
- Cousins SK, Brown RM (1995) Cellulose I microfibril assembly: computational molecular mechanics energy analysis favours bonding by van der Waals forces as the initial step in crystallization. *Polymer* 36(20):3885-3888 doi:10.1016/0032-3861(95)99782-P
- Couso RO, Ielpi L, Dankert MA (1987) A Xanthan-gum-like Polysaccharide from *Acetobacter xylinum*. *Microbiology* 133(8):2123-2135 doi:10.1099/00221287-133-8-2123
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M (2011) Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res* 10(4):1794-1805 doi:10.1021/pr101065j
- Crotti E, Rizzi A, Chouaia B, Ricci I, Favia G, Alma A, Sacchi L, Bourtzis K, Mandrioli M, Cherif A, Bandi C, Daffonchio D (2010) Acetic Acid Bacteria, Newly Emerging Symbionts of Insects. *Appl Environ Microb* 76(21):6963-6970 doi:10.1128/AEM.01336-10
- Cusick KD, Fitzgerald LA, Cockrell AL, Biffinger JC (2015) Selection and Evaluation of Reference Genes for Reverse Transcription-Quantitative PCR Expression Studies in a Thermophilic Bacterium Grown under Different Culture Conditions. *PLoS One* 10(6):e0131015 doi:10.1371/journal.pone.0131015
- Czaja W, Romanovicz D, Brown Rm (2004) Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* 11(3):403-411 doi:10.1023/b:cell.0000046412.11983.61
- Dahlstrom KM, O'Toole GA (2017) A symphony of cyclases: specificity in diguanylate cyclase signaling. *Annu Rev Microbiol* 71:179-195 doi:10.1146/annurev-micro-090816-093325
- Daras G, Templalexis D, Avgeri F, Tsitsekian D, Karamanou K, Rigas S (2021) Updating Insights into the Catalytic Domain Properties of Plant Cellulose synthase (CesA) and Cellulose synthase-like (Csl) Proteins. *Molecules* 26(14):4335 doi:10.3390/molecules26144335
- Deng Y, Nagachar N, Fang L, Luan X, Catchmark JM, Tien M, Kao TH (2015) Isolation and characterization of two cellulose morphology mutants of *Gluconacetobacter*

- hansenii* ATCC23769 producing cellulose with lower crystallinity. PLoS One 10(3):e0119504 doi:10.1371/journal.pone.0119504
- Deng Y, Nagachar N, Xiao C, Tien M, Kao TH (2013) Identification and characterization of non-cellulose-producing mutants of *Gluconacetobacter hansenii* generated by Tn5 transposon mutagenesis. J Bacteriol 195(22):5072-83 doi:10.1128/JB.00767-13
- Deppenmeier U, Ehrenreich A (2009) Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. Microbial Physiology 16(1-2):69-80 doi:10.1159/000142895
- Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Appl Microbiol Biot 60(3):233-42 doi:10.1007/s00253-002-1114-5
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP (2002) Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes. Plant Cell Physiol 43(12):1407-1420 doi:10.1093/pcp/pcf164
- Dreywood R (1946) Qualitative test for carbohydrate material. Ind Eng Chem 18(8):499-499 doi:10.1021/i560156a015
- Drzewiecki K, Angelov A, Ballschmiter M, Tiefenbach KJ, Sterner R, Liebl W (2010) Hyperthermostable acetyl xylan esterase. Microb Biotechnol 3(1):84-92 doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00150.x
- Dunnewind B, Sliwinski E, Grolle K, Van Vliet T (2003) The kieffer dough and gluten extensibility rig - an experimental evaluation. J Texture Stud 34(5 - 6):537-560 doi:10.1111/j.1745-4603.2003.tb01080.x
- Duval M, Simonetti A, Caldelari I, Marzi S (2015) Multiple ways to regulate translation initiation in bacteria: Mechanisms, regulatory circuits, dynamics. Biochimie 114:18-29 doi:10.1016/j.biochi.2015.03.007
- Escalante-Semerena JC, Suh SJ, Roth JR (1990) cobA function is required for both de novo cobalamin biosynthesis and assimilation of exogenous corrinoids in *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 172(1):273-280 doi:10.1128/jb.172.1.273-280.1990
- Fang L, Catchmark JM (2014) Characterization of water-soluble exopolysaccharides from *Gluconacetobacter xylinus* and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly. Cellulose 21(6):3965-3978 doi:10.1007/s10570-014-0443-8
- Fang L, Catchmark JM (2015) Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. Carbohydr Polym 115:663-669 doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.028
- Feist WC, Baker AJ, Tarkow H (1970) Alkali requirements for improving digestibility of hardwoods by rumen micro-organisms. J Anim Sci 30(5):832-835 doi:10.2527/jas1970.305832x
- Feng X, Ullah N, Wang X, Sun X, Li C, Bai Y, Chen L, Li Z (2015) Characterization of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917. J Food Sci 80(10):E2217-E2227 doi:10.1111/1750-3841.13010
- Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. P Natl Acad Sci USA 76(4):1648-52 doi:10.1073/pnas.76.4.1648
- Fischer S, Thümmler K, Volkert B, Hettrich K, Schmidt I, Fischer K Properties and applications of cellulose acetate. In: Macromol Symp, 2008. vol 262. Wiley Online Library, p 89-96

- Florea M, Hagemann H, Santosa G, Abbott J, Micklem CN, Spencer-Milnes X, de Arroyo Garcia L, Paschou D, Lazenbatt C, Kong D (2016a) Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. *P Natl Acad Sci USA* 113(24):E3431-E3440 doi:10.1073/pnas.1522985113
- Florea M, Reeve B, Abbott J, Freemont PS, Ellis T (2016b) Genome sequence and plasmid transformation of the model high-yield bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582. *Sci Rep* 6(1):23635 doi:10.1038/srep23635
- French AD (2014) Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. *Cellulose* 21(2):885-896 doi:10.1007/s10570-013-0030-4
- French AD, Johnson GP (2007) Cellulose Shapes. In: Brown RM, Saxena IM (eds) *Cellulose: Molecular and Structural Biology: Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 257-284
- García-García I, Cañete-Rodríguez AM, Santos-Dueñas IM, Jiménez-Hornero JE, Ehrenreich A, Liebl W, García-Martínez T, Mauricio JC (2017) Biotechnologically relevant features of gluconic acid production by acetic acid bacteria. *Acetic Acid Bact* 6(1) doi:10.4081/aab.2017.6458
- Gea S, Reynolds CT, Roohpour N, Wirjosentono B, Soykeabkaew N, Bilotti E, Peijs T (2011) Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource Technol* 102(19):9105-9110 doi:10.1016/j.biortech.2011.04.077
- Goldberg JB, Ohman DE (1984) Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J Bacteriol* 158(3):1115-21 doi:10.1128/jb.158.3.1115-1121.1984
- 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. Proposal for the Improvement of the Taxonomy of the Genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215. *Syst Appl Microbiol* 4(3):338-368 doi:10.1016/S0723-2020(83)80020-4
- Greenberg DE, Ding L, Zelazny AM, Stock F, Wong A, Anderson VL, Miller G, Kleiner DE, Tenorio AR, Brinster L, Dorward DW, Murray PR, Holland SM (2006a) A Novel Bacterium Associated with Lymphadenitis in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. *PLOS Pathog* 2(4):e28 doi:10.1371/journal.ppat.0020028
- Greenberg DE, Porcella SF, Stock F, Wong A, Conville PS, Murray PR, Holland SM, Zelazny AM (2006b) *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(11):2609-2616 doi:10.1099/ijs.0.64412-0
- Griffith LG, Naughton G (2002) Tissue Engineering - Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* 295(5557):1009-1014 doi:10.1126/science.1069210
- Gullo M, Sola A, Zanichelli G, Montorsi M, Messori M, Giudici P (2017) Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. *Appl Microbiol Biot* 101(22):8115-8127 doi:10.1007/s00253-017-8539-3
- Gupta A, Singh VK, Qazi GN, Kumar A (2001) *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(3):445-56

- Haffner FB, Mitchell VD, Arundale RA, Bauer S (2013) Compositional analysis of *Miscanthus giganteus* by near infrared spectroscopy. *Cellulose* 20(4):1629-1637 doi:10.1007/s10570-013-9935-1
- Haigler CH, Brown RM, Benziman M (1980) Calcofluor White ST Alters the in Vivo Assembly of Cellulose Microfibrils. *Science* 210(4472):903-906 doi:10.1126/science.7434003
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10):986-94 doi:10.1101/gr.6.10.986
- Hengge R (2021) High-specificity local and global c-di-GMP signaling. *Trends Microbiol* 29(11):993-1003 doi:10.1016/j.tim.2021.02.003
- Hernández-Arriaga AM, Del Cerro C, Urbina L, Eceiza A, Corcuera MA, Retegi A, Auxiliadora Prieto M (2019) Genome sequence and characterization of the *bcs* clusters for the production of nanocellulose from the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis* ID13488. *Microb Biotechnol* 12(4):620-632 doi:10.1111/1751-7915.13376
- Hestrin S, Schramm M (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J* 58(2):345-352 doi:10.1042/bj0580345
- Hölscher T, Görisch H (2006) Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol* 188(21):7668-76 doi:10.1128/jb.01009-06
- Hornung M, Ludwig M, Gerrard AM, Schmauder HP (2006) Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Eng Life Sci* 6(6):537-545 doi:10.1002/elsc.200620162
- Hu S-Q, Gao Y-G, Tajima K, Sunagawa N, Zhou Y, Kawano S, Fujiwara T, Yoda T, Shimura D, Satoh Y, Munekata M, Tanaka I, Yao M (2010) Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(42):17957-17961 doi:10.1073/pnas.1000601107
- Hu Y, Catchmark JM (2010) Formation and Characterization of Spherelike Bacterial Cellulose Particles Produced by *Acetobacter xylinum* JCM 9730 Strain. *Biomacromolecules* 11(7):1727-1734 doi:10.1021/bm100060v
- Hu Y, M Catchmark J (2009) Effect of freeze-drying behavior on the density and structure of bacterial cellulosic films by different acidic and alkaline treatments. Paper presented at the 2009 Reno, Nevada, June 21 - June 24, 2009, St. Joseph, MI,
- Huang C-N, Liebl W, Ehrenreich A (2018) Restriction-deficient mutants and markerless genomic modification for metabolic engineering of the solvent producer *Clostridium saccharobutylicum*. *Biotechnol Biofuels* 11(1):264 doi:10.1186/s13068-018-1260-3
- Huang H-Y, Cheng Y-S (2019) Heterologous overexpression, purification and functional analysis of plant cellulose synthase from green bamboo. *Plant Methods* 15(1):80 doi:10.1186/s13007-019-0466-0
- Hubbe MA, Chandra RP, Dogu D, van Velzen STJ (2019) Analytical Staining of Cellulosic Materials: A Review. *BioResources* 14(3):7387-7464
- Hughes J, McCully ME (1975) The Use of an Optical Brightener in the Study of Plant Structure. *Stain Technol* 50(5):319-329 doi:10.3109/10520297509117082

- Hutchison CA, Merryman C, Sun L, Assad-Garcia N, Richter RA, Smith HO, Glass JI, Silhavy TJ (2019) Polar Effects of Transposon Insertion into a Minimal Bacterial Genome. *J Bacteriol* 201(19):e00185-19 doi:10.1128/JB.00185-19
- Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A (2000) Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *J Mater Sci* 35(2):261-270 doi:10.1023/A:1004775229149
- Iyer PR, Catchmark J, Brown NR, Tien M (2011) Biochemical localization of a protein involved in synthesis of *Gluconacetobacter hansenii* cellulose. *Cellulose* 18(3):739-747 doi:10.1007/s10570-011-9504-4
- Iyer PR, Geib SM, Catchmark J, Kao T-h, Tien M (2010) Genome sequence of a cellulose producing bacterium, *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. *J Bacteriol*:4256-4257 doi:10.1128/JB.00588-10
- Jacek P, Ryngajłło M, Bielecki S (2019) Structural changes of bacterial nanocellulose pellicles induced by genetic modification of *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. *Appl Microbiol Biot* 103(13):5339-5353 doi:10.1007/s00253-019-09846-4
- Jacek P, Silva FAGSd, Dourado F, Bielecki S, Gama M (2021) Optimization and characterization of bacterial nanocellulose produced by *Komagataeibacter rhaeticus* K3. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2:100022 doi:10.1016/j.carpta.2020.100022
- Jacek P, Szustak M, Kubiak K, Gendaszewska-Darmach E, Ludwicka K, Bielecki S (2018) Scaffolds for Chondrogenic Cells Cultivation Prepared from Bacterial Cellulose with Relaxed Fibers Structure Induced Genetically. *Nanomaterials* 8(12):1066 doi:10.3390/nano8121066
- Jackson MG (1977) Review article: The alkali treatment of straws. *Anim Feed Sci Tech* 2(2):105-130 doi:10.1016/0377-8401(77)90013-X
- Jayaraman A, Wood TK (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 10:145-167 doi:10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536
- Jenal U (2013) Think globally, act locally: How bacteria integrate local decisions with their global cellular programme. *EMBO J* 32(14):1972-1974 doi:10.1038/emboj.2013.140
- Jenal U, Reinders A, Lori C (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* 15(5):271-284 doi:10.1038/nrmicro.2016.190
- Jozala AF, Pértile RA, dos Santos CA, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Seckler MM, Gama FM, Pessoa A, Jr. (2015) Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Appl Microbiol Biot* 99(3):1181-90 doi:10.1007/s00253-014-6232-3
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583-589 doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Kawano S, Tajima K, Kono H, Numata Y, Yamashita H, Satoh Y, Munekata M (2008) Regulation of endoglucanase gene (*cmcaX*) expression in *Acetobacter xylinum*. *J Biosci Bioeng* 106(1):88-94 doi:10.1263/jbb.106.88
- Kawano S, Tajima K, Uemori Y, Yamashita H, Erata T, Munekata M, Takai M (2002) Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC

- 23769 and ATCC 53582: comparison of cellulose synthetic ability between strains. *DNA Res* 9(5):149-56 doi:10.1093/dnares/9.5.149
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8(9):634-644 doi:10.1038/nrmicro2405
- Kerstens K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J (2006) The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer New York, New York, NY, pp 163-200
- Keshk S, Sameshima K (2006) The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Appl Microbiol Biot* 72(2):291-296 doi:10.1007/s00253-005-0265-6
- Kim D-Y, Nishiyama Y, Kuga S (2002) Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose* 9(3):361-367 doi:10.1023/A:1021140726936
- Klemm D, Heublein B, Fink H-P, Bohn A (2005) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew Chem Int Edit* 44(22):3358-3393 doi:10.1002/anie.200460587
- Klemm D, Petzold-Welcke K, Kramer F, Richter T, Raddatz V, Fried W, Nietzsche S, Bellmann T, Fischer D (2021) Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications. *Carbohydr Polym* 254:117313 doi:10.1016/j.carbpol.2020.117313
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S (2001) Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26(9):1561-1603 doi:10.1016/S0079-6700(01)00021-1
- Knöller A, Widenmeyer M, Bill J, Burghard Z (2020) Fast-Growing Bacterial Cellulose with Outstanding Mechanical Properties via Cross-Linking by Multivalent Ions. *Materials* 13(12):2838 doi:10.3390/ma13122838
- Koizumi S, Tomita Y, Kondo T, Hashimoto T (2009) What Factors Determine Hierarchical Structure of Microbial Cellulose – Interplay among Physics, Chemistry and Biology –. *Macromol Symp* 279(1):110-118 doi:10.1002/masy.200950517
- Koo HM, Song SH, Pyun YR, Kim YS (1998) Evidence That a β -1,4-Endoglucanase Secreted by *Acetobacter xylinum* Plays an Essential Role for the Formation of Cellulose Fiber. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(11):2257-2259 doi:10.1271/bbb.62.2257
- Kostner D, Peters B, Mientus M, Liebl W, Ehrenreich A (2013) Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter strains*. *Appl Microbiol Biot* 97(18):8341-8349 doi:10.1007/s00253-013-5164-7
- Kostner D, Rachinger M, Liebl W, Ehrenreich A (2017) Markerless deletion of putative alanine dehydrogenase genes in *Bacillus licheniformis* using a *codBA*-based counterselection technique. *Microbiology* 163(11):1532-1539 doi:10.1099/mic.0.000544
- Kuga S, Takagi S, Brown RM (1993) Native folded-chain cellulose II. *Polymer* 34(15):3293-3297 doi:10.1016/0032-3861(93)90404-X
- Kumar M, Turner S (2015a) Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms. *Phytochemistry* 112:91-99 doi:10.1016/j.phytochem.2014.07.009
- Kumar M, Turner S (2015b) Protocol: a medium-throughput method for determination of cellulose content from single stem pieces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 11:46 doi:10.1186/s13007-015-0090-6

- Kunz S, Graumann PL (2020) Spatial organization enhances versatility and specificity in cyclic di-GMP signaling. *Biol Chem* 401(12):1323-1334 doi:10.1515/hsz-2020-0202
- Lampugnani ER, Khan GA, Somssich M, Persson S (2018) Building a plant cell wall at a glance. *J Cell Sci* 131(2) doi:10.1242/jcs.207373
- Le LTHL, Yoo W, Jeon S, Kim KK, Kim TD (2020) Characterization and Immobilization of a Novel SGNH Family Esterase (LaSGNH1) from *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Int J Mol Sci* 21(1):91 doi:10.3390/ijms21010091
- Lee KY, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A (2014) More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromol Biosci* 14(1):10-32 doi:10.1002/mabi.201300298
- Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE (2015) A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol* 4(9):975-986 doi:10.1021/sb500366v
- Lennox ES (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1(2):190-206 doi:10.1016/0042-6822(55)90016-7
- Li Z, Chen J-H, Hao Y, Nair SK (2012) Structures of the PelD Cyclic Diguanylate Effector Involved in Pellicle Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* 287(36):30191-30204 doi:10.1074/jbc.M112.378273
- Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C, Klauck E, Hengge R (2013) The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J* 32(14):2001-2014 doi:10.1038/emboj.2013.120
- Liu LP, Huang LH, Ding XT, Yan L, Jia SR, Dai YJ, Xie YY, Zhong C (2019) Identification of Quorum-Sensing Molecules of N-Acyl-Homoserine Lactone in *Gluconacetobacter* Strains by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* 24(15) doi:10.3390/molecules24152694
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25(4):402-8 doi:10.1006/meth.2001.1262
- Mas A, Torija MJ, García-Parrilla MdC, Troncoso AM (2014) Acetic Acid Bacteria and the Production and Quality of Wine Vinegar. *Sci World J* 2014:394671 doi:10.1155/2014/394671
- Matthysse AG (2018) Exopolysaccharides of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Gelvin SB (ed) *Agrobacterium Biology: From Basic Science to Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp 111-141
- Matthysse AG, White S, Lightfoot R (1995) Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 177(4):1069-1075 doi:10.1128/jb.177.4.1069-1075.1995
- McManus JB, Deng Y, Nagachar N, Kao TH, Tien M (2016) AcsA-AcsB: The core of the cellulose synthase complex from *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. *Enzyme Microb Technol* 82:58-65 doi:10.1016/j.enzmictec.2015.08.015
- Medronho B, Lindman B (2015) Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms. *Adv Colloid Interfac* 222:502-508 doi:10.1016/j.cis.2014.05.004
- Mehta K, Pfeffer S, Brown RM (2015) Characterization of an *acsD* disruption mutant provides additional evidence for the hierarchical cell-directed self-assembly of cellulose in *Gluconacetobacter xylinus*. *Cellulose* 22(1):119-137 doi:10.1007/s10570-014-0521-y
- Mientus M, Kostner D, Peters B, Liebl W, Ehrenreich A (2017) Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a

- new system for their functional expression. *Appl Microbiol Biot* 101(8):3189-3200 doi:10.1007/s00253-016-8069-4
- Mohamad N, Loh EYX, Fauzi MB, Ng MH, Mohd Amin MCI (2019) In vivo evaluation of bacterial cellulose/acrylic acid wound dressing hydrogel containing keratinocytes and fibroblasts for burn wounds. *Drug Deliv Transl Res* 9(2):444-452 doi:10.1007/s13346-017-0475-3
- Mohite BV, Patil SV (2014) Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. *Carbohydr Polym* 106:132-141 doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.012
- Morgan JL, McNamara JT, Zimmer J (2014) Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol* 21(5):489-96 doi:10.1038/nsmb.2803
- Morgan JL, Strumillo J, Zimmer J (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493(7431):181-186 doi:10.1038/nature11744
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73 doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
- Muszyński A, Zarembek KA, Heiss C, Shiloach J, Berg LJ, Audley J, Kozyr A, Greenberg DE, Holland SM, Malech HL, Azadi P, Carlson RW, Gallin JI (2021) *Granulibacter bethesdensis*, a Pathogen from Patients with Chronic Granulomatous Disease, Produces a Penta-Acylated Hypostimulatory Glycero-D-talo-oct-2-ulosonic Acid-Lipid A Glycolipid (Ko-Lipid A). *Int J Mol Sci* 22(7):3303 doi:10.3390/ijms22073303
- Nakai T, Sugano Y, Shoda M, Sakakibara H, Oiwa K, Tuzi S, Imai T, Sugiyama J, Takeuchi M, Yamauchi D, Mineyuki Y (2013) Formation of highly twisted ribbons in a carboxymethylcellulase gene-disrupted strain of a cellulose-producing bacterium. *J Bacteriol* 195(5):958-64 doi:10.1128/jb.01473-12
- Nakano S, Fukaya M (2008) Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 125(1):54-59 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.015
- Newman RH (2008) Simulation of X-ray diffractograms relevant to the purported polymorphs cellulose IVI and IVII. *Cellulose* 15(6):769 doi:10.1007/s10570-008-9225-5
- Nguyen VT, Flanagan B, Mikkelsen D, Ramirez S, Rivas L, Gidley MJ, Dykes GA (2010) Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydr Polym* 80(2):337-343 doi:10.1016/j.carbpol.2009.11.019
- Nicol F, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H, Höfte H (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J* 17(19):5563-5576 doi:10.1093/emboj/17.19.5563
- Nicolas WJ, Ghosal D, Tocheva EI, Meyerowitz EM, Jensen GJ, Brun YV (2021) Structure of the Bacterial Cellulose Ribbon and Its Assembly-Guiding Cytoskeleton by Electron Cryotomography. *J Bacteriol* 203(3):e00371-20 doi:10.1128/JB.00371-20
- Nobles DR, Brown RM (2004) The pivotal role of cyanobacteria in the evolution of cellulose synthases and cellulose synthase-like proteins. *Cellulose* 11(3):437-448 doi:10.1023/B:CELL.0000046339.48003.0e

- Nobles DR, Romanovicz DK, Brown RM, Jr. (2001) Cellulose in Cyanobacteria. Origin of Vascular Plant Cellulose Synthase? *Plant Physiol* 127(2):529-542 doi:10.1104/pp.010557
- O'Sullivan AC (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4(3):173-207 doi:10.1023/A:1018431705579
- Ohad I, Danon D (1964) On The Dimensions of Cellulose Microfibrils. *J Cell Biol* 22(1):302-305 doi:10.1083/jcb.22.1.302
- Ohad I, Danon IO, Hestrin S (1962) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. V. Ultrastructure of polymer. *J Cell Biol* 12:31-46 doi:10.1083/jcb.12.1.31
- Opoku-Temeng C, Sintim HO (2017) Targeting c-di-GMP Signaling, Biofilm Formation, and Bacterial Motility with Small Molecules. *Methods Mol Biol* 1657:419-430 doi:10.1007/978-1-4939-7240-1_31
- Park JK, Jung JY, Park YH (2003) Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnol Lett* 25(24):2055-2059 doi:10.1023/b:bile.0000007065.63682.18
- Park K, Mera PE, Escalante-Semerena JC, Brunold TC (2012) Spectroscopic Characterization of Active-Site Variants of the PduO-type ATP:Corrinoid Adenosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*: Insights into the Mechanism of Four-Coordinate Co(II)corrinoid Formation. *Inorg Chem* 51(8):4482-4494 doi:10.1021/ic202096x
- Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, Johnson DK (2010) Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol Biofuels* 3(1):10 doi:10.1186/1754-6834-3-10
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M (2020) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(11):5607-5612 doi:10.1099/ijsem.0.004332
- Pasteur L (1864) Mémoire sur la fermentation acétique Annales scientifiques de l'École Normale Supérieure. vol 1. Elsevier, p 113-158
- Pear JR, Kawagoe Y, Schreckengost WE, Delmer DP, Stalker DM (1996) Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *P Natl Acad Sci USA* 93(22):12637-12642 doi:10.1073/pnas.93.22.12637
- Pedraza RO (2008) Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 125(1):25-35 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079
- Perugini P, Bleve M, Redondi R, Cortinovis F, Colpani A (2020) In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin. *J Cosmet Dermatol* 19(3):725-735 doi:10.1111/jocd.13051
- 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*. *Appl Microbiol Biot* 97(6):2521-2530 doi:10.1007/s00253-012-4354-z
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605-12 doi:10.1002/jcc.20084
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45-e45 doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Pfaffl MW (2012) Quantification Strategies in Real-time RT-PCR (RT-qPCR). In: Filion M (ed) *Quantitative real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 53-62

- Pfiffer V, Sarenko O, Possling A, Hengge R (2019) Genetic dissection of *Escherichia coli*'s master diguanylate cyclase DgcE: Role of the N-terminal MASE1 domain and direct signal input from a GTPase partner system. *PLoS Genet* 15(4):e1008059 doi:10.1371/journal.pgen.1008059
- Polko JK, Kieber JJ (2019) The Regulation of Cellulose Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* 31(2):282-296 doi:10.1105/tpc.18.00760
- Pultz IS, Christen M, Kulasekara HD, Kennard A, Kulasekara B, Miller SI (2012) The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* 86(6):1424-1440 doi:10.1111/mmi.12066
- Radeck J, Kraft K, Bartels J, Cikovic T, Dürr F, Emenegger J, Kelterborn S, Sauer C, Fritz G, Gebhard S, Mascher T (2013) The *Bacillus* BioBrick Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *J Biol Eng* 7(1):29 doi:10.1186/1754-1611-7-29
- Raspor P, Goranovič D (2008) Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28(2):101-124 doi:10.1080/07388550802046749
- Reimer M, Zollfrank C (2021) Cellulose for Light Manipulation: Methods, Applications, and Prospects. *Adv Energy Mater*:2003866 doi:10.1002/aenm.202003866
- Reis VM, Teixeira KRdS (2015) Nitrogen fixing bacteria in the family *Acetobacteraceae* and their role in agriculture. *J Basic Microbiol* 55(8):931-949 doi:10.1002/jobm.201400898
- Richmond T (2000) Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol* 1(4):reviews3001.1 doi:10.1186/gb-2000-1-4-reviews3001
- Richter AM, Possling A, Malysheva N, Yousef KP, Herbst S, von Kleist M, Hengge R (2020) Local c-di-GMP Signaling in the Control of Synthesis of the *E. coli* Biofilm Exopolysaccharide pEtN-Cellulose. *J Mol Biol* 432(16):4576-4595 doi:10.1016/j.jmb.2020.06.006
- Rietveld HM (1969) A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *J Appl Crystallogr* 2(2):65-71 doi:10.1107/s0021889869006558
- Roe AJ, O'Byrne C, McLaggan D, Booth IR (2002) Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 148(7):2215-2222 doi:10.1099/00221287-148-7-2215
- Römling U, Galperin MY (2015) Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* 23(9):545-557 doi:10.1016/j.tim.2015.05.005
- Römling U, Galperin MY (2017) Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP. In: Sauer K (ed) *c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp 1-8
- Römling U, Galperin MY, Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(1):1-52 doi:10.1128/MMBR.00043-12
- Römling U, Liang ZX, Dow JM (2017) Progress in Understanding the Molecular Basis Underlying Functional Diversification of Cyclic Dinucleotide Turnover Proteins. *J Bacteriol* 199(5) doi:10.1128/jb.00790-16
- Ross P, Mayer R, Benziman M (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 55(1):35-58 doi:10.1128/mr.55.1.35-58.1991
- Ross P, Mayer R, Weinhouse H, Amikam D, Huggirat Y, Benziman M, de Vroom E, Fidder A, de Paus P, Sliedregt LA, van der Marel GA, van Boom JH (1990) The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer,

- trimer, and phosphothioate derivatives. *J Biol Chem* 265(31):18933-18943 doi:10.1016/s0021-9258(17)30606-3
- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, Benziman M (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325(6101):279-281 doi:10.1038/325279a0
- Rozenberga L, Skute M, Belkova L, Sable I, Vikele L, Semjonovs P, Saka M, Ruklisha M, Paegle L (2016) Characterisation of films and nanopaper obtained from cellulose synthesised by acetic acid bacteria. *Carbohydr Polym* 144:33-40 doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.025
- Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, Gomelsky M (2006) The PilZ Domain Is a Receptor for the Second Messenger c-di-GMP: The PilZ Domain Protein YcgR Controls Motility in *Enterobacteria*. *J Biol Chem* 281(41):30310-30314 doi:10.1074/jbc.C600179200
- Ryngajłło M, Kubiak K, Jędrzejczak-Krzepkowska M, Jacek P, Bielecki S (2019) Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains-Efficient bionanocellulose producers. *Microbiologyopen* 8(5):e00731 doi:10.1002/mbo3.731
- Saeman JF (1945) Kinetics of Wood Saccharification - Hydrolysis of Cellulose and Decomposition of Sugars in Dilute Acid at High Temperature. *Industrial & Engineering Chemistry* 37(1):43-52 doi:10.1021/ie50421a009
- Saxena IM, Brown RM, Jr. (1995) Identification of a second cellulose synthase gene (*acsAII*) in *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 177(18):5276-83 doi:10.1128/jb.177.18.5276-5283.1995
- Saxena IM, Kudlicka K, Okuda K, Brown RM, Jr. (1994) Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* 176(18):5735-52 doi:10.1128/jb.176.18.5735-5752.1994
- Saxena IM, Lin FC, Brown RM (1990) Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol Biol* 15(5):673-683 doi:10.1007/BF00016118
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61(1):263-289 doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473(7347):337-342 doi:10.1038/nature10098
- Segal L, Creely JJ, Martin AE, Conrad CM (1959) An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text Res J* 29(10):786-794 doi:10.1177/004051755902901003
- Serra DO, Richter AM, Hengge R (2013a) Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *J Bacteriol* 195(24):5540-5554 doi:10.1128/JB.00946-13
- Serra DO, Richter AM, Klauck G, Mika F, Hengge R, Kolter R (2013b) Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm. *mBio* 4(2):e00103-13 doi:10.1128/mBio.00103-13
- Sievers M, Swings, J. (2005) Family II Acetobacteraceae. In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. vol 2. Springer US, Boston, MA, pp 41-95

- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53(4):1123-1134 doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x
- Sommer A, Dederko-Kantowicz P, Staroszczyk H, Sommer S, Michalec M (2021) Enzymatic and Chemical Cross-Linking of Bacterial Cellulose/Fish Collagen Composites—A Comparative Study. *Int J Mol Sci* 22(7):3346 doi:10.3390/ijms22073346
- Spiers AJ, Bohannon J, Gehrig SM, Rainey PB (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* 50(1):15-27 doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x
- Spiers AJ, Kahn SG, Bohannon J, Travisano M, Rainey PB (2002) Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and Phenotypic Bases of Wrinkly Spreader Fitness. *Genetics* 161(1):33-46 doi:10.1093/genetics/161.1.33
- Standal R, Iversen TG, Coucheron DH, Fjaervik E, Blatny JM, Valla S (1994) A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the *bcs* operon. *J Bacteriol* 176(3):665-72 doi:10.1128/jb.176.3.665-672.1994
- Stecher G, Tamura K, Kumar S (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Mol Biol Evol* 37(4):1237-1239 doi:10.1093/molbev/msz312
- Sugiyama J, Persson J, Chanzy H (1991) Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules* 24(9):2461-2466 doi:10.1021/ma00009a050
- 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*. *J Biosci Bioeng* 115(6):607-12 doi:10.1016/j.jbiosc.2012.12.021
- Surger M, Angelov A, Liebl W (2020) Distribution and diversity of olefins and olefin-biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *Biotechnol Biofuels* 13(1):70 doi:10.1186/s13068-020-01706-y
- Surger MJ, Angelov A, Stier P, Übelacker M, Liebl W (2018) Impact of Branched-Chain Amino Acid Catabolism on Fatty Acid and Alkene Biosynthesis in *Micrococcus luteus*. *Front Microbiol* 9 doi:10.3389/fmicb.2018.00374
- Sychantha D, Brott AS, Jones CS, Clarke AJ (2018) Mechanistic Pathways for Peptidoglycan O-Acetylation and De-O-Acetylation. *Front Microbiol* 9 doi:10.3389/fmicb.2018.02332
- Tahara N, Tonouchi N, Yano H, Yoshinaga F (1998) Purification and characterization of exo-1,4- β -glucosidase from *Acetobacter xylinum* BPR2001. *J Ferment Bioeng* 85(6):589-594 doi:10.1016/S0922-338X(98)80010-X
- Tajima K, Nakajima K, Yamashita H, Shiba T, Munekata M, Takai M (2001) Cloning and sequencing of the beta-glucosidase gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769. *DNA Res* 8(6):263-269 doi:10.1093/dnares/8.6.263
- Tal R, Wong HC, Calhoon R, Gelfand D, Fear AL, Volman G, Mayer R, Ross P, Amikam D, Weinhouse H, Cohen A, Sapir S, Ohana P, Benziman M (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 180(17):4416-25 doi:10.1128/jb.180.17.4416-4425.1998

- Taweecheep P, Naloka K, Matsutani M, Yakushi T, Matsushita K, Theeragool G (2019a) *In Vitro* Thermal and Ethanol Adaptations to Improve Vinegar Fermentation at High Temperature of *Komagataeibacter oboediens* MSKU 3. *Appl Biochem Biotech* 189(1):144-159 doi:10.1007/s12010-019-03003-3
- Taweecheep P, Naloka K, Matsutani M, Yakushi T, Matsushita K, Theeragool G (2019b) Superfine bacterial nanocellulose produced by reverse mutations in the *bcsC* gene during adaptive breeding of *Komagataeibacter oboediens*. *Carbohydr Polym* 226:115243 doi:10.1016/j.carbpol.2019.115243
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4):S1-S5 doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680 doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Thongsomboon W, Serra DO, Possling A, Hadjineophytou C, Hengge R, Cegelski L (2018) Phosphoethanolamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. *Science* 359(6373):334-338 doi:10.1126/science.aao4096
- Tollerson R, II, Ibba M (2020) Translational regulation of environmental adaptation in bacteria. *J Biol Chem* 295(30):10434-10445 doi:10.1074/jbc.REV120.012742
- Tonouchi N (2016) Cellulose and Other Capsular Polysaccharides of Acetic Acid Bacteria. In: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A (eds) *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. Springer Japan, Tokyo, pp 299-320
- Tonouchi N, Tahara N, Kojima Y, Nakai T, Sakai F, Hayashi T, Tsuchida T, Yoshinaga F (1997) A beta-glucosidase gene downstream of the cellulose synthase operon in cellulose-producing *Acetobacter*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61(10):1789-1790 doi:10.1271/bbb.61.1789
- Trček J, Barja F (2015) Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Microbiol* 196:137-144 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.003
- Trček J, Dogsa I, Accetto T, Stopar D (2021) Acetan and Acetan-Like Polysaccharides: Genetics, Biosynthesis, Structure, and Viscoelasticity. *Polymers* 13(5):815 doi:10.3390/polym13050815
- Trevelyan WE, Forrest RS, Harrison JS (1952) Determination of yeast carbohydrates with the anthrone reagent. *Nature* 170(4328):626-7 doi:10.1038/170626a0
- Tuckerman JR, Gonzalez G, Sousa EHS, Wan X, Saito JA, Alam M, Gilles-Gonzalez M-A (2009) An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and Phosphodiesterase Couple for c-di-GMP Control. *Biochemistry-US* 48(41):9764-9774 doi:10.1021/bi901409g
- Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11(12):2301-2319 doi:10.1038/nprot.2016.136
- Umeda Y, Hirano A, Ishibashi M, Akiyama H, Onizuka T, Ikeuchi M, Inoue Y (1999) Cloning of cellulose synthase genes from *Acetobacter xylinum* JCM 7664: implication of a novel set of cellulose synthase genes. *DNA Res* 6(2):109-115 doi:10.1093/dnares/6.2.109
- Updegraff DM (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal Biochem* 32(3):420-424 doi:10.1016/S0003-2697(69)80009-6

- Valera MJ, Torija MJ, Mas A, Mateo E (2015) Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Appl Microbiol Biot* 99(3):1349-61 doi:10.1007/s00253-014-6198-1
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S (2021) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50(D1):D439-D444 doi:10.1093/nar/gkab1061
- Wang B, Shao Y, Chen F (2015) Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 31(2):255-263 doi:10.1007/s11274-015-1799-0
- Weiss-Muszkat M, Shakh D, Zhou Y, Pinto R, Belausov E, Chapman MR, Sela S (2010) Biofilm Formation by and Multicellular Behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an Atypical Enteropathogenic Strain. *Appl Environ Microb* 76(5):1545-1554 doi:10.1128/AEM.01395-09
- Whelan JA, Russell NB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278(1):261-269 doi:10.1016/S0022-1759(03)00223-0
- Wong HC, Fear AL, Calhoon RD, Eichinger GH, Mayer R, Amikam D, Benziman M, Gelfand DH, Meade JH, Emerick AW (1990) Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *P Natl Acad Sci USA* 87(20):8130-4 doi:10.1073/pnas.87.20.8130
- Wüstenberg T (2014) Cellulose. In: Wüstenberg T (ed) *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry*. pp 91-142
- Yamada Y, Yukphan P (2008) Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 125(1):15-24 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077
- Yamada Y, Yukphan P, Lan Vu HT, Muramatsu Y, Ochaikul D, Tanasupawat S, Nakagawa Y (2012a) Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J Gen Appl Microbiol* 58(5):397-404 doi:10.2323/jgam.58.397
- Yamada Y, Yukphan P, Vu HTL, Muramatsu Y, Ochaikul D, Nakagawa Y (2012b) Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -*Proteobacteria*. *Ann Microbiol* 62(2):849-859 doi:10.1007/s13213-011-0288-4
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26(13):1608-1615 doi:10.1093/bioinformatics/btq249
- Zarembek KA, Marshall-Batty KR, Cruz AR, Chu J, Fenster ME, Shoffner AR, Rogge LS, Whitney AR, Czapiga M, Song HH, Shaw PA, Nagashima K, Malech HL, DeLeo FR, Holland SM, Gallin JI, Greenberg DE, Payne SM (2012) Innate Immunity against *Granulibacter bethesdensis*, an Emerging Gram-Negative Bacterial Pathogen. *Infect Immun* 80(3):975-981 doi:10.1128/IAI.05557-11
- Zhang H, Xu X, Chen X, Yuan F, Sun B, Xu Y, Yang J, Sun D (2017) Complete genome sequence of the cellulose-producing strain *Komagataeibacter nataicola* RZS01. *Sci Rep* 7(1):4431 doi:10.1038/s41598-017-04589-6

Literaturverzeichnis

- Zhang T-Z, Liu L-P, Ye L, Li W-C, Xin B, Xie Y-Y, Jia S-R, Wang T-F, Zhong C (2021) The production of bacterial cellulose in *Gluconacetobacter xylinus* regulated by *luxR* overexpression of quorum sensing system. *Appl Microbiol Biot* 105(20):7801-7811 doi:10.1007/s00253-021-11603-5
- Zhang Y, Werling U, Edelmann W (2014) Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) cloning method. *Methods Mol Biol* 1116:235-44 doi:10.1007/978-1-62703-764-8_16

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Cellobiose.....	7
Abbildung 2. Schema bakterieller Cellulosesynthese in <i>K. hansenii</i>	11
Abbildung 3. Struktur der Cellulosesynthase-benachbarten Gene und die Organisation der drei Gencluster in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	13
Abbildung 4. Struktur der Cellulosesynthase-benachbarten Gene und die Organisation in drei Genclustern in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.....	13
Abbildung 5. Schema des markerfreien Deletionssystems.	28
Abbildung 6. Gluten Extensibility Rig	39
Abbildung 7. Phylogenetischer Baum des Genus <i>Komagataeibacter</i> basierend auf 16S rRNA Sequenzierung.	53
Abbildung 8. Phylogenetischer Baum basierend auf der Proteinsequenz der Cellulosesynthasen in beiden <i>Komagataeibacter</i> Stämmen.....	54
Abbildung 9. Exemplarisches Gel nach Überprüfungs-PCR zum Nachweis der Integration des Deletionsplasmids.....	65
Abbildung 10. Biofilmbildung von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (A) bzw. <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 (B) nach 6 Tagen statischer Kultur ohne Schütteln in HS-Medium nach Inokulation mit einer Einzelkolonie.	68
Abbildung 11. Biofilmbildung in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und Deletionsmutanten davon nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultur in HS-Medium bei 25 °C.	70
Abbildung 12. Biofilmbildung in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 und Deletionsmutanten davon nach 14 Tagen stehender, statischer Kultur in HS-Medium bei 25 °C.	72
Abbildung 13. Anthron-Assay-Reaktionen mit hydrolysierten Celluloseproben von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 Kulturen.....	74
Abbildung 14. Quantifizierung der Celluloseproduktion in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und Deletionsmutanten davon mittels kolorimetrischem Anthron-Assay.	75
Abbildung 15. Trockenmasse des Cellulosebiofilms in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 nach 6 Tagen Kultivierung ohne Schütteln bei 25 °C in HS-Medium.	78
Abbildung 16. FTIR-Spektrogramm zur Identifikation der Cellulose in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.	81
Abbildung 17. Elastizitätsmodul gemessen in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 nach 21 Tagen unbewegter, statischer Kultur.....	84
Abbildung 18. REM Aufnahmen des Cellulose Biofilms von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	88

Anhang

Abbildung 19. Biofilme nach Dehydratisierung in Aceton und Fixierung in Glutardialdehyd.	89
Abbildung 20. Analyse der Wirkung von Aceton auf Membranen aus Celluloseacetat (CA).	90
Abbildung 21. Fixierung des Biofilms über Nacht in 2,5 % Glutardialdehyd verbessert die Darstellung.....	90
Abbildung 22. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Biofilmproben aus <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	92
Abbildung 23. Rasterelektronenmikroskopie <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.....	95
Abbildung 24. Schema zur Konstruktion der Insertion von Fluoreszenz-Reporter-Genen in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	99
Abbildung 25. Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie nach Fusion der ORF von sfGFP an (<i>bcsD</i>) <i>bcsAB1</i> , mRFP1 an <i>bcsAB2</i> und mKalama1 an <i>bcsAB3</i> in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	100
Abbildung 26. Zeitlicher Verlauf der relativen Expressionsstärke der CS-Gene <i>bcsAB1</i> , <i>bcsAB2</i> und <i>bcsAB3</i>	103
Abbildung 27. Relative Quantifizierung der Transkription der Cellulosesynthese-Gene in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 an Tag 21	104
Abbildung 28. <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 Expression der CS-Gene nach absoluter Quantifizierung der gebildeten Transkripte.....	105
Abbildung 29. Charakterisierung der Proteinsynthese in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und <i>K. hansenii</i> $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	109
Abbildung 30. Charakterisierung der Proteinbildung in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 und <i>K. hansenii</i> $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$	110
Abbildung 31. Schwimm- und Schwarmaktivität von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	119
Abbildung 32. Motilität von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 und den DGC-Deletionsstämmen. ..	120
Abbildung 33. Proteinstruktur von BcsAB1 in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	126
Abbildung 34. Schema der möglichen Zusammenlagerung der Cellulosefasern in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.	139

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Bereits vorhandene Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	23
Tabelle 2. Ausgangsplasmide.....	23
Tabelle 3. Medienzusätze	23
Tabelle 4. Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	24
Tabelle 5. PCR Ansatz S7 Fusion Polymerase	32
Tabelle 6. 3-stufiges PCR Programm bei Amplifikationen mit S7 Fusion Polymerase.....	32
Tabelle 7. Zusammensetzung des PCR Ansatzes PrimeStar Max.....	33
Tabelle 8. PCR-Programm zur Amplifikation mit PrimeStar Max.....	33
Tabelle 9. PCR Ansatz mit Phire Hot Start II DNA Polymerase	33
Tabelle 10. 3-stufiges PCR Programm bei Phire Hot Start II DNA Polymerase	34
Tabelle 11. Reaktionsansatz Restriktionsverdau.....	34
Tabelle 12. Restriktionsverdau mit FD- <i>DpnI</i>	34
Tabelle 13. Bestimmung der PCR-Effizienz.....	41
Tabelle 14. Programm der RT-qPCR.....	41
Tabelle 15. Übersicht der an der Cellulosesynthese beteiligten Proteine.	44
Tabelle 16. Die Proteine der Glucose-Aktivierung sowie die der analysierten DGCs.	44
Tabelle 17. Dehydratisierung der Biofilmprouben zur Fluoreszenzmikroskopie.....	45
Tabelle 18. Dehydratisierung BC für REM.....	47
Tabelle 19. BLASTp-Analyse der Aminosäuresequenzen der Cellulosesynthasen der <i>K. hansenii</i> Stämme	56
Tabelle 20. BLASTn-Analyse der Nukleotidsequenzen der Cellulosesynthase-Gene der <i>K. hansenii</i> Stämme	56
Tabelle 21. BLASTp-Analyse der Aminosäuresequenzen der Kanalproteine in den <i>K. hansenii</i> Stämmen	57
Tabelle 22. BLASTn-Analyse der Kanalprotein-Gensequenzen in den <i>K. hansenii</i> Stämmen	58
Tabelle 23. Übersicht über die in dieser Arbeit erzeugten markerfreien Deletions-, Expressions- und Insertionsstämme von <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.	62
Tabelle 24. Übersicht über die in dieser Arbeit entstandenen markerfreien Deletionsstämme von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.	64
Tabelle 25. Kristallinitäts-Indices (CI) bakterieller Cellulose in <i>K. hansenii</i>	82
Tabelle 26. Berechnung des Elastizitätsmoduls in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.	85
Tabelle 27. Wassergehalt der von <i>K. hansenii</i> ATCC 53582 gebildeten Cellulosebiofilme...	86

Anhang

Tabelle 28. Veränderung des Cellulosefaser-Durchmessers in <i>K. hansenii</i> ATCC 53582.....	96
Tabelle 29. Relative Änderungen der Synthese der an der Glucose-Aktivierung beteiligten Enzyme in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	113
Tabelle 30. Relative Veränderung der regulatorischen DGCs in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 und <i>K. hansenii</i> ATCC 53582	114
Tabelle 31. Proteinnachweis eindeutig beschränkt auf den Wildtyp oder die CS-Doppeldeletionsmutante in <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 bzw. <i>K. hansenii</i> ATCC.	116

7.3 Tabellen

Oligonukleotide zur Konstruktion der Deletionsplasmide – *K. hansenii* ATCC 23769

Primername	Sequenz	Verwendung
pKOS6b_F	AGCGCCAATACGCAAAC	Kontrolle des pKOS6b- Plasmids
pKOS6b_R	CTTTGCAGGGCTTCCCAAC	
FL A-SL_DgcA_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGCCAGG TCGATCGGTTCTCAAG	Amplifikation der oberen Flanke
FL A-SL_DgcA_R	CTTTCTCCCCCTGAGGTTGATGAAG TCTAAGGCAACATTCCAGCGTATC	
FL B-SL_DgcA_F	GATACGCTGGAATGTTGCCTTAGAC TTCATCAACCTCAGGGGAGAAAAG	Amplifikation der unteren Flanke
FL B-SL_DgcA_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTCTGGG ACGTGATCCAATCACTC	
pKOS6b_SL-DgcA_F	GAGTGATTGGATCACGTCCCGACAT GGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-DgcA_R	CTTGAGGAACCGATCGACCTGGCAC AACATACGAGCCGGAAG	
FL A-SL_DgcB_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGGGGAT GCTCAACCTGCATTAC	Amplifikation der oberen Flanke
FL A-SL_DgcB_R	GAACATCACCTGCGTCATGGTGCG TTTCCCTCAGACCTGAAAACG	
FL B-SL_DgcB_F	CGTTTTTCAGGTCTGAGGGAAACGCA CCATGACGCAGGGTGATGTTC	Amplifikation der unteren Flanke
FL B-SL_DgcB_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTGTCTG GCCATGACATGTGGTTTCC	
pKOS6b_SL-DgcB_F	GGAAACCACATGTCATGGCCGACAC ATGGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-DgcB_R	GTAATGCAGGTTGAGCATCCCCACA ACATACGAGCCGGAAG	

Anhang

Oligonukleotide zur Konstruktion der Deletionsplasmide – *K. hansenii* ATCC 53582

Primername	Sequenz	Verwendung
Fla A-SL_AB1_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTTTCGAT CAGGCGGAGCATGACAC	Amplifikation der oberen Flanke
Fla A-SL_AB1_R	GAAGCATATCGTTTATGGGTACACAG GGACAGGCGGTCCGCTGAATA	
Fla B-SL_AB1_F	TATTCAGGCGACCGCCTGTCCCTGT GACCCATAAACGATATGCTTC	Amplifikation der unteren Flanke
Fla B-SL_AB1_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTCCTT GGCATTGAGGTTGAGTG	
pKOS6b_SL-AB1_F	CACTGAACCTGAATGCCAAGGACAT GGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-AB1_R	GTGTCATGCTCCGCCTGATCGAACA CAACATACGAGCCGGAAG	
Fla A-SL_AB2_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGGTTGC ATCGGCCTGTATTTAC	Amplifikation der oberen Flanke
Fla A-SL_AB2_R	GCTGTCCCCGGGGATTTGAAGGTAC GATGCGTCGGGGGATATGTCCG	
Fla B-SL_AB2_F	CGGACATATCCCCGACGCATCGTA CCTTCAAATCCCCGGGGACAGC	Amplifikation der unteren Flanke
Fla B-SL_AB2_R	CCAGTCTAGCTATGCCATGTGCATG TTGAGCGAGGCATAGTG	
pKOS6b_SL-AB2_F	CACTATGCCTCGCTCAACATGCACA TGGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-AB2_R	GTGAAATACAGGCCGATGCAACCAC AACATACGAGCCGGAAG	
Fla A-SL_AB3_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGGCACC ATACTCCATAGCGTAAC	Amplifikation der oberen Flanke
Fla A-SL_AB3_R	CATACATGGTCGGTTTTCTTCTGTTA ATATGCCGGTTTAAAGGATAATC	
Fla B-SL_AB3_F	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTGAC GCATTTGCGCCATCATCTG	Amplifikation der unteren Flanke
Fla B-SL_AB3_R	GATTATCCTTTAAACCGGCATATTAA CAGAAGGAAACCGACCATGTATG	
pKOS6b_SL-AB3_F	CAGATGATGGCGAAATGCGTCGACA TGGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-AB3_R	GTTACGCTATGGAGTATGGTGCCAC AACATACGAGCCGGAAG	
Fla A-SL_DgcA_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGCAC ATCTCCAGCGTATC	Amplifikation der oberen Flanke
Fla A-SL_DgcA_R	CTTTCTCCCCCTGAGGTTGATGAAG TCTAAGGCAACATTCCAG	

Anhang

Primername	Sequenz	Verwendung
Fla B-SL_DgcA_F	CTGGAATGTTGCCTTAGACTTCATCA ACCTCAGGGGGAGAAAG	Amplifikation der unteren Flanke
Fla B-SL_DgcA_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTTGTTT GCCCTTGCCTATGTGAC	
pKOS6b_SL-DgcA_F	GTCACATAGGCAAGGGCAAACAACA TGGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-DgcA_R	GATACGCTGGAAGATGTGCACACAA CATACGAGCCGGAAG	
Fla A-SL_DgcB_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGCGGCC ATGACATGTGGTTTCC	Amplifikation der oberen Flanke
Fla A-SL_DgcB_R	CGTTTTCAGGTCTGAGGGAAACGCA CCATGACGCAGGGTGAT	
Fla B-SL_DgcB_F	ATCACCCCTGCGTCATGGTGC GTTTC CCTCAGACCTGAAAACG	Amplifikation der unteren Flanke
Fla B-SL_DgcB_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTGGGA TGCTCAACCTGCATTAC	
pKOS6b_SL-DgcB_F	GTAATGCAGGTTGAGCATCCCACAT GGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-DgcB_R	GGAAACCACATGTCATGGCCGCACA ACATACGAGCCGGAAG	
Fla A-SL_bcsY_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGCGGTA TCCACATCCGCATTACG	Amplifikation der oberen Flanke
Fla A-SL_bcsY_R	GTGAAATACAGGCCGATGCAACAGC GTGCGGGGCGATGTACC	
Fla B-SL_bcsY_F	GGTACATCGCCCCGCACGCTGTTG CATCGGCCTGTATTTAC	Amplifikation der unteren Flanke
Fla B-SL_bcsY_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTGGAT GTGGCTGGACTGGTATCTC	
pKOS6b_SL-bcsY_F	GAGATACCAGTCCAGCCACATCCAC ATGGCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-bcsY_R	CGTGAATGCGGATGTGGATAACCGCA CAACATACGAGCCGGAAG	

**Primer zur Kontroll-PCR der Ziel-Gene, sowie Primer zur Sequenzierung –
K. hansenii ATCC 23769**

Primername	Sequenz	Verwendung
bcsAB1_F	CGTTGACGCTGCTCGTTTAC	Amplifikation <i>bcsAB1</i>
bcsAB1_R	GCAAATCCGCCAGCATAAAGG	
bcsAB2_F	GTTCCAACGCAACGAGATTCTG	Amplifikation <i>bcsAB2</i>
bcsAB2_R	GCAGGCATAATCACGCACATAG	
bcsAB3_F	CGAATATGCGGGAGTTGGTTTG	Amplifikation <i>bcsAB3</i>
bcsAB3_R	GTAACATGGCCCATGCCTCTTC	
dgcA_F	TCTGCACATCTTCCAGCGTATC	Amplifikation <i>dgcA</i>
dgcA_R	CCTTGCGACCGTCTATGCCATC	
dgcB_F	TTTCGTGCAGTGTTCGGTATCAG	Amplifikation <i>dgcB</i>
dgcB_R	CCTTCCTTGGCACATTCATGG	
bcsD_F	TATAACGGGCGTGGCAAGTATG	Amplifikation der Insertions- Stelle von sfGFP
bcsD_R	CTCGCCCGCATATTCGAAATTG	
GFP_ins_seq_F	GGGTGCGTTTGGTGATTATG	Sequenzierung der <i>sfGFP</i> - Insertion
GFP_ins_seq_R	GTCGCTTCAACATCAGAACC	
RFP_ins_seq_F	TGTGGCTGGACTGGTATCTC	Sequenzierung der <i>mRFP1</i> - Insertion
RFP_ins_seq_R	GCAAGAAGTGCCTCATCTC	
mKalama1_ins_seq_F	TCGGGCGATCTATCAGCTCAC	Sequenzierung der <i>mKalama1</i> -Insertion
mKalama1_ins_seq_R	TGATCGCCATCCCGTTTACTG	

**Primer zur Kontroll-PCR der Ziel-Gene, sowie Primer zur Sequenzierung –
K. hansenii ATCC 53582**

Primernamen	Sequenz	Verwendung
acsAB_F acsAB_R	CGTTGACGCTGCTCGTTTACATC CGGGTGTAACCGGTAACCATGAC	Amplifikation <i>bcsAB1</i>
acsAB2_F acsAB2_R	ATCACGGCCACCATGCATAAC GTGTGCTGAGATAGCCGAAC	Amplifikation <i>bcsAB2</i>
acsAB3_F acsAB3_R	AGCGATGGTCCCAATACTTC CCTTCGGCTTCATGGATCTTAC	Amplifikation <i>bcsAB3</i>
acsAB_seq_F acsAB_seq_R	CGCACATCAGCATCGTCCATAAG CAGCCAGCGTCTGGTAATATTC	Sequenzierung von <i>bcsAB1</i>
acsAB2_seq_F acsAB2_seq_R	CAGTACCGACAGGAGCGAATC GGGCCTGTTAACCCCTTAAAGC	Sequenzierung von <i>bcsAB2</i>
acsAB3_seq_F acsAB3_seq_R	CTTCGCCTCCAATCTAAGGTG CCCTCCTCTATCTGCTCATTG	Sequenzierung von <i>bcsAB3</i>
DgcA_F DgcA_R	CTAACAGGGCTGTCAGATAGG GATCCTGTTCCCTGTGGATACTG	Amplifikation <i>dgcA</i>
DgcA_seq_F DgcA_seq_R	CCGCTCCTTGGTGTTCATCAG ACGGCCCTGTACCCAATATCG	Sequenzierung von <i>dgcA</i>
DgcB_F DgcB_R	CGGACATCCTGCATAGAATTGG CCGTCCTACAGCAACCATATC	Amplifikation <i>dgcB</i>
DgcB_seq_F DgcB_seq_R	GTCGGAATGCACGATATAACC TTGCTTGAGGAGCTGAAGTG	Sequenzierung von <i>dgcB</i>
bcsY_F bcsY_R	CCGACACGATATAGGGATGG ACAGGCTGACAAGCTATCG	Amplifikation <i>bcsY</i>

Anhang

Primer zur Konstruktion von Fluoreszenz-Fusionen – *K. hansenii* ATCC 23769

Primername	Sequenz	Verwendung
acsAB-23769-Pro_SL_for	CTTATTCAGGCGTAGCACCAGTCTG TGCTTTACTTGCTTCTTTTC	Amplifikation der Promotor-Region
acsAB-23769-Pro_SL_rev	CAGCTCTTCGCCTTTACGCATCATG GAAATCAACTGCATCAGATCTTAC	
GFP_pJPB125_SL_for	GTAAGATCTGATGCAGTTGATTTCCA TG	Amplifikation von <i>sfGFP</i>
GFP_pJPB125_SL_rev	CCATGATTACGCCAAGCGTCATTTGT ACAGTTCATCCATAACC	
pMM3b_SL2_acsAB_Prom-23769_for	GGTATGGATGAACTGTACAAATGAC GCTTGGCGTAATCATGG	Amplifikation des Vektors
pMM3b_SL_acsAB_Prom-23769_rev	GAAAAGAAGCAAGTAAAGCACAGAC TGGTGCTACGCCTGAATAAG	
FI A-SL_GFP_ins_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGTG GTTATGCCATCCAGAC	Amplifikation der oberen Flanke
FI A-SL_GFP_ins_R	CAGCTCTTCGCCTTTACGCATGCCT CAGGTCGCGGAACTG	
FI B-SL_GFP_ins_F	GGTATGGATGAACTGTACAAATGAA GGACAACGGCGGTCTGG	Amplifikation der unteren Flanke
FI B-SL_GFP_ins_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTTGAA GCGTCATGTGCGACAG	
pJPB125_SL-GFP_ins_F	CAGTTCGCGACCTGAGGCATGCGT AAAGGCGAAGAGCTG	Amplifikation von <i>sfGFP</i>
pJPB125_SL-GFP_ins_R	CCAGACCGCCGTTGTCTTCATTTG TACAGTTCATCCATAACC	
pKOS6b_SL-GFP_ins_F	CTGTGCGACATGACGCTTCAACATG GCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-GFP_ins_R	GTCTGGATGGCATAACCACCACACA ACATACGAGCCGGAAG	
FI A-SL_RFP_ins_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTTGTTG GGCAGAACCAGTTGAAG	Amplifikation der oberen Flanke
FI A-SL_RFP_ins_R	CGTCTTCGGAGGAAGCCATGTATCA GTGCGATGCGTCGGTC	
FI B-SL_RFP_ins_F	GTCACCTCCACCGGTGCTTAAGATGC GTCGGGAGATATG	Amplifikation der unteren Flanke
FI B-SL_RFP_ins_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTGTCA CGCGAAAGAACTC	
pBSC1_SL-RFP_ins_F	GACCGACGCATCGCACTGATACATG GCTTCCTCCGAAGACG	Amplifikation von <i>mRFP1</i>
pBSC1_SL-RFP_ins_R	CATATCTCCCGACGCATCTTAAGCA CCGGTGGAGTGAC	
pKOS6b_SL-RFP_ins_F	GAGTTCTTTCCGCGTGACACATGGC GATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-RFP_ins_R	CTTCAACTGGTTCTGCCCGAACAAC AACATACGAGCCGGAAG	

Anhang

Primername	Sequenz	Verwendung
FI A-SL_mKalama1_ins_F	CTTCCGGCTCGTATGTTGTCACATTG CCGCTGTCCTCTAC	Amplifikation der oberen Flanke
FI A-SL_mKalama1_ins_R	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATTTC TAATGCCCGGCG	
FI B-SL_mKalama1_ins_F	GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAA GGGTATCAGGGCCGGATG	Amplifikation der unteren Flanke
FI B-SL_mKalama1_ins_R	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTTTGG TCAAGGCAGCCGTAGG	
mKalama1_SL_ins_F	CGCCGGGGCATTAGGAAATGGTGA GCAAGGGCGAGGAG	Amplifikation von <i>mKalama1</i>
mKalama1_SL_ins_R	CATCCGGCCCTGATACCCTTTACTT GTACAGCTCGTCCATGCC	
pKOS6b_SL-mKala_ins_F	CCTACGGCTGCCTTGACCAAACATG GCGATAGCTAGACTGG	Amplifikation des Vektors
pKOS6b_SL-mKala_ins_R	GTAGAGGACAGCGGCAATGTGACAA CATACGAGCCGGAAG	

Primer zur Verwendung in RT-qPCR – *K. hansenii* ATCC 23769 und ATCC 53582

Primername	Sequenz	Verwendung
ATP-Syn_F	GACGGGCGTATCGTCCTTATG	Amplifikation der ATP synthase
ATP-Syn_R	ATCGGGCCGGATGTCAATCAG	
RNA-Poly_F	GAATCCGCCAGATTGCAGACC	Amplifikation der RNA polymerase
RNA-Poly_R	CAGCGCAGTCCATTGGTGAAC	
qPCR_bcsAB1_F	CGCTGAACGAGCAGTATATC	RT-qPCR Primer <i>bcsAB1</i>
qPCR_bcsAB1_R	GTTTCCGCTGACGAAGAAG	
qPCR_bcsAB2_F	GGGTGACAACAAGCTGAAC	RT-qPCR Primer <i>bcsAB2</i>
qPCR_bcsAB2_R	CGGTGGAGAAATCGGAAATAC	
qPCR_bcsAB3_F	CAGCCTGATTATCGTCCTTG	RT-qPCR Primer <i>bcsAB3</i>
qPCR_bcsAB3_R	CCGTAAGTTCGAAGGGAATG	
qPCR_gyrA_F	GCTCGCTCTCGTCATAATTG	RT-qPCR Primer Referenzgen <i>gyrA</i>
qPCR_gyrA_R	GCCGCCATGCGTTATAC	
qPCR_recA_F	TGGACAGCCTTCTCATCA	RT-qPCR Primer Referenzgen <i>recA</i>
qPCR_recA_R	ATCACCAGCAGTCAATC	

Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Plasmide

Verwendete Deletionsplasmide

Plasmidname	Verwendung Deletion von
<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	
pKOS6b_Δ <i>acsAB</i>	Cellulosesynthase-Gen <i>bcsAB1</i>
pKOS6b_Δ <i>acsAB2</i>	Cellulosesynthase-Gen <i>bcsAB2</i>
pKOS6b_Δ <i>acsAB3</i>	Cellulosesynthase-Gen <i>bcsAB3</i>
pKOS6b_Δ <i>dgcA</i> _23769	Diguanylatcyclase-Gen <i>dgcA</i>
pKOS6b_Δ <i>dgcB</i> _23769	Diguanylatcyclase-Gen <i>dgcB</i>
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	
pKOS6b_Δ <i>acsAB</i> _53582	Cellulosesynthase-Gen <i>bcsAB1</i>
pKOS6b_Δ <i>acsAB2</i> _53582	Cellulosesynthase-Gen <i>bcsAB2</i>
pKOS6b_Δ <i>acsAB3</i> _53582	Cellulosesynthase-Gen <i>bcsAB3</i>
pKOS6b_Δ <i>pdeA1-dgc1</i> _53582	Diguanylatcyclase-Gen <i>dgcA</i>
pKOS6b_Δ <i>dgc2</i> _53582	Diguanylatcyclase-Gen <i>dgcB</i>

Verwendete Plasmide Fluoreszenzfusion

Plasmidname	Verwendung Deletion von
pMM3b_P- <i>acsAB</i> -23769-GFP	Expression von sfGFP unter der Promotorregion von <i>bcsAB1</i> im Plasmidbackbone von pMM3b
pKOS6b_INS_GFP_Δ <i>acsD</i> _23769	Insertion von sfGFP an <i>bcsAB1</i>
pKOS6b_INS_RFP_Δ <i>acsAB2</i> _23769	Insertion von mRFP1 an <i>bcsAB2</i>
pKOS6b_INS_mKalama1_Δ <i>acsAB3</i> _23769	Insertion von mKalama1 an <i>bcsAB3</i>

7.4 Abbildungen

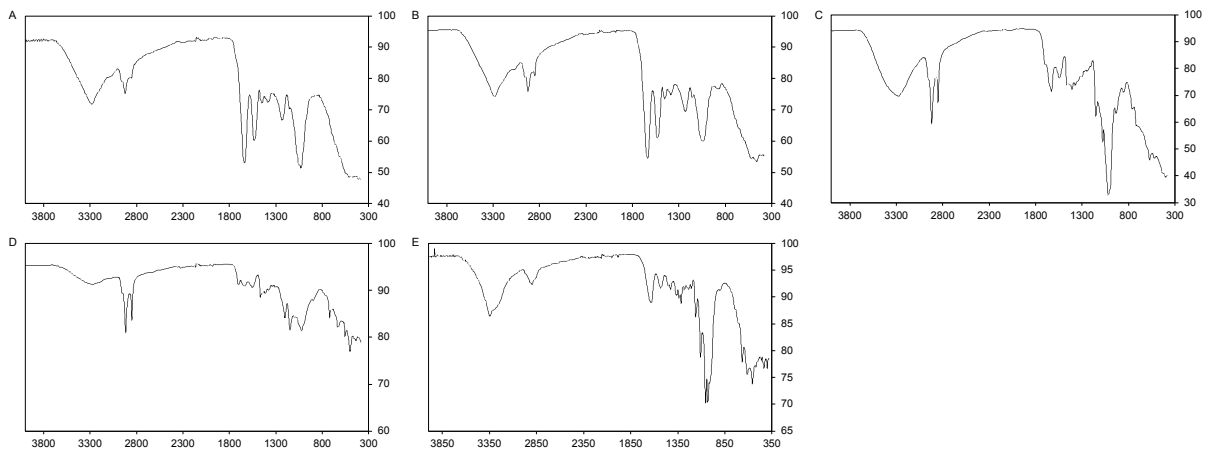


Abbildung S 1. FTIR-Spektren der von *K. hansenii* ATCC 23769 erzeugten Stämme. A: *K. hansenii* $\Delta bcsAB2$; B: *K. hansenii* $\Delta bcsAB3$; C: *K. hansenii* $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB2$; D: *K. hansenii* $\Delta bcsAB1 \Delta bcsAB3$; E: *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$.

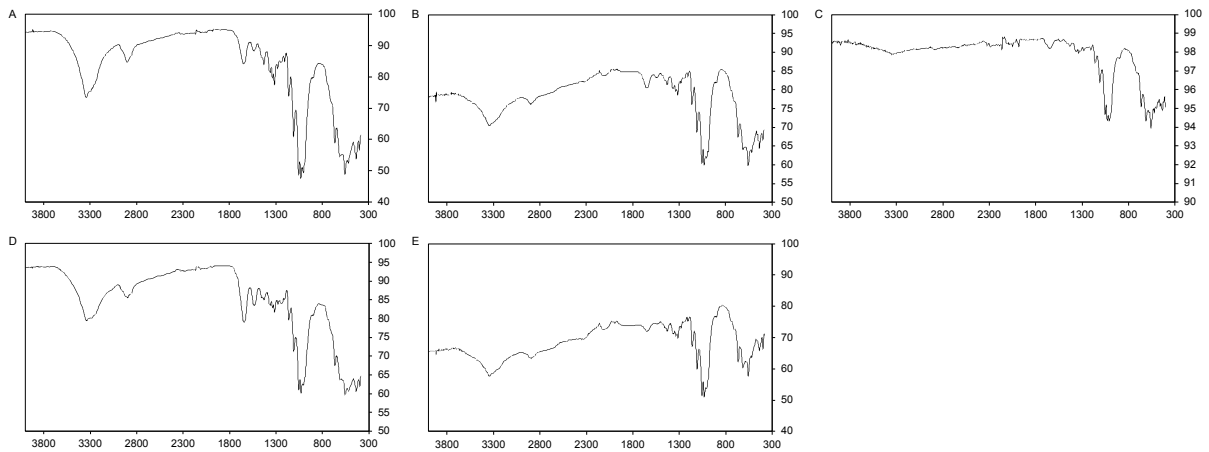


Abbildung S 2. FTIR-Spektren der von *K. hansenii* ATCC 53582 erzeugten Stämme. A: *K. hansenii* $\Delta bcsAB2$; B: *K. hansenii* $\Delta bcsAB3$; C: *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$; D: *K. hansenii* $\Delta bcsY$; F: *K. hansenii* $\Delta dgcA$.

Anhang

Page 1 sp|POCW87|ACSA1_KOMXY Cellulose synthase 1 OS=Komagataeibacter xylinus OX=28448 GN=acsAB PE=1 SV=1

		1		110
sp Q76KJ8 A...	MPEVRSSTQSESGMSQWGMKILSIRGAGLIIGVFGLCALIAATSVTLPEQQLIVAFVVCVVIFFIVGHKPSRRSQIFLEVLGSLVSRYLWRLTETLSFDTWLQGLLGT			
sp POCW87 A...	MPEVRSSTQSESGMSQWGMKILSIRGAGLIIGVFGLCALIAATSVTLPEQQLIVAFVVCVVIFFIVGHKPSRRSQIFLEVLGSLVSRYLWRLTETLSFDTWLQGLLGT			
.....				
		111	Catalytic subdomain A: 147 - 241 gesamter katalytischer Bereich: 152 - 443	220
sp Q76KJ8 A...	MLLVAELYALMMLFLSYFQTIAPLHRAPLPLPPNDEWPTVDIFVPTTYNEELSIVRLTVLGSGLIDWPPEKVRVHILDDGRRPEFAFAAECGANYIARPTNEHAKAGNL			
sp POCW87 A...	MLLVAELYALMMLFLSYFQTIAPLHRAPLPLPPNDEWPTVDIFVPTTYNEELSIVRLTVLGSGLIDWPPEKVRVHILDDGRRPEFAFAAECGANYIARPTNEHAKAGNL			
.....				
		221		330
sp Q76KJ8 A...	NYAIGHTDGDYILIFDCHVPTRAFQLTMGWMVEDPKIALMQTPHHFYSPDPFQRNLSAGYRTPPEGNLFYGVVQDGNDFWDTFFCGSCAILRRTAIEQIGGFATQTV			
sp POCW87 A...	NYAIGHTDGDYILIFDCHVPTRAFQLTMGWMVEDPKIALMQTPHHFYSPDPFQRNLSAGYRTPPEGNLFYGVVQDGNDFWDTFFCGSCAILRRTAIEQIGGFATQTV			
.....				
		331	Cellulose Synthase: 316 - 443	440
sp Q76KJ8 A...	TEDAHTALKMQLGWSTAYLRIPLAGGLATERLLIHIGQRVWRWARGMLQIFRIDNPLFGRGLSWGQRLCYLSAMTSFLFAVPRVIFLSSPLAFFGQNIIAASPLALLA			
sp POCW87 A...	TEDAHTALKMQLGWSTAYLRIPLAGGLATERLLIHIGQRVWRWARGMLQIFRIDNPLFGRGLSWGQRLCYLSAMTSFLFAVPRVIFLSSPLAFFGQNIIAASPLALLA			
.....				
		441		550
sp Q76KJ8 A...	YAIPIHMFHAVGTASKINKGWRYSEFWSEVYETTMALFLRVITVTLSPSRGKFNVDKGGLEKGYFDLGAVYVNIILGLIMFGGLARGVYELSGHLDQIAERAYLLNS			
sp POCW87 A...	YAIPIHMFHAVGTASKINKGWRYSEFWSEVYETTMALFLRVITVTLSPSRGKFNVDKGGLEKGYFDLGAVYVNIILGLIMFGGLARGVYELSGHLDQIAERAYLLNS			
.....				
		551	PIZ: 572 - 647	660
sp Q76KJ8 A...	AWAMLSLIIILAAIAVGRETQQKRNSHRIPATIPVEVANADGSIIVTGVTEDELSMGGAAVKMSWPAKLSGPTPVYIRTVDLGEELILPARIIRAGNRCRGIFIWTIDNLQ			
sp POCW87 A...	AWAMLSLIIILAAIAVGRETQQKRNSHRIPATIPVEVANADGSIIVTGVTEDELSMGGAAVKMSWPAKLSGPTPVYIRTVDLGEELILPARIIRAGNRCRGIFIWTIDNLQ			
.....				
		661		770
sp Q76KJ8 A...	EFSVIRLVFGRADAWDNGNYKADRPLLSDMDVLSVKGFLFRSGDVIHRSGPTKPSAGNALSDDTNPNRKRERVLKGTVMVGLLALLTFASQAAGAPRAVAKAPA			
sp POCW87 A...	EFSVIRLVFGRADAWDNGNYKADRPLLSDMDVLSVKGFLFRSGDVIHRSGPTKPSAGNALSDDTNPNRKRERVLKGTVMVGLLALLTFASQAAGAPRAVAKAPA			
.....				
		771	BcsB: 833 - 1.146	880
sp Q76KJ8 A...	HOPEASDLPLPALLPATGGAQAGCGDAGADGPGSTGQPLAADCSADALVENAENTSDTATVHNYTLKDLGAAGSITMRGLAPLQIEFGIPSDQLVTSARLVLSGMS			
sp POCW87 A...	HOPEASDLPLPALLPATGGAQAGCGDAGADGPGSTGQPLAADCSADALVENAENTSDTATVHNYTLKDLGAAGSITMRGLAPLQIEFGIPSDQLVTSARLVLSGMS			
.....				

Page 2 sp|POCW87|ACSA1_KOMXY Cellulose synthase 1 OS=Komagataeibacter xylinus OX=28448 GN=acsAB PE=1 SV=1

		881		990
sp Q76KJ8 A...	PNLRPETNSVTMTLNEQYIGTLRDPDAHPTFGPMSFEINPIFFVSGNRLNENFAGSGKCSIDITNDTLWATISQNSQLQITTIAPLPRRLLSRLPQPFYDKNRVQHVTVP			
sp POCW87 A...	PNLRPETNSVTMTLNEQYIGTLRDPDAHPTFGPMSFEINPIFFVSGNRLNENFAGSGKCSIDITNDTLWATISQNSQLQITTIAPLPRRLLSRLPQPFYDKNRVQHVTVP			
.....				
		991		1100
sp Q76KJ8 A...	MVLAQTYDQPILKSGAGILASWFGKQDFLGVTFVVSSTIPQSGNAILIGVADELPTSGRQVNGPAVLELNPNSDANATILVVTGRDRDEVITASKGIAFASAPLPTDS			
sp POCW87 A...	MVLAQTYDQPILKSGAGILASWFGKQDFLGVTFVVSSTIPQSGNAILIGVADELPTSGRQVNGPAVLELNPNSDANATILVVTGRDRDEVITASKGIAFASAPLPTDS			
.....				
		1101		1210
sp Q76KJ8 A...	HMDVAPVDIAPRKPNDAFSFIAMDHVRFVGLDVTASKLQGTGTFSGVLSVFPFRIPDLYTWRNRPYKMQVFRSPAGEARDVEKSRDLVGINEVYLSYPLRETHGLIGA			
sp POCW87 A...	HMDVAPVDIAPRKPNDAFSFIAMDHVRFVGLDVTASKLQGTGTFSGVLSVFPFRIPDLYTWRNRPYKMQVFRSPAGEARDVEKSRDLVGINEVYLSYPLRETHGLIGA			
.....				
		1211		1320
sp Q76KJ8 A...	VLQGVGLARPASGMQVHDLDPVPTVFGQDQLNFYFDAMPLARGICQSGAANNAPHLGLDPDSTIDFSAHHAQMPNLAYMATVGFPTTYADLSQTAVVLEPHNAAT			
sp POCW87 A...	VLQGVGLARPASGMQVHDLDPVPTVFGQDQLNFYFDAMPLARGICQSGAANNAPHLGLDPDSTIDFSAHHAQMPNLAYMATVGFPTTYADLSQTAVVLEPHNAAT			
.....				
		1321		1430
sp Q76KJ8 A...	VGAYLDLMGFMGAATWYPVAGVDIVSADHVSADVADRNLVISTLATSGETIAPLLSRSSYEVADGHLRTVSHASALDNAIKAVDDPLTAFDRDRSKPQDVDTPLTGGVGAM			
sp POCW87 A...	VGAYLDLMGFMGAATWYPVAGVDIVSADHVSADVADRNLVISTLATSGETIAPLLSRSSYEVADGHLRTVSHASALDNAIKAVDDPLTAFDRDRSKPQDVDTPLTGGVGAM			
.....				
		1431		1540
sp Q76KJ8 A...	IEAESPLTAGRTVLALLSSDGAGLNNLLQMLGERKKQANIQGDVVAHGEDLSSYRTSPVYITIGTLPMLWPDWYMHNRVPRVLLVGLLGCILIVSLARALARHARRF			
sp POCW87 A...	IEAESPLTAGRTVLALLSSDGAGLNNLLQMLGERKKQANIQGDVVAHGEDLSSYRTSPVYITIGTLPMLWPDWYMHNRVPRVLLVGLLGCILIVSLARALARHARRF			
.....				
		1541 1550		
sp Q76KJ8 A...	KQLEDERRSK			
sp POCW87 A...	KQLEDERRSK			
.....				

Abbildung S 3. Motivvergleich nach Protein Alignment von BcsAB1 in *K. hansenii* ATCC 23769 (UniProt Accession number: Q76KJ8) und *K. hansenii* ATCC 53582 (UniProt Accession number: POCW87).

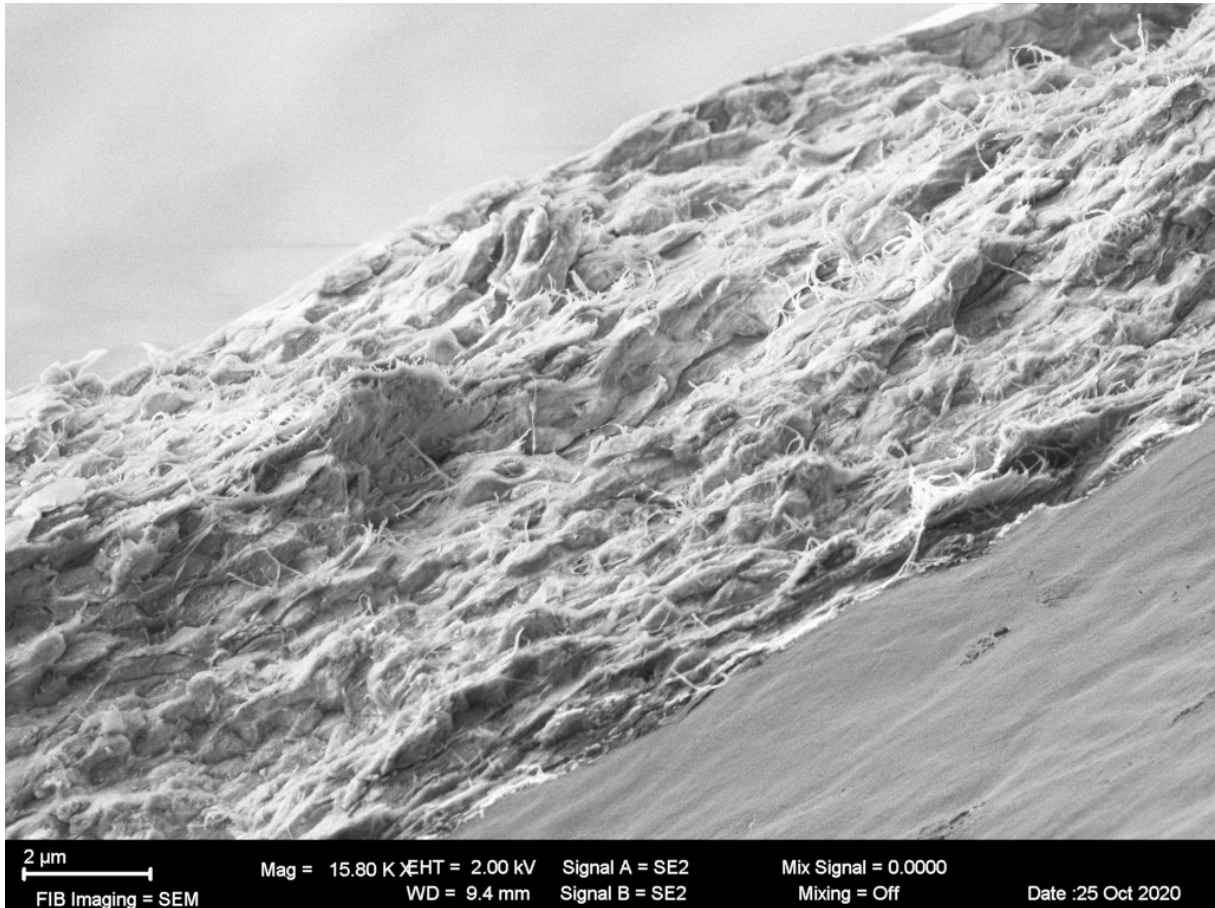


Abbildung S 4. REM des von *K. hansenii* ATCC 23769 gebildeten Biofilms im vertikalen Querschnitt nach über Nacht Inkubation in 1x PBS und Dehydratisierung in aufsteigender EtOH-Reihe. Orientierung: Oberseite = Luft zugewandte Seite, Unterseite = Medium zugewandte Seite.

Anhang

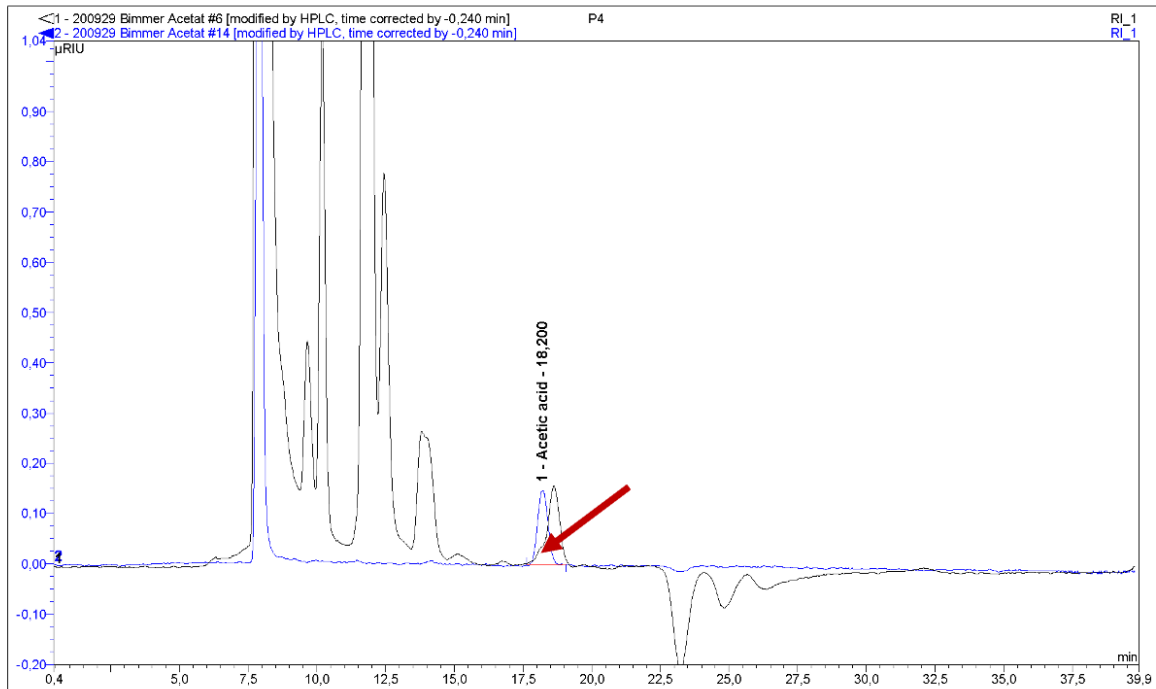


Abbildung S 5. HPLC Chromatogramm des Cellulosebiofilms aus *K. hansenii* ATCC 23769 gemessen nach Hydrolyse in 250 mM H₂SO₄ (blau) verglichen mit Celluloseacetat Standard (schwarz). Die Detektion erfolgte mittels des RI-Detektors.

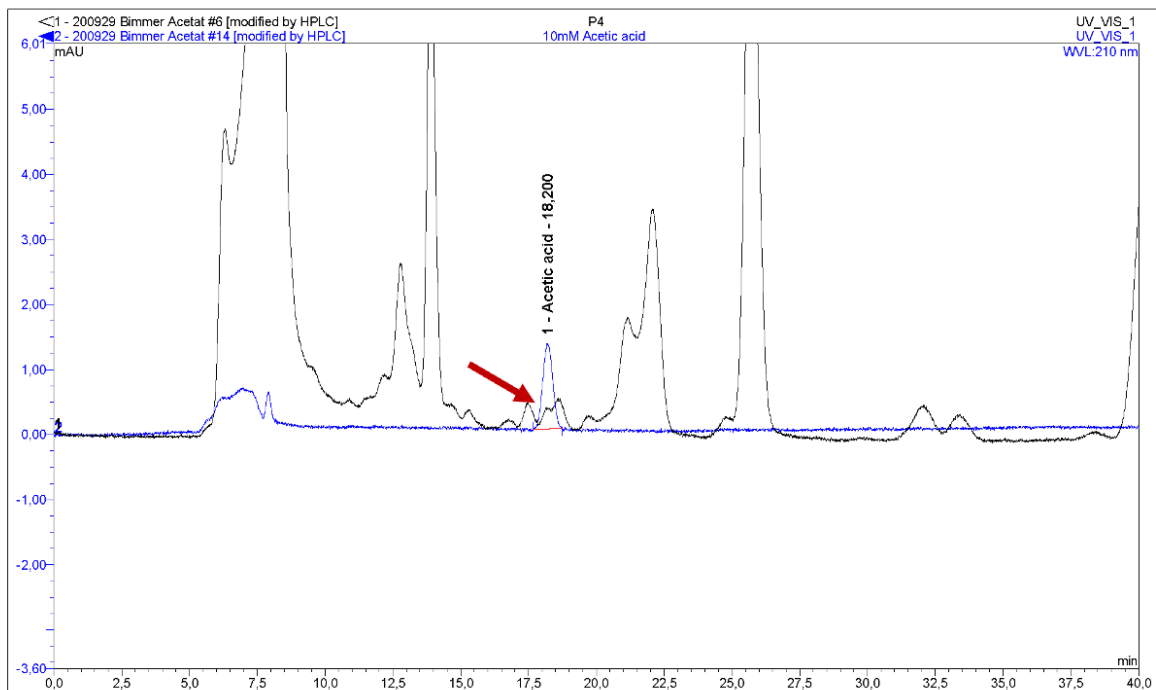


Abbildung S 6. Wie Abbildung S 2, die Detektion erfolgte in diesem Fall mittels UV-Detektor.

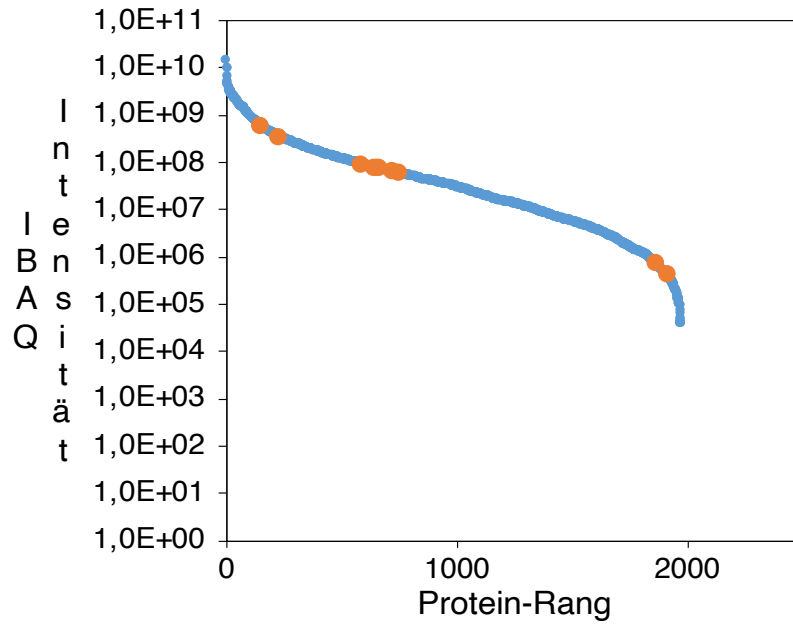


Abbildung S 7. Absteigende Rangfolge der Proteinhäufigkeiten in *K. hansenii* ATCC 23769.
 BcsD, CcpAx, BglxA, BcsAB1, BcsC1, BcsAB2 ORF2, BcsAB2, CmcAx, BcsY, BcsC3.

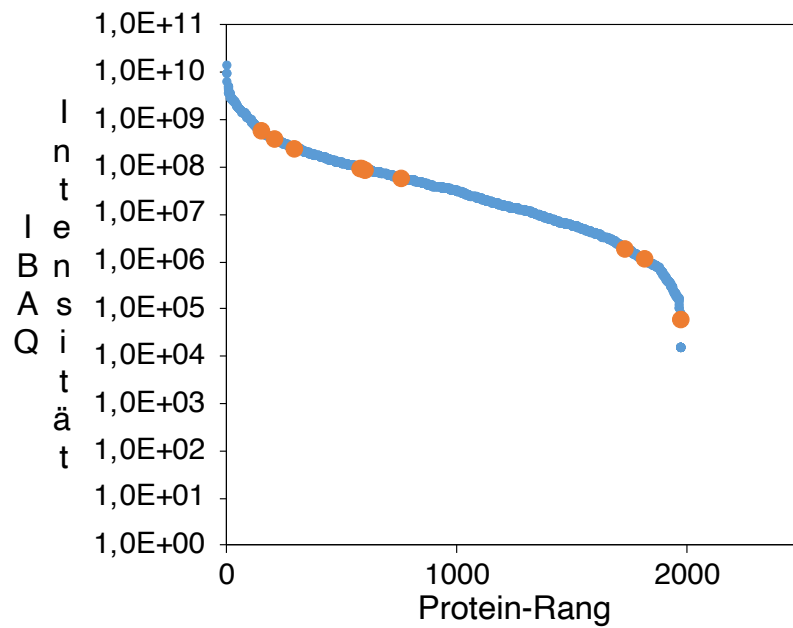


Abbildung S 8. Absteigende Rangfolge der Proteinhäufigkeiten in *K. hansenii* $\Delta bcsAB2$ $\Delta bcsAB3$ (ATCC 23769).
 BcsD, CcpAx, BcsAB2 ORF2, BglxA, BcsAB1, BcsC1, CmcAx, BcsY, BcsC3, BcsAB2.

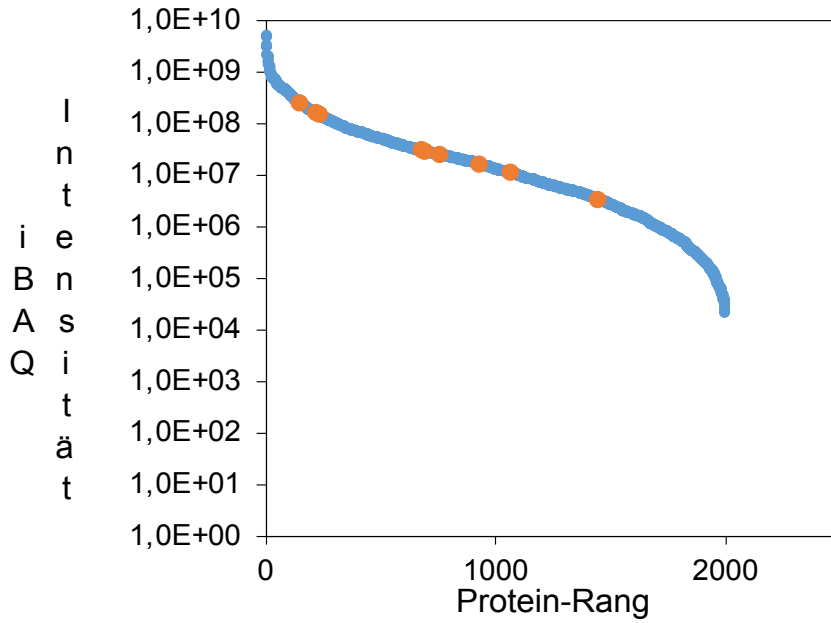


Abbildung S 9. Absteigende Rangfolge der Proteinhäufigkeiten in *K. hansenii* ATCC 53582.
BcsD, BglxA, CcpAx, CmcAx, BcsC1, BcsAB1, BcsX, BcsAB2, BcsC2.

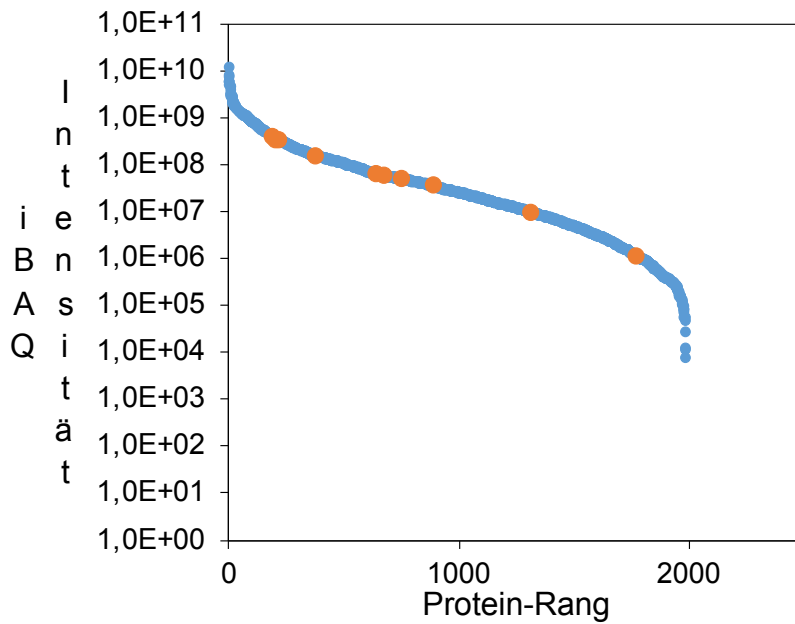


Abbildung S 10. Absteigende Rangfolge der Proteinhäufigkeiten in *K. hansenii* $\Delta bcsAB2 \Delta bcsAB3$ (ATCC 53582). CcpAx, BcsD, BglxA, BcsX, BcsC1, CmcAx, BcsAB1, BcsC2, BcsY.

