

**Regulation des anaeroben Abbaus aromatischer  
Kohlenwasserstoffe in *Aromatoleum aromaticum* EbN1**



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps Universität Marburg  
vorgelegt von

**Enrico Muhr (M.Sc.)**  
aus Nordhausen

Marburg/Lahn 2016

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2012 bis Dezember 2015 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_  
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung am \_\_\_\_\_

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind in zwei Originalarbeiten veröffentlicht:

Muhr E, Schühle K, Clermont L, Sünwoldt K, Kleinsorge D, Seyhan D, Kahnt J, Schall I, Cordero PR, Schmitt G & Heider J (2015) Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in '*Aromatoleum aromaticum*': differentiation and differential induction. *Arch Microbiol* 197(9):1051-1062 doi: 10.1007/s00203-015-1142-z

Muhr E, Leicht O, González Sierra S, Thanbichler M, Heider J (2016) A fluorescent bioreporter for acetophenone and 1-phenylethanol derived from a specifically induced catabolic operon. *Front Microbiol* 6:1561 doi: 10.3389/fmicb.2015.01561

Weitere noch unveröffentlichte Originalarbeit:

Muhr E, Leicht O, Schühle K, Kahnt J, González Sierra S, Clermont L, Thanbichler M, Heider J. Deletion of regulatory genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene and acetophenone in *Aromatoleum aromaticum*. [work under progress, to be submitted]

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung.....	3
Summary .....	5
Einleitung .....	7
<b>1. Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen unter anaeroben Bedingungen .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Regulation des anaeroben Toluol- und Ethylbenzolabbaus in <i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1 .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Regulation des anaeroben Abbaus phenolischer Verbindungen in <i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1 .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Schwerpunkt und Zielsetzung.....</b>	<b>18</b>
Ergebnisse .....	19
<b>1. Enzymes of anaerobic ethylbenzene and <i>p</i>-ethylphenol catabolism in ‘<i>Aromatoleum aromaticum</i>’: differentiation and differential induction.....</b>	<b>21</b>
1.1. Zusammenfassung.....	21
1.2. Artikelkopie.....	21
<b>2. A fluorescent bioreporter for acetophenone and 1-phenylethanol derived from a specifically induced catabolic operon.....</b>	<b>23</b>
2.1. Zusammenfassung.....	23
2.2. Artikelkopie.....	23
2.3. Supplementary material .....	36
<b>3. Deletion of regulatory genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene and acetophenone in <i>Aromatoleum aromaticum</i>.....</b>	<b>40</b>
3.1. Zusammenfassung.....	40
3.2. Manuskript .....	40
3.3. Supplementary material .....	65
3.4. Additional material of ongoing experiments .....	71
<b>4. Transkriptionsstartbestimmungen der Operons des Ethylbenzol- und Acetophenonmetabolismus.....</b>	<b>73</b>
Diskussion .....	84
<b>1. Die distinkten und hoch spezifischen Abbauwege der anaeroben Ethylbenzol- und <i>p</i>-Ethylphenolmetabolismen .....</b>	<b>84</b>
<b>2. Die substratspezifische Genexpression des katabolen <i>apc-bal</i> Operons .....</b>	<b>87</b>
<b>3. Die Rolle der Zweikomponentensysteme AdiRS und XdiRS im komplexen Regulationsnetzwerk der Ethylbenzol- und <i>p</i>-Ethylphenolstoffwechsel.....</b>	<b>88</b>
<b>4. Ausblick.....</b>	<b>91</b>
Literaturverzeichnis.....	93
Anhang .....	102
Danksagung.....	110
Lebenslauf .....	111
Publikationsliste .....	112
Erklärung.....	113

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption	MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase	NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat	OD	Optische Dichte
AHT	Anhydrotetracyclin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Apc	Acetophenon-Carboxylase	PEDH	Phenylethanol-Dehydrogenase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Bbs	$\beta$ -Oxidation von ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat	PMS	Phenazinmethosulfat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
bp	Basenpaare	RFP	rot fluoreszierendes Protein
Bss	( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase	RNA	Ribonukleinsäure
CoA	Coenzym A	RT	Reverse Transkriptase
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure	SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol	SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
DIC	Differentialinterferenzkontrast	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA
DTT	Dithiothreitol	TCS	Zweikomponenten-Regulationssystem
EbDH	Ethylbenzol-Dehydrogenase	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EpMH	Ethylphenol-Methylenhydroxylase	TSP	Transkriptionsstartpunkt
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae, et alia</i> (und andere)	USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie	UTR	untranslatierter Bereich
LC-MS	Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie	UV	ultraviolett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation	v/v	Volumen pro Volumen
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure	w/v	Gewicht pro Volumen
MFE	minimale freie Energie		

## Zusammenfassung

Das genomsequenzierte  $\beta$ -Proteobakterium *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 und einige verwandte Arten weisen die ungewöhnliche Stoffwechselaktivität des anaeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen sowie phenolischen Verbindungen auf. Hierfür besitzt *A. aromaticum* mehrere sehr substratspezifische Stoffwechselwege. Trotz der starken chemischen Ähnlichkeit einiger Verbindungen, erfolgt die spezifische Induktion der katabolischen Enzyme ausschließlich in Anwesenheit des jeweiligen Substrates und nicht durch chemisch analoge Verbindungen. Mittelpunkt dieses Promotionsprojektes war der Mechanismus der spezifischen Sensierung von Kohlenwasserstoffen und phenolischen Substraten, sowie die Regulation der Induktion der jeweiligen Abbauewege.

Durch die Kombination aus neu entwickelten und bereits etablierten biochemischen und molekularbiologischen Methoden, wurde eindeutig gezeigt, dass Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol, trotz ihrer starken chemischen Ähnlichkeit, durch zwei vollständig getrennte Abbauewege mit spezifisch induzierten Enzymen metabolisiert werden. Hierfür wurden Kulturen des Stammes EbN1 unter denitrifizierenden Bedingungen neben Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol auch auf Acetophenon, einem wichtigen Zwischenprodukt des anaeroben Ethylbenzolverstoffwechsels, kultiviert. Die Messung der Aktivitäten aller beteiligten Enzyme, der Häm-Färbungen sowie der Immun- und Biotin-Blot-Analysen ermöglichten die Identifizierung und Differenzierung der Enzyme der beiden anaeroben Abbauewege. Weiterhin wurden Lücken des postulierten *p*-Ethylphenolabbaueweges durch neu identifizierte Enzyme geschlossen. Zu den identifizierten Enzymen gehörte unter anderem eine Biotin-abhängige *p*-Hydroxyacetophenon-Carboxylase.

Das aromatische Keton Acetophenon, Intermediat des anaeroben Ethylbenzolabbaus, kann durch *A. aromaticum* sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen über eine ATP-abhängige Acetophenon-Carboxylase (ApcABCDE) metabolisiert werden. Um die Bedingungen genauer zu analysieren, unter denen das *apc-bal* Operon exprimiert ist, wurde ein Reporterstamm mit einem fluoreszierenden mCherry-Protein konstruiert. Dieser bildete die Grundlage für die Entwicklung eines spezifischen Acetophenon Bioreportersystems. Zu diesem Zweck, wurde eine Fusion des *mCherry* Gens mit dem ersten Gen des Operons (*apcA*) erstellt und in das Chromosom von *A. aromaticum* integriert. Die Expression dieses Fusionsproteins sowie dessen Fluoreszenzaktivität entsprach dem Expressionsmuster der Enzyme des Acetophenonmetabolismus. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass die zugesetzte Acetophenonkonzentration, in einem Bereich von 25 bis 250  $\mu$ M, proportional zur produzierten

Menge an ApcA-mCherry war. Mit Ausnahme der beiden 1-Phenylethanol Enantiomere, welche von *A. aromaticum* leicht zu Acetophenon umgesetzt werden können, zeigten alle getesteten chemisch analogen Verbindungen keine oder deutlich schwächere Signale.

Ein weiterer Teil dieser Dissertation betraf die Analyse des *adiRS* Operons, das für ein Zweikomponenten-Regulationssystem (TCS) kodiert, welches wahrscheinlich die Acetophenon-abhängige Induktion des *apc-bal* Operons in *A. aromaticum* reguliert. Hierfür wurde durch homologe Rekombination eine Chloramphenicol-resistente Mutante konstruiert, bei der die *adiRS* Gene deletiert wurden. Entgegen den Erwartungen wuchs die *adiRS* Deletionsmutante noch immer mit Acetophenon und Ethylbenzol. Allerdings wurden reduzierte Acetophenon-Carboxylase-Aktivitäten in Extrakten dieser Kulturen nachgewiesen. Überraschenderweise zeigte die Mutante zudem ungewöhnliche Induktionsmuster der EbDH und zwei paraloger Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteine (XccB und XccB2), welche in Acetophenon- bzw. Ethylbenzol-abbauenden Zellen des Wildtyp-Stammes nicht induziert sind. Die Komplementation der *adiRS* Gene auf einem Plasmid führte nur zu einem teilweisen Ausgleich der beobachteten Abweichungen und nicht zum Phänotyp des Wildtyps. Weiterhin wurde das bereits beschriebene *apcA-mCherry* Reporterkonstrukt in das Chromosom der Deletionsmutante integriert. Die ermittelten Ergebnisse gaben Indizien für eine zeitverzögerte und verminderte Expression der *apcA-mCherry* Fusion, wenn die *adiRS* Gene deletiert waren. Die erhaltenen Daten sind konsistent mit der Annahme, dass die Acetophenon-abhängige Induktion des *apc-bal* Operons neben dem AdiRS-System möglicherweise durch ein zweites parallel wirkendes TCS beeinflusst wird. Ein möglicher Kandidat sind die *xdiRS* Genprodukte, welche hohe Ähnlichkeit zu AdiRS aufweisen. Abschließend wird ein vorläufiges Modell zur potentiellen Rolle der beiden TCS AdiRS und XdiRS in der Substraterkennung und -unterscheidung in *A. aromaticum* Stamm EbN1 vorgestellt.

Schließlich wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von Primer-Extension-Analysen erstmals putative Transkriptionsstartpunkte für die am anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonabbau beteiligten Operons experimentell ermittelt. Den identifizierten Startpunkten, wurden durch den Vergleich mit Konsensussequenzen  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren putative -35 und -10 Regionen zugeordnet. Im Falle des *apc-bal* Operons könnten der umfangreiche 5'-untranslatierte Bereich und die vorhergesagte Sekundärstruktur mit einer berechneten minimalen freien Energie von  $-61,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  ein Indiz dafür sein, dass diese RNA-Struktur an der transkriptionellen oder translationellen Regulation beteiligt ist.

## Summary

The genome-sequenced *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1 and several related  $\beta$ -proteobacterial genera have the unusual metabolic capability of degrading aromatic hydrocarbons as well as phenolic compounds under anaerobic conditions. *A. aromaticum* possesses numerous highly substrate-specific metabolic pathways which are activated only in the presence of the respective substrate and not by chemically analogous compounds that leads to the induction of highly specific and interesting catabolic enzymes. Focus of this PhD thesis was the investigation of the mechanism of specific sensing of hydrocarbons and phenolic substrates as well as the metabolic regulation of induction of the respective degradation pathways.

By the combination of newly developed and already established biochemical and molecular biological methods, it was possible to show that, despite having a very similar chemical structure, ethylbenzene and *p*-ethylphenol were metabolized by completely separate pathways with specifically induced enzymes. Therefore, cultures of strain EbN1 were grown under denitrifying conditions on ethylbenzene, *p*-ethylphenol and acetophenone as important intermediate in the anaerobic ethylbenzene metabolism. The results of all determined enzyme activities, heme-staining as well as immuno- and biotin-blotting analyses allowed the identification and differentiation of the key enzymes involved in both anaerobic degradation pathways. Additionally, the proposed *p*-ethylphenol degradation pathway was substantiated by newly identified enzymes including a novel biotin-dependent *p*-hydroxyacetophenone carboxylase.

The aromatic ketone acetophenone, an intermediate of anaerobic ethylbenzene degradation, is metabolized by *A. aromaticum* either anaerobically or aerobically by an ATP-dependent acetophenone carboxylase (ApcABCDE). A mCherry reporter strain was constructed to study the conditions under which the genes encoding the carboxylase were expressed. This reporter strain provides a basis for the development of a specific acetophenone bioreporter system. For this purpose, a gene fusion of the *mCherry* gene and the first gene of the *apc-bal* operon (*apcA*) was created and integrated into the chromosome of *A. aromaticum*. It could be shown that the induction of the fusion protein and its fluorescence activity responded consistently with the expression pattern of the acetophenone-metabolic enzymes. Furthermore, the recorded amounts of ApcA-mCherry production were proportional to the applied acetophenone concentrations within a range of 25 to 250  $\mu$ M. With the exception of both 1-phenylethanol enantiomers which

are easily converted to acetophenone by *A. aromaticum*, all further tested analogous compounds showed a significantly weaker signal response or none at all.

Furthermore, this thesis investigates the *adiRS* operon encoding a two-component regulatory system which was proposed to regulate the acetophenone-dependent induction of the *apc-bal* operon in *A. aromaticum*. Therefore, a chloramphenicol resistant deletion mutant lacking the *adiRS* operon was constructed by homologous recombination. In contrast to the expectations, the *adiRS* gene deletion strain still grew on acetophenone and ethylbenzene. However, reduced acetophenone carboxylase activities were detectable in extracts of these cultures. Surprisingly, the mutant strain showed uncommon induction of EbdDH and two paralogous biotin-containing carrier proteins (XccB and XccB2) which are not induced in the wildtype strain grown on acetophenone or ethylbenzene, respectively. Restoring the *adiRS* genes *in trans* only resulted in a partial reversal of the observed deviations. Moreover, a mCherry reporter strain lacking the *adiRS* operon was constructed as described above. The results indicated a probable time-delayed and decreased expression of the *apcA-mCherry* gene fusion in the reporter strain lacking the genes encoding AdiRS. The obtained data led to the assumption, that acetophenone-dependent induction of the *apc-bal* operon is possibly mediated by a second two-component regulatory system (XdiRS) closely related to AdiRS. Finally, this study presents a tentative model of the potential role of the AdiRS and XdiRS regulatory systems in substrate recognition and discrimination in *A. aromaticum* strain EbN1.

Finally, it was possible to map putative transcription start sites of the catabolic operons involved in the anaerobic ethylbenzene and acetophenone degradation by using primer extension analysis for the first time experimentally. Upstream of all determined starting points putative -35 and -10 boxes could be identified by comparison with consensus sequences of  $\sigma^{70}$ -dependent promoters. In case of the *apc-bal* operon an extensive 5'-untranslated region and the predicted secondary structure with a calculated minimum free energy of  $-61.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  could indicate that this RNA structure has an influence on transcriptional or translational regulation.

## Einleitung

### 1. Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen unter anaeroben Bedingungen

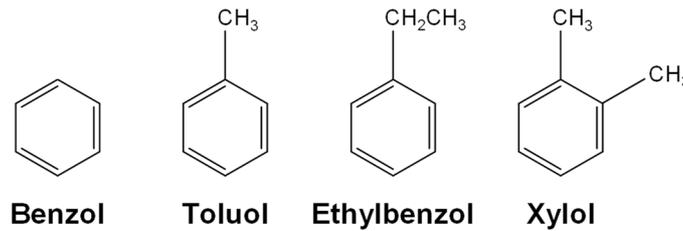
„Es geht auch ohne Sauerstoff“ (Heider, 2008). Unter anaeroben Bedingungen galten aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe lange Zeit als nicht biologisch abbaubar, da alle bis dato bekannten Organismen ausschließlich Mono- oder Dioxygenasen für deren obligat aerobe Initialreaktionen verwenden (Übersichtsartikel: Fuchs, 2007; Fuchs *et al.*, 2011).

Aromatische Kohlenwasserstoffe und andere Aromaten, wie die Benzolderivate, sind aufgrund ihres delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems durch eine hohe Mesomerieenergie bzw. Resonanzenergie gekennzeichnet. Um diese zyklischen Strukturen aufbrechen und für den weiteren Stoffwechselweg verfügbar machen zu können, haben alle aeroben Initialreaktionen die Gemeinsamkeit, dass sie molekularen Sauerstoff als essentielles Kosubstrat benötigen. Aufgrund der Vielfalt der Aromaten und der in der Natur vorliegenden Substratgemische, werden in einem peripheren Stoffwechselweg zuerst wenige zentrale Verbindungen gebildet. Zu den vier zentralen Intermediaten des aeroben Abbaus zählen Brenzkatechin, Protokatechusäure, Gentisinsäure und Homogentisinsäure. Im zweiten, zentralen Stoffwechselweg erfolgt der weitere Abbau der Intermediate durch wenige ringspaltende Dioxygenasen.

Aromatische Verbindungen sind sowohl weit verbreitete und wichtige Wachstumssubstrate für Mikroorganismen als auch bekannte Umweltschadstoffe (Fuchs *et al.*, 2011). Die aromatischen Kohlenwasserstoffe Benzol, Toluol, Ethylbenzol und die isomeren Xylole (BTEX, Abb. 1) werden in großen Mengen in industriellen Verfahren eingesetzt und können zu weiträumigen Umweltbelastungen führen. Diese flüchtigen, organischen und für den Menschen toxischen Verbindungen können aufgrund ihrer relativ hohen Löslichkeit in Wasser leicht in das Grundwasser oder tiefe Erdschichten gelangen. Aufgrund des Mangels bzw. schnellen Verbrauchs des Sauerstoffs an diesen Orten, erfolgt der Abbau der Kohlenwasserstoffe ausschließlich unter Verwendung alternativer Elektronenakzeptoren, wie z. B. Nitrat oder Sulfat (Lovley, 1997; Spormann und Widdel, 2000).

Studien der letzten 30 Jahre identifizierten und charakterisierten zahlreiche Mikroorganismen, die in der Lage sind, Kohlenwasserstoffe auch unter anoxischen Bedingungen zu verwerten (Übersichtsartikel: Boll *et al.*, 2002; Heider, 2007; Carmona *et al.*, 2009; Boll und Heider, 2010; Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2016). Die meisten dieser Untersuchungen wurden mit Hilfe

denitrifizierender  $\beta$ -Proteobakterien des "*Aromatoleum*"/*Azoarcus*/*Thauera* Clusters, strikt anaerober  $\delta$ -Proteobakterien der Gattung *Geobacter* oder dem phototrophen  $\alpha$ -Proteobakterium *Rhodospseudomonas palustris* durchgeführt. Zu den Initialreaktionen der anaeroben Abbauewege aromatischer Verbindungen zählen: die Addition von Fumarat durch Glycyl-Radikalenzyme, die sauerstoffunabhängige Hydroxylierung mit Wasser durch Molybdän-Enzyme, die reverse Methanogenese mit verschiedenen Methyl-Coenzym-M-Reduktasen und die Carboxylierung.

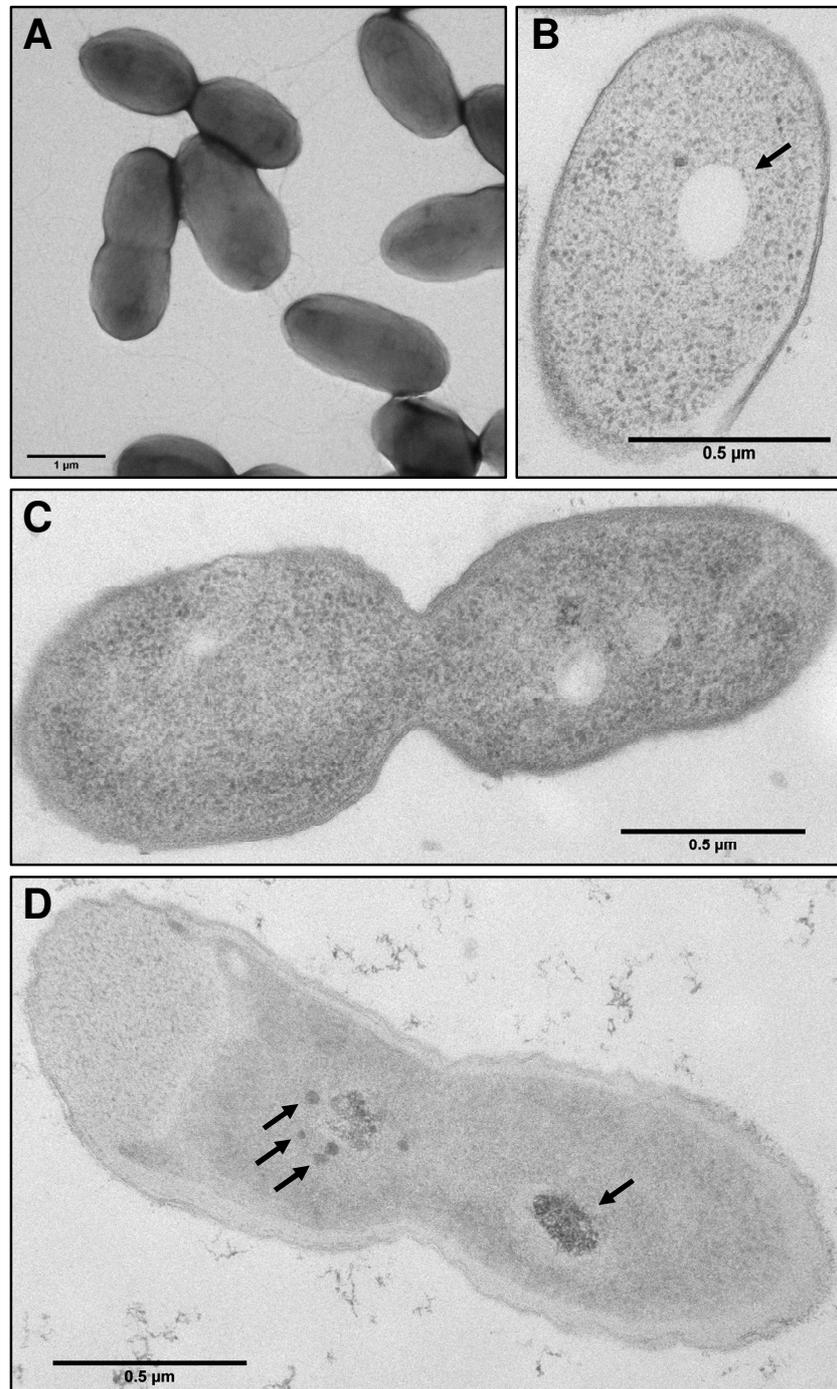


**Abb. 1 Strukturdarstellung aromatischer Kohlenwasserstoffe der BTEX Gruppe**

BTEX ist eine allgemein gültige Abkürzung für die aromatischen Kohlenwasserstoffe mit der größten technischen Bedeutung: Benzol, Toluol (Methylbenzol), Ethylbenzol und die Xylole (Dimethylbenzol). Durch die unterschiedliche Anordnung der zwei Methylgruppen am Benzolring werden drei Konstitutionsisomere des Xylols unterschieden: *ortho*-Xylol, *meta*-Xylol und *para*-Xylol.

Das denitrifizierende  $\beta$ -Proteobakterium *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 (*Azoarcus* sp. EbN1) weist die ungewöhnliche Stoffwechselaktivität des anaeroben Abbaus unterschiedlichster Kohlenwasserstoffe und phenolischer Verbindungen auf (Rabus und Widdel, 1995). Insbesondere ist der Stamm EbN1 eines der wenigen bekannten Bakterien in Reinkultur, das anaerob auf Ethylbenzol wächst. Diesen Phänotyp besitzen sonst nur die eng verwandten Stämme PbN1 und EB1 sowie der sulfatreduzierende Stamm EbS7 (Rabus und Widdel, 1995; 1996; Ball *et al.*, 1996; Heider *et al.*, 1999; Kniemeyer *et al.*, 2003). Abb. 2 zeigt transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von *A. aromaticum* Stamm EbN1, die im Rahmen dieser Dissertation in Kooperation mit Dr. Thomas Heimerl (AG Prof. Dr. Maier, Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg) aufgenommen wurden. Die ursprüngliche Isolierung von EbN1 erfolgte unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen mit Ethylbenzol als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle (Rabus und Widdel, 1995). Weitere Studien ergaben, dass dieser Stamm in der Lage ist, ein außerordentlich breites Spektrum unterschiedlicher aromatischer Verbindungen als Wachstumssubstrate zu verwenden (Übersichtsartikel: Rabus *et al.*, 2014). Dazu gehören in erster Linie die aromatischen Kohlenwasserstoffe Toluol und Ethylbenzol, aber auch die phenolischen Verbindungen Phenol, *p*-Ethylphenol und *p*-Kresol, welche sehr ähnliche chemische Strukturen aufweisen. Aus diesem Grund wurde *A. aromaticum* als Modellorganismus ausgewählt und war der erste anaerobe

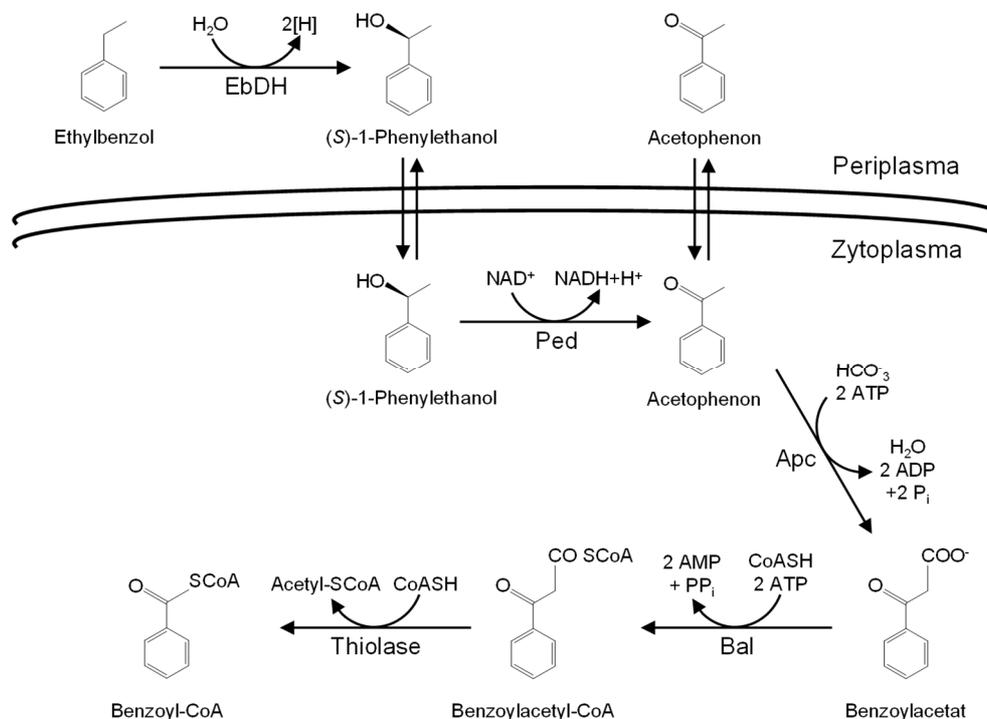
Aromatenabbauer, dessen Genom sequenziert wurde (Heider und Fuchs, 1997a; 1997b; Rabus *et al.*, 2005). Mit Hilfe der Genomannotation wurden Gene identifiziert, die für die Enzyme von zehn anaeroben und vier aeroben Abbauwegen aromatischer Verbindungen kodieren.



**Abb. 2 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von *A. aromaticum***

TEM Aufnahmen ganzer Zellen (A) und Uranylacetat-gefärbter Dünnschnitte (B-D) von *A. aromaticum* Stamm EbN1 in Kooperation mit Dr. Thomas Heimerl (AG Prof. Dr. Maier, Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg). Die Anzucht der Kulturen erfolgte unter denitrifizierenden Bedingungen mit Benzoat (A-C) oder Toluol (D). Die Polyhydroxybuttersäure-Einlagerungen und das Chromatin sowie bisher unbekannte Strukturen, die eine gewisse Symmetrie und Hülle aufwiesen, und vorwiegend in Toluol-gezogenen Zellen auftraten, sind durch Pfeile markiert.

Der anaerobe Ethylbenzolmetabolismus wurde sowohl für den Stamm EbN1 und weitere Denitrifizierer als auch für sulfatreduzierende Bakterien beschrieben, die sich jedoch im Abbauweg und der Initialreaktion deutlich voneinander unterscheiden (Übersichtsartikel: Heider, 2007; Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2016). Die Addition von Fumarat in Sulfatreduzierern wie dem Stamm EbS7 (Kniemeyer *et al.*, 2003) entspricht dabei der Initialreaktion des anaeroben Toluolabbaus in *Thauera aromatica* (Biegert *et al.*, 1996; Leuthner *et al.*, 1999) und verläuft vermutlich analog zum anaeroben Alkanabbau des denitrifizierenden Bakterienstamms HxN1 (Ehrenreich *et al.*, 2000; Grundmann *et al.*, 2008). Der erste Schritt des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol in den denitrifizierenden Bakterien *A. aromaticum* Stamm EbN1 und *Azoarcus* sp. Stamm EB1 ist eine stereospezifische und sauerstoffunabhängige Hydroxylierung zu (*S*)-1-Phenylethanol (Abb. 3; Ball *et al.*, 1996; Rabus und Heider, 1998; Johnson und Spormann, 1999). Die Initialreaktion wird dabei durch die sauerstofflabile Ethylbenzol-Dehydrogenase (EbdH) katalysiert, welche als lösliches Protein im Periplasma lokalisiert ist (Johnson *et al.*, 2001; Kniemeyer and Heider, 2001a; Kloer *et al.*, 2006; Heider *et al.*, 2016b). Das native Enzym ist ein Heterotrimer, welches sich aus drei Untereinheiten mit molekularen Massen von 96, 43 und 23 kDa zusammensetzt. Weiterhin trägt EbdH einen Molybdän-Kofaktor, fünf Eisen-Schwefel-Cluster sowie einen Häm  $b_{559}$  Kofaktor.



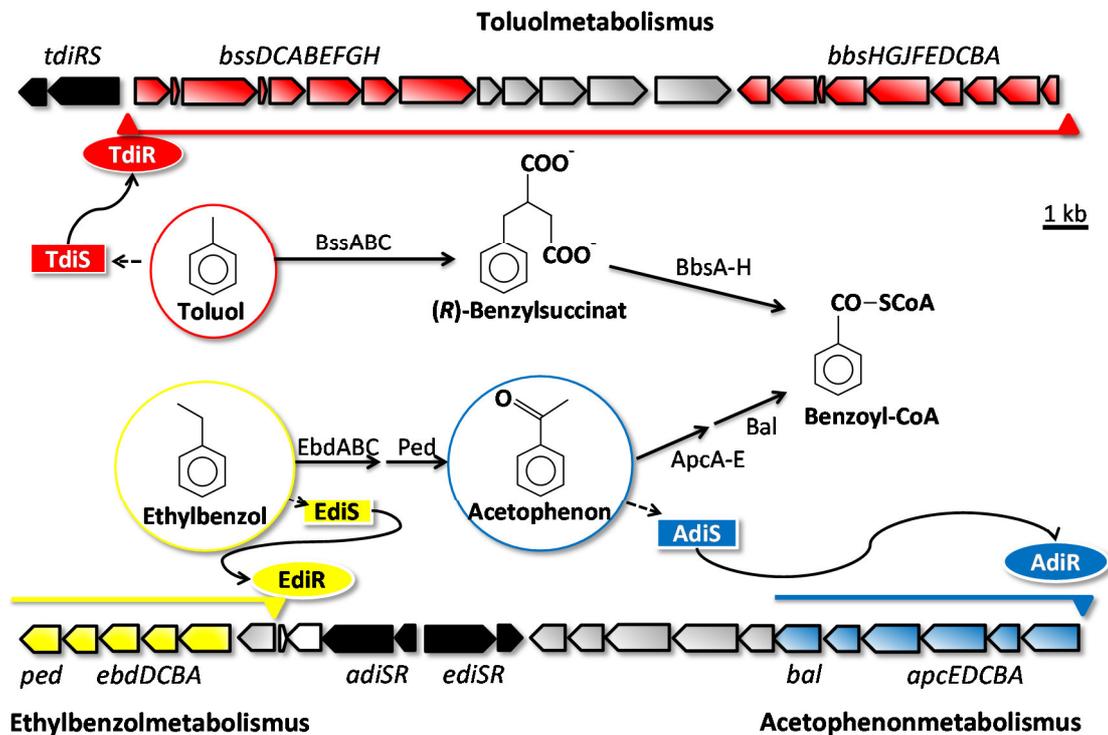
**Abb. 3 Schematische Darstellung des postulierten anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonmetabolismus in *A. aromaticum* Stamm EbN1 (modifiziert nach Kniemeyer *et al.*, 2001a; Heider *et al.*, 2016b)**

Am anaeroben Abbau beteiligte Enzyme: Ethylbenzol-Dehydrogenase (EbdH), (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase (Ped), Acetophenon-Carboxylase (Apc), Benzoylacetyl-CoA-Ligase (Bal), Thiolase.

Im nachfolgenden Abbauschritt erfolgt eine NAD-abhängige Oxidation zu Acetophenon, welche durch die enantiospezifische (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase (Ped) katalysiert wird (Champion *et al.*, 1999; Kniemeyer and Heider, 2001b; Höffken *et al.*, 2006; Dudzik *et al.*, 2014). Acetophenon, als wichtiges Intermediat des anaeroben Ethylbenzolabbaus, kann durch *A. aromaticum* auch als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen verstoffwechselt werden (Abb. 3; Rabus und Widdel, 1995; Rabus und Heider, 1998). Der Abbau des aromatischen Ketons zu Benzoylacetat wird durch eine komplexe ATP-abhängige Acetophenon-Carboxylase (Apc) initiiert (Jobst *et al.*, 2010). Das aus fünf Untereinheiten bestehende Apc-Enzym wurde aus Zellen gereinigt, die unter denitrifizierenden Bedingungen entweder mit Ethylbenzol oder Acetophenon kultiviert wurden. Die Reaktion des gereinigten und rekonstituierten Enzyms zeigte eine Stöchiometrie von zwei ATP pro Acetophenonmolekül, die zu zwei ADP hydrolysiert bzw. Benzoylacetat carboxyliert wurden. Die Apc bildet zusammen mit Aceton-Carboxylasen aus verschiedenen Bakterien eine neue Familie von ATP-abhängigen Carboxylasen (Sluis *et al.*, 2002; Schühle und Heider, 2012; Rabus *et al.*, 2016; Heider *et al.*, 2016c). Die nächsten Abbauschritte umfassen die Aktivierung des gebildeten Benzoylacetats zum Coenzym A (CoA)-Thioester durch eine postulierte Benzoylacetat-CoA-Ligase (Bal) und eine thiolytische Spaltung zu Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA durch eine bisher noch unbekannte Thiolase (Rabus und Heider, 1998; Rabus *et al.*, 2002; Jobst *et al.*, 2010). Der weitere Abbau von Benzoyl-CoA, dem gemeinsamen Zwischenprodukt der meisten anaeroben Stoffwechselwege aromatischer Verbindungen, erfolgt durch Reduktion des aromatischen Rings durch eine ATP-abhängige Benzoyl-CoA-Reduktase (Übersichtsartikel: Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011).

Im Gegensatz zu Ethylbenzol wird der chemisch ähnliche Kohlenwasserstoff Toluol unter denitrifizierenden Bedingungen bis zum gemeinsamen Intermediat Benzoyl-CoA über einen völlig anderen Stoffwechselweg abgebaut (Schematische Darstellung in Abb. 4; Übersichtsartikel: Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2016; Heider *et al.*, 2016a). Zu den Toluol-abbauenden, denitrifizierenden  $\beta$ -Proteobakterien gehören u. a. *Thauera aromatica* Stamm K172 (Anders *et al.*, 1995), *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 (Rabus und Widdel, 1995) und *Azoarcus toluoclasticus* (Song *et al.*, 1999). Gegenüber der sauerstoffunabhängigen Hydroxylierung der EbdH ist die initiale Reaktion eine stereospezifische Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung des Kosubstrates Fumarat, welche durch das sauerstoffsensitive Glycyl-Radikalenzym Benzylsuccinat-Synthase (BSS) katalysiert wird (Leuthner *et al.*, 1998; Beller und Spormann, 1998; 1999; Leutwein und Heider, 1999; Selmer *et al.*, 2005). Das Zwischenprodukt (*R*)-Benzylsuccinat wird zum CoA-Thioester aktiviert und

über einen speziellen  $\beta$ -Oxidationsweg zu Succinyl-CoA und Benzoyl-CoA abgebaut (Heider, 2007; Fuchs *et al.*, 2011). Das entstehende Succinat wird zu Fumarat oxidiert und der Initialreaktion der BSS als Kosubstrat rückgeführt. Der weitere Abbau von Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenabbaus, erfolgt über den weit verbreiteten Benzoyl-CoA-Weg (Übersichtsartikel: Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011).



**Abb. 4** Schematische Darstellung der Gene und Genprodukte der postulierten anaeroben Abbauwege von Toluol und Ethylbenzol in *A. aromaticum* Stamm EbN1 (modifiziert nach Rabus *et al.*, 2002; Kühner *et al.*, 2005)

Der anaerobe Abbau von Toluol (*oben*) und Ethylbenzol (*unten*) erfolgt durch zwei unterschiedliche und substratspezifische Stoffwechselwege bis zum ersten gemeinsamen Intermediat, Benzoyl-CoA. Die verschiedenen postulierten Funktionen der Genprodukte werden durch verschiedene Farben dargestellt: *schwarz*: Regulation der Transkription, *rot*: Toluolabbau, *gelb*: Ethylbenzolabbau, *blau*: Ethylbenzol- und Acetophenonabbau, *weiß*: Transposase bzw. Transposase-Fragment, und *grau*: Protein unbekannter Funktion. Gencluster des Toluolmetabolismus (*oben*): *Accession Numbers* der Genprodukte: CAI07155 für TdiR bis CAI07178 für BbsA. Beteiligte Enzyme: BssCAB: (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, BbsEF: Succinyl-CoA: Benzylsuccinat-CoA-Transferase, BbsG: Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase; BbsH: (*E*)-Phenylitaconyl-CoA-Hydratase, BbsCD: 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase, BbsAB: Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase, sowie TdiRS: putatives TCS des Toluolabbaus. Gencluster des Ethylbenzol- bzw. Acetophenonmetabolismus (*unten*): *Accession Numbers* der Genprodukte: CAI07428 für Ped bis CAI07450 für ApcA. Beteiligte Enzyme: EbdABC: Ethylbenzol-Dehydrogenase, Ped: (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase, ApcABCDE: Acetophenon-Carboxylase, Bal: Benzoylacetat-CoA-Ligase, sowie EdiRS und AdiRS: putative TCS des Ethylbenzol- bzw. Acetophenonabbaus.

## 2. Regulation des anaeroben Toluol- und Ethylbenzolabbaus in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1

*A. aromaticum* ist mit mehreren distinkten und hoch substratspezifischen Stoffwechselwegen ausgestattet, die nur in Anwesenheit der jeweiligen Substrate, nicht aber durch chemisch analoge Verbindungen induziert werden (Übersichtsartikel: Boll *et al.*, 2002; Heider *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2016). Die Spezifität der Diskriminierung unterschiedlicher Substrate, scheint im Falle des anaeroben Abbaus deutlich stärker ausgeprägt zu sein, als es für die regulatorischen Systeme des aeroben Aromatenabbaus bekannt ist (Kühner *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2014).

Die Enzyme des anaeroben Toluolmetabolismus, die durch zwei separate, aber ko-induzierte Operons kodiert werden, werden nur in Anwesenheit von Toluol produziert (Abb. 4; Leuthner und Heider, 2000; Hermuth *et al.*, 2002; Kube *et al.*, 2004). Das *bss* Operon kodiert u. a. für die Genprodukte der Untereinheiten der BSS, wohingegen im *bbs* Operon alle Enzyme der  $\beta$ -Oxidation kodiert sind. In unmittelbarer Nachbarschaft des *bss* Operons, liegt in allen bekannten denitrifizierenden Bakterien ein Operon (*tdiRS*), das für ein Zweikomponenten-Regulationssystem (TCS) kodiert (Coschigano und Young, 1997; Leuthner und Heider, 1998; Achong *et al.*, 2001; Rabus *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Tatsache und der starken Aminosäuresequenzähnlichkeiten zu TCS des aeroben Toluolabbaus, wird angenommen, dass *TdiRS* die Induktion der *bss* und *bbs* Operons in Abhängigkeit der Toluolverfügbarkeit reguliert (*tdiRS* = *toluene-degradation inducing regulator/sensor*).

Die Gene, die für die Enzyme des Ethylbenzolmetabolismus kodieren, sind ebenfalls in zwei Operons lokalisiert (Abb. 4; Rabus *et al.*, 2002). Zum *ebd-ped* Operon gehören die Gene der Strukturuntereinheiten und des Reifungsproteins der Ethylbenzoldehydrogenase (*ebdABC* bzw. *ebdD*) sowie die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase (*ped*). Das zweite, *apc-bal* Operon enthält die Gene der fünf Untereinheiten der Acetophenon-Carboxylase (*apcABCDE*) zusammen mit dem Gen für die Benzoylacetat-CoA-Ligase (*bal*). Im Gegensatz zum Toluolabbau werden die Enzyme des anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonmetabolismus auf sequenzielle Weise in Abhängigkeit der Verfügbarkeit des jeweiligen Substrates reguliert (Rabus *et al.*, 2005; Kühner *et al.*, 2005; Jobst *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass die EbdDH und die Ped nur in Zellen nachgewiesen werden können, die unter denitrifizierenden Bedingungen mit Ethylbenzol kultiviert werden. Dagegen sind die Apc und die Bal auch in Zellen induziert, die entweder mit Ethylbenzol oder dem Intermediat Acetophenon direkt kultiviert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass EbN1 unter aeroben Bedingungen ausschließlich auf

Acetophenon und nicht auf Ethylbenzol wächst. Die katabolen *ebd-ped* und *apc-bal* Operons bilden zusammen mit zwei weiteren Operons (*adiRS* und *ediRS*), die für zwei putative TCS kodieren, ein ca. 30 kb großes Gencluster (Abb. 4; Rabus *et al.*, 2002). Aufgrund der Lage und der starken Ähnlichkeit mit den Aminosäuresequenzen von TdiRS, wurde postuliert, dass das *ediRS* Operon für die Kontrolle der Transkription des *ebd-ped* Operons verantwortlich ist (*ediRS* = *ethylbenzene-degradation inducing regulator/sensor*). Basierend auf einer gewissen Ähnlichkeit zum *p*-Hydroxyacetophenon-abhängigen TCS VirAG aus *Agrobacterium tumefaciens* (Lee *et al.*, 1995) und der Lokalisierung im Ethylbenzol-Gencluster, wurde für *AdiRS* postuliert, die Acetophenon-spezifische Transkription des *apc-bal* Operons zu regulieren (*adiRS* = *acetophenone-degradation inducing regulator/sensor*; Rabus *et al.*, 2002).

Zweikomponentensysteme dienen der Signaltransduktion und bestehen in der Regel aus einem Rezeptor, einer membrangebundenen Sensor-Histidin-Kinase, und einem zytoplasmatischen Response-Regulator-Protein, welches häufig als Transkriptionsfaktor wirkt (Übersichtsartikel: Gao und Stock, 2009; Cheung und Hendrickson, 2010; Krell *et al.*, 2010; Henry und Crosson, 2011; Alvarez *et al.*, 2016). Die Proteine aller drei TCS (TdiRS, EdiRS und AdiRS) sind einander ähnlich und sowohl die jeweiligen Regulator- als auch die Sensor-Komponenten wurden als zytoplasmatische Proteine vorhergesagt (Rabus *et al.*, 2002; 2005; 2014). Damit gehören diese drei Sensorproteine zu den löslichen Histidin-Kinasen, die N-terminale, zytoplasmatische Sensor-Domänen neben einer C-terminalen Transmitterdomäne aufweisen, aber keine typischen Transmembran-Segmente besitzen (Cheung und Hendrickson, 2010). Die putativen Sensorproteine besitzen eine (AdiS) bzw. zwei (EdiS und TdiS) sensorische Domänen der PAS-Familie sowie eine konservierte Histidin-Kinase-Domäne, die ähnlich des Sauerstoff-sensierenden FixL Proteins ist, und offenbar eine Autophosphorylierungsfunktion besitzt (Leuthner und Heider, 1998; Rabus *et al.*, 2002; 2005).

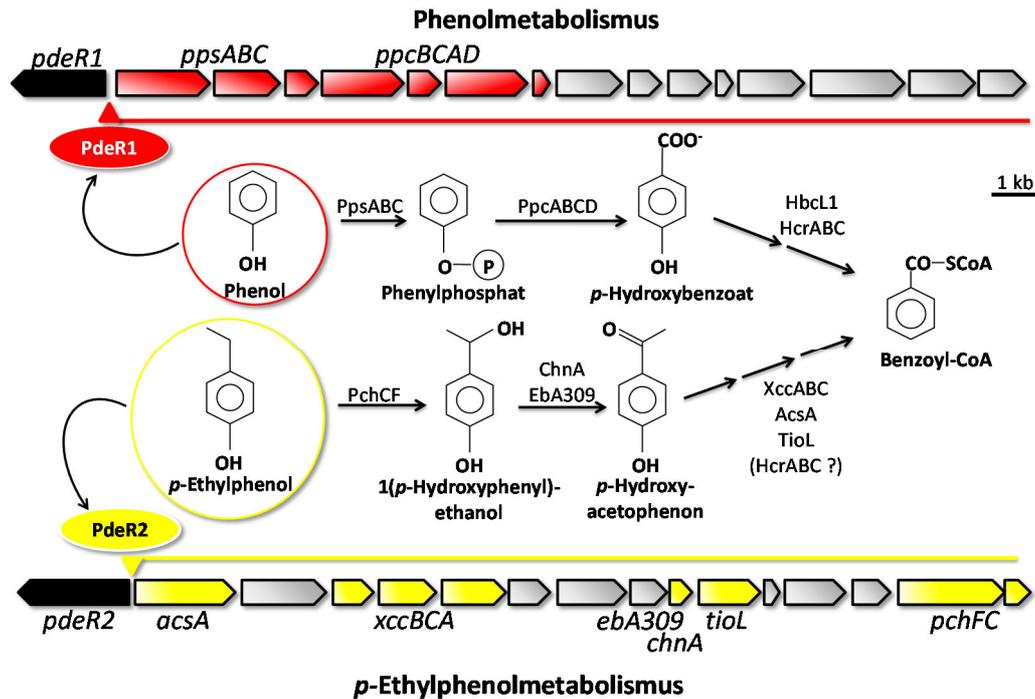
In Analogie zu bekannten prokaryotischen Systemen wurde postuliert, dass der Phosphorylierungsstatus der drei putativen Sensorproteine über Konformationsänderungen der PAS-Domänen in An- bzw. Abwesenheit der Signale moduliert wird (Rabus *et al.*, 2002; 2005; 2014). Der veränderte Phosphorylierungsstatus beeinflusst daraufhin in einem zweiten Schritt die Phosphorylierung des zugehörigen Response-Regulators und reguliert die Expression der Zielgene im Genom, entweder durch spezifische Bindung des Regulators an dessen Operatorstellen oder Lösen dieser. Dabei wird die Phosphorylgruppe des phosphorylierten Histidins auf ein Aspartat in der N-terminalen Empfänger-Domäne übertragen. Alle drei putativen Response-Regulatoren besitzen neben dieser Empfänger-Domäne mit einem konservierten Aspartat eine Helix-Turn-Helix-Domäne zur Bindung der DNA.

PAS-Domänen sind dafür bekannt, unterschiedlichste Signalformen zu sensieren, zu denen beispielsweise die Änderung von Redoxbedingungen, die Sauerstoffverfügbarkeit oder die Gegenwart von hydrophoben Molekülen gehören (Zhulin *et al.*, 1997; Kamps *et al.*, 2004). Hierfür tragen PAS-Domänen entweder einen Kofaktor, der auf den sensorischen Input reagiert (z. B. Häm in FixL oder FeS-Cluster in NreB) oder binden das zu sensierende Molekül direkt (Cheung *et al.*, 2010; Henry und Crosson, 2011; Unden *et al.*, 2013). Im speziellen Fall dieser drei putativen TCS ist es besonders interessant, dass im sauerstoffunabhängigen bzw. -toleranten Acetophenonabbau das putative AdiS involviert ist, dass ausschließlich eine PAS-Domäne trägt (Rabus *et al.*, 2002; 2005; 2014). Dagegen besitzen die beiden putativen Sensoren des strikt anaeroben Toluol- (TdiS) bzw. Ethylbenzolabbaus (EdiS) jeweils zwei PAS-Domänen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass eine dieser Domänen die Anwesenheit des entsprechenden Kohlenwasserstoffs sensiert, während es sich bei der zweiten Domäne um einen Sauerstoffsensoren handelt. Dies würde bedeuten, dass eine Erkennung und Integration zwei unterschiedlicher Signale parallel in einem sensorischen Protein erfolgt und somit eine neue Form eines bakteriellen Regulationsmechanismus darstellen.

### **3. Regulation des anaeroben Abbaus phenolischer Verbindungen in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1**

Neben den aromatischen Kohlenwasserstoffen besitzt *A. aromaticum* die Fähigkeit unter denitrifizierenden Bedingungen phenolische Verbindungen als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu verstoffwechseln. Hierfür sind drei postulierte Abbauewege für die drei chemisch verwandten, phenolischen Substrate Phenol, *p*-Kresol und *p*-Ethylphenol bekannt (Rabus *et al.*, 2005; 2014; Wöhlbrand *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2009).

Phenol wird zuerst zu Phenylphosphat aktiviert und daraufhin durch die sauerstoffsensitive Phenylphosphat-Carboxylase zu 4-Hydroxybenzoat carboxyliert (Schematische Darstellung in Abb. 5; Schmeling *et al.*, 2004; Schühle und Fuchs, 2004). Im Gegensatz dazu wird die Initialreaktion des *p*-Kresols durch ein periplasmatisches Flavoenzym, die *p*-Kresol-Methylhydroxylase, katalysiert (Boll *et al.*, 2002). Das entstehende 4-Hydroxybenzaldehyd wird im nächsten Schritt mittels einer Aldehyd-Dehydrogenase zu 4-Hydroxybenzoat oxidiert. Der weitere Abbau des 4-Hydroxybenzoats zu Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenabbaus, erfolgt über einen gemeinsamen Stoffwechselweg (Abb. 5; Rabus *et al.*, 2005; 2014).



**Abb. 5** Schematische Darstellung der Gene und Genprodukte der postulierten anaeroben Abbauege von Phenol und *p*-Ethylphenol in *A. aromaticum* Stamm EbN1 (modifiziert nach Rabus *et al.*, 2002; Wöhlbrand *et al.*, 2008)

Der anaerobe Abbau von Phenol (*oben*) und *p*-Ethylphenol (*unten*) erfolgt durch zwei unterschiedliche und substratspezifische Stoffwechselwege bis zum ersten gemeinsamen Intermediat, Benzoyl-CoA. Die verschiedenen postulierten Funktionen der Genprodukte werden durch verschiedene Farben dargestellt: *schwarz*: Regulation der Transkription, *rot*: Phenolabbau, *gelb*: *p*-Ethylphenol- und *p*-Hydroxyacetophenonabbau, und *grau*: Protein unbekannter Funktion. Gencluster des Phenolmetabolismus (*oben*): *Accession Numbers* der Genprodukte: CAI07889 für PdeR1 bis CAI07882 für PpcD. Beteiligte Enzyme: PpsABC: Phenylphosphat-Synthetase, PpcABCD: Phenylphosphat-Carboxylase, sowie PdeR1: putativer  $\sigma^{54}$ -abhängiger XylR-Typ Regulator des Phenol- bzw. *p*-Hydroxybenzoatabbaus. Beteiligte Enzyme außerhalb des Genclusters lokalisiert: HbcL1: *p*-Hydroxybenzoat-CoA-Ligase (CAI09172) und HcrABC: *p*-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase (CAI008160 bis CAI08162). Gencluster des *p*-Ethylphenol- bzw. *p*-Hydroxyacetophenonmetabolismus (*unten*): *Accession Numbers* der Genprodukte: CAI06276 für PchC bis CAI06290 für AcsA; CAI06292 für PdeR2. Beteiligte Enzyme: PchCF: *p*-Ethylphenol-Methylenhydroxylase, ChnA und EbA309: Alkoholdehydrogenase (SDR-Proteinfamilie), XccABC: postulierte Biotin-abhängige *p*-Hydroxyacetophenon-Carboxylase, AcsA: postulierte Acetoacetyl-CoA-Synthetase/CoA-Ligase, TioL: postulierte Thiolase, sowie PdeR2: putativer  $\sigma^{54}$ -abhängiger XylR-Typ Regulator des *p*-Ethylphenol- bzw. *p*-Hydroxyacetophenonabbaus.

Überraschend war vor allem ein separater und spezifischer Abbaueweg für *p*-Ethylphenol (Schematische Darstellung in Abb. 5; Wöhlbrand *et al.*, 2008), da die initialen Enzyme des anaeroben Ethylbenzolstoffwechsels auch die Umsetzung von *p*-Ethylphenol mit sehr hoher Aktivität katalysieren (Kniemeyer und Heider, 2001a; 2001b; Knack *et al.*, 2012). Der postulierte *p*-Ethylphenol Abbaueweg zeigt dabei Ähnlichkeiten zu den ersten Abbauschritten des Ethylbenzolmetabolismus, welche eine Hydroxylierung, gefolgt von einer Alkoholdehydrierung zu *p*-Hydroxyacetophenon enthalten (Wöhlbrand *et al.*, 2008). Die

Hydroxylierung scheint jedoch nicht durch ein Molybdän-Enzym, sondern durch ein periplasmatisches Flavoprotein (PchCF) katalysiert zu werden, welches ähnlich der *p*-Kresol-Methylhydroxylase ist, und ehemals als Initialenzym des *p*-Kresolabbaus annotiert wurde (Rabus *et al.*, 2005; 2014; Wöhlbrand *et al.*, 2008). Ein entsprechendes Enzym des aeroben *p*-Ethylphenolabbaus in *Pseudomonas putida* Stamm JD1 wurde bereits gereinigt und charakterisiert (McIntire *et al.*, 1984; 1985; Reeve *et al.*, 1989). Der weitere Abbau des *p*-Hydroxyacetophenons war zu Beginn dieses Promotionsprojektes noch spekulativ. Mit Hilfe proteomischer Untersuchungen wurden jedoch erste Hinweise ermittelt, dass eine Biotin-abhängige Carboxylase (XccABC) und eine Thiolase (TioL) an der weiteren Umsetzung zu Benzoyl-CoA involviert sind (Wöhlbrand *et al.*, 2008).

Die Enzyme des anaeroben *p*-Ethylphenolabbaus, inklusive der postulierten Xcc und TioL, sind in einem Operon lokalisiert (Abb. 5). Das putative *etp* Operon scheint ähnlich zum postulierten Phenol-induzierten *pps-ppc* Operon, in Abhängigkeit des jeweiligen Substrates, durch einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen XylR-Typ Transkriptionsregulator reguliert zu werden (Rabus *et al.*, 2005; 2014; Wöhlbrand *et al.*, 2008). XylR Regulatorproteine sind bereits als Regulatoren des aeroben Kohlenwasserstoff- und Phenolmetabolismus bekannt (Yu *et al.*, 2011; Velazquez *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass die Bindung des spezifischen Substrates an der N-terminalen XylR Domäne eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge hat, wodurch die ATPase-Domäne für ATP oder den RNA-Polymerase- $\sigma^{54}$ -Komplex zugänglich und dadurch eine Transkriptionsinitiation ermöglicht wird (Perez-Martin und de Lorenzo, 1995). Zusätzlich benötigen XylR-Typ Regulatoren  $\sigma^{54}$ -abhängige Promotorsequenzen mit hoch konservierten -24 und -12 Regionen vor den zu regulierenden Genen (Barrios *et al.*, 1999). Das Genom von *A. aromaticum* enthält drei eng verwandte XylR-Typ Regulatoren (als PdeR1-3 bezeichnet), die eine hohe Sequenzähnlichkeit mit den Regulatoren für den aeroben Phenolabbau aufweisen (Rabus *et al.*, 2005). Außerdem enthalten alle drei postulierten XylR-regulierten Operons die essentiellen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotorsequenzen.

Zwei dieser Genprodukte (PdeR1 bzw. PdeR2) werden durch Gene kodiert, welche unmittelbar an das *pps-ppc* Operon bzw. das *etp* Operon angrenzen (Abb. 5). Dagegen konnten weder  $\sigma^{54}$ -abhängige Konsensussequenzen noch ein ko-lokalisiertes Gen für einen XylR-Typ Regulator für das putative *p*-Kresol Operon gefunden werden. Der dritte postulierte XylR-Typ Regulator wird durch ein Gen kodiert (*ebA5755*, in dieser Dissertation als *pdeR3* bezeichnet), welches in einem putativen Gencluster lokalisiert ist, das sich aus Genen zusammensetzt, die für paraloge Enzyme der Stoffwechsel von Ethylbenzol, *p*-Ethylphenol und Phenol kodieren (Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2005; Wöhlbrand und Rabus, 2009; Rabus *et al.*, 2014).

Interessanterweise liegt das *pdeR3* Gen zusätzlich in unmittelbarer Nähe zu einem Operon, das möglicherweise an der sogenannten Lösungsmittel-Stressantwort beteiligt ist (Rabus *et al.*, 2014). Bemerkenswert ist außerdem, dass dieses paraloge Gencluster auch zwei weitere Gene enthält, die für ein bisher unbekanntes TCS kodieren (*ebA5752/ebA5750*, in dieser Dissertation als *xdiRS* bezeichnet). Die Proteine XdiRS zeigen hohe Aminosäuresequenzähnlichkeiten zu den Komponenten AdiRS des putativen TCS für die Induktion der Gene des Acetophenonabbaus (Rabus *et al.*, 2005).

#### 4. Schwerpunkt und Zielsetzung

Schwerpunkt dieser Promotion war die Untersuchung des Mechanismus der spezifischen Sensierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen und phenolischen Substraten sowie die Regulation der Induktion der jeweiligen Abbauege in *A. aromaticum* Stamm EbN1. Im Mittelpunkt der Arbeit stand dabei das *adiRS* Operon, welches für das putative Zweikomponenten-Regulationssystem AdiRS kodiert, das als Aktivator für die substratspezifische Induktion der Enzyme des anaeroben Acetophenonmetabolismus vorgeschlagen wurde. Mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer, immunologischer und biochemischer Studien sollte an bestehende Vorarbeiten angeknüpft werden. Vor allem sollte eine *adiRS* Deletionsmutante durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette konstruiert sowie die Regulation der Expression des *apc-bal* Operon mittels Reporter genen untersucht werden. Dies sollte es ermöglichen, die Grundlage der spezifischen Diskriminierung der Gene des Acetophenonabbaus von denjenigen für andere sehr ähnliche Substrate wie z. B. *p*-Hydroxyacetophenon weiter aufzuklären.

## Ergebnisse

Der Ergebnisteil wird in vier aufeinander aufbauende Kapitel unterteilt, von denen die ersten zwei Kapitel bereits veröffentlichte Publikationen in englischer Sprache in den Journalen *Archives of Microbiology* und *Frontiers in Microbiology* sind. Das dritte Kapitel besteht aus noch nicht veröffentlichten Daten zur Analyse der Zweikomponenten-Regulationssysteme in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 und wird zur zukünftigen Publikation in Manuskriptform in englischer Sprache präsentiert. Es bedarf jedoch weiterer Experimente um finale Schlussfolgerungen zu ermöglichen. Erste weiterführende Schritte sind bereits an dieses Kapitel angefügt. Jedem dieser drei Kapitel wird eine Zusammenfassung in deutscher Sprache vorangestellt. Das vierte und abschließende Kapitel enthält erste Ergebnisse zur Transkriptionsstartbestimmung der Operons des anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonmetabolismus, die nicht Teil der vorherigen Publikationen und Manuskripte sind. Diese Ergebnisse sind in deutscher Sprache, aber ebenfalls in Manuskriptform präsentiert, um das Format der vorderen Kapitel beizubehalten.

Weiterhin sind die erhaltenen Daten zur Entdeckung und Isolierung möglicher neuer Zellkompartimente, welche nicht Teil der eigentlichen Dissertation sind, im Anhang angefügt.

## Übersicht über Publikationen und Manuskripte

1. Muhr E, Schühle K, Clermont L, Sünwoltd K, Kleinsorge D, Seyhan D, Kahnt J, Schall I, Cordero PR, Schmitt G, Heider J (2015) Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in ‘*Aromatoleum aromaticum*’: differentiation and differential induction. *Archives of Microbiology* 197(9):1051-1062. doi: 10.1007/s00203-015-1142-z  
Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Carboxylase-Experimente und Häm-Färbungen. Anfertigung des Manuskriptes mit JH.
2. Muhr E, Leicht O, González Sierra S, Thanbichler M, Heider J (2016) A fluorescent bioreporter for acetophenone and 1-phenylethanol derived from a specifically induced catabolic operon. *Frontiers in Microbiology* 6:1561. doi: 10.3389/fmicb.2015.01561  
Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente mit Ausnahme der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie (OL) und Durchflusszytometrie (SGS). Anfertigung des Manuskriptes mit JH und MT.

3. Muhr E, Leicht O, Schühle K, Kahnt J, González Sierra S, Clermont L, Thanbichler M, Heider J. Deletion of regulatory genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene and acetophenone in *Aromatoleum aromaticum*. [work under progress, to be submitted in *Journal of Bacteriology*]

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente mit Ausnahme der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie (OL), Massenspektrometrie (JK), Durchflusszytometrie (SGS), sowie der Planung und Konstruktion des *broad host range* Expressionsvektors (KS). Anfertigung des Manuskriptes.

Darlegung des Eigenanteils und Bestätigung durch einen Koautor:

---

Enrico Muhr

---

Johann Heider

# 1. Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in '*Aromatoleum aromaticum*': differentiation and differential induction

## 1.1. Zusammenfassung

Das denitrifizierende Bakterium *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 ist eines der am besten charakterisierten Bakterien, das die Fähigkeit des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol besitzt. EbN1 verstoffwechselt außerdem eine große Zahl anderer aromatischer sowie phenolischer Verbindungen in Abwesenheit von Sauerstoff. Eine dieser chemisch analogen Verbindungen ist das *p*-Ethylphenol bzw. das zugehörige Abbau-Intermediat *p*-Hydroxyacetophenon. Trotz der starken chemischen Ähnlichkeit und der bekannten Kreuzreaktionen der katabolischen Enzyme mit Intermediaten des Abbaus, werden die zwei Substrat-Paare Ethylbenzol/Acetophenon und *p*-Ethylphenol/*p*-Hydroxyacetophenon offenbar durch vollständig getrennte Wege mit spezifisch induzierten Enzymen metabolisiert. In dieser Studie wurden biochemische und molekularbiologische Methoden etabliert und angewendet, um die Spezifität der Enzyme des jeweiligen Abbauweges zu belegen. Zum einen wurden alle zugänglichen Enzymaktivitäten beider Stoffwechselwege bis zum gemeinsamen Intermediat Benzoyl-CoA ermittelt. Hierfür wurden EbN1 Kulturen analysiert, welche auf fünf unterschiedlichen Substraten kultiviert wurden. Ergänzt wurden die erhaltenen Daten durch Häm-Färbungen, sowie Immun- und Biotin-Blot-Analysen. Mit Hilfe der vorgestellten Methodensammlung lässt sich ein Muster der induzierten Enzyme in Zellen bestimmen, welche auf unterschiedlichen Substraten angezogen wurden. Überraschenderweise wurde eine hohe regulatorische Spezifität festgestellt, welche die Anwesenheit der korrekten Enzyme korrelierend zum jeweiligen Abbauweg gewährleistet. Die kombinierten Ergebnisse ermöglichen die Identifizierung und Differenzierung der Enzyme des Ethylbenzol-beziehungsweise des *p*-Ethylphenol-Katabolismus und bestätigen den vorhergesagten *p*-Ethylphenol-Abbauweg. Zu den identifizierten Enzymen gehören eine Häm *c* haltige *p*-Ethylphenol-Hydroxylase, eine (*R*)- und eine (*S*)-spezifische Alkoholdehydrogenase sowie eine neuartige Biotin-abhängige Carboxylase.

## 1.2. Artikelkopie

Eine Originalkopie der Publikation

„Muhr E, Schühle K, Clermont L, Sünwoldt K, Kleinsorge D, Seyhan D, Kahnt J, Schall I, Cordero PR, Schmitt G, Heider J (2015) Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in ‘*Aromatoleum aromaticum*’: differentiation and differential induction. *Archives of Microbiology* 197(9):1051-1062. doi: 10.1007/s00203-015-1142-z“

ist aus urheberrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung dieser Dissertation nicht verfügbar. Online-Zugriff auf die oben genannte Publikation erhalten Sie, über die Universitätsbibliothek Marburg, unter folgendem Link:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00203-015-1142-z>

## 2. A fluorescent bioreporter for acetophenone and 1-phenylethanol derived from a specifically induced catabolic operon

### 2.1. Zusammenfassung

Das  $\beta$ -Proteobakterium *Aromatoleum aromaticum* verstoffwechselt das aromatische Keton Acetophenon sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen. Acetophenon ist ein wichtiges Zwischenprodukt des anaeroben Ethylbenzolstoffwechsels, dessen weiterer Abbau über eine komplexe ATP-abhängige Acetophenon-Carboxylase und eine Benzoylacetat-CoA-Ligase erfolgt. Die Gene, welche diese Enzyme kodieren (*apcABCDE* und *bal*), sind in einem Operon lokalisiert und werden ausschließlich in Anwesenheit des Substrats Acetophenon exprimiert. In dieser Studie wurde ein Reporterstamm konstruiert, um die Bedingungen unter denen dieses Operon induziert wird, genauer zu analysieren. Hierfür wurde eine Fusion aus dem ersten Gen des *apcA-bal* Operons (*apcA*) und dem Gen, welches für das fluoreszierende Protein mCherry kodiert, erstellt und in das Chromosom von *A. aromaticum* integriert. Unter den getesteten Wachstumsbedingungen entsprach die Induktion des Fusionsproteins sowie dessen Fluoreszenzaktivität dem Expressionsmuster der Enzyme des Acetophenon-metabolismus. Nach der Auswertung der Daten der Fluoreszenzmikroskopie, der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie, sowie der Immunoblot-Analysen wurde nachgewiesen, dass die produzierte Menge an mCherry proportional zur eingesetzten Acetophenon Konzentration war. Der Reporterstamm ermöglicht die Quantifizierung von Acetophenon in einem Bereich von 25  $\mu\text{M}$  (errechnete Nachweisgrenze) bis 250  $\mu\text{M}$ . Die Konzentrationsbestimmung war nach Inkubationszeiten von 12 und 24 h sehr ähnlich und verschlechterte sich erst bei Inkubationszeiten von 48 h oder länger. Weiterhin zeigte sich die mCherry Produktion als hochspezifisch. Neben Acetophenon reagierte der Reporterstamm auf die beiden Enantiomere von 1-Phenylethanol, welche sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen leicht zu Acetophenon umgesetzt werden können. Andere chemisch analoge Verbindungen zeigten hingegen keine oder deutlich schwächere Signale. Der in dieser Studie konstruierte Reporterstamm stellt die Grundlage für die Entwicklung eines spezifischen Bioreportersystems mit Anwendungsmöglichkeiten, welche von der Umweltüberwachung bis hin zur Erdölsuche reichen.

### 2.2. Artikelkopie



# A Fluorescent Bioreporter for Acetophenone and 1-Phenylethanol derived from a Specifically Induced Catabolic Operon

Enrico Muhr<sup>1</sup>, Oliver Leicht<sup>2</sup>, Silvia González Sierra<sup>3,4</sup>, Martin Thanbichler<sup>2,3,4</sup> and Johann Heider<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Microbial Biochemistry, Department of Microbiology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany,

<sup>2</sup> Laboratory of Cellular Microbiology, Department of Microbiology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany,

<sup>3</sup> LOEWE Center for Synthetic Microbiology, Marburg, Germany, <sup>4</sup> Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Wael Ahmed Ismail,  
Arabian Gulf University, Bahrain

### Reviewed by:

Steven Ripp,  
University of Tennessee, USA  
Françoise Bringel,  
Centre National de la Recherche  
Scientifique/Université de Strasbourg,  
France

Eduardo Diaz,  
Biological Research Centre – Consejo  
Superior de Investigaciones  
Científicas, Spain

### \*Correspondence:

Johann Heider  
heider@biologie.uni-marburg.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbiotechnology, Ecotoxicology  
and Bioremediation,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 09 October 2015

**Accepted:** 23 December 2015

**Published:** 28 January 2016

### Citation:

Muhr E, Leicht O, González Sierra S,  
Thanbichler M and Heider J (2016)  
A Fluorescent Bioreporter  
for Acetophenone  
and 1-Phenylethanol derived from  
a Specifically Induced Catabolic  
Operon. *Front. Microbiol.* 6:1561.  
doi: 10.3389/fmicb.2015.01561

The  $\beta$ -proteobacterium *Aromatoleum aromaticum* degrades the aromatic ketone acetophenone, a key intermediate of anaerobic ethylbenzene metabolism, either aerobically or anaerobically via a complex ATP-dependent acetophenone carboxylase and a benzoylacetate-CoA ligase. The genes coding for these enzymes (*apcABCDE* and *baI*) are organized in an apparent operon and are expressed in the presence of the substrate acetophenone. To study the conditions under which this operon is expressed in more detail, we constructed a reporter strain by inserting a gene fusion of *apcA*, the first gene of the *apc-baI* operon, with the gene for the fluorescent protein mCherry into the chromosome of *A. aromaticum*. The fusion protein indeed accumulated consistently with the expression pattern of the acetophenone-metabolic enzymes under various growth conditions. After evaluating and quantifying the data by fluorescence microscopy, fluorescence-based flow cytometry and immunoblot analysis, mCherry production was found to be proportional to the applied acetophenone concentrations. The reporter strain allowed quantification of acetophenone within a concentration range of 50  $\mu$ M (detection limit) to 250  $\mu$ M after 12 and 24 h. Moreover, production of the Apc-mCherry fusion protein in the reporter strain was highly specific and responded to acetophenone and both enantiomers of 1-phenylethanol, which are easily converted to acetophenone. Other analogous substrates showed either a significantly weaker response or none at all. Therefore, the reporter strain provides a basis for the development of a specific bioreporter system for acetophenone with an application potential reaching from environmental monitoring to petroleum prospecting.

**Keywords:** *Aromatoleum aromaticum*, acetophenone, bioreporter, fluorescence microscopy, flow cytometry, immunoblot, mCherry

## INTRODUCTION

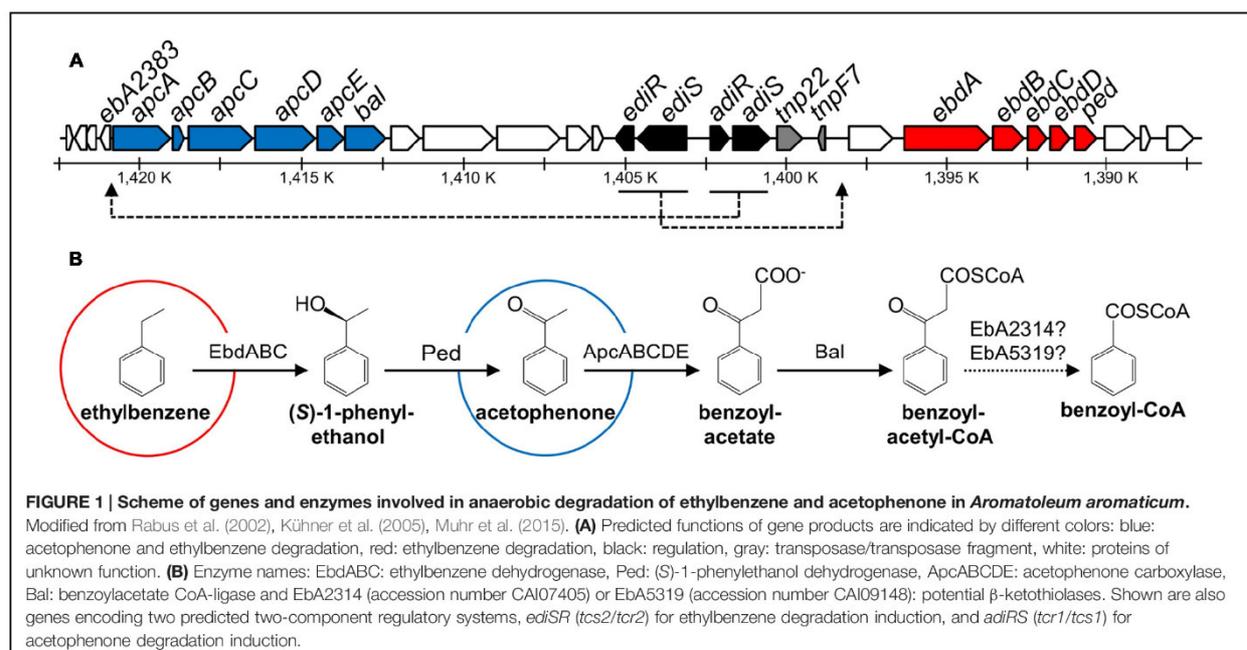
Among many other aromatic substrates, the  $\beta$ -proteobacterium *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1 degrades the aromatic ketone acetophenone (phenylmethylketone) as sole carbon and energy sources (Rabus and Widdel, 1995). When grown anaerobically in the presence of nitrate, it utilizes acetophenone either directly or as a metabolic intermediate in the degradation of

ethylbenzene (Figure 1), whereas under aerobic conditions, only acetophenone is metabolized, but not ethylbenzene (Rabus and Widdel, 1995; Rabus and Heider, 1998; Heider et al., 1999; Jobst et al., 2010). The industrial use of acetophenone includes applications as solvent and precursor for the production of resins, but also as a food-flavoring agent or fragrance for cosmetics. Acetophenone vapors may cause skin irritation and transient corneal injury in humans after short-term exposure, but no information is available on potential long-term effects (Hagan et al., 1967; US EPA, 1999). Compared to the relatively low toxicity of acetophenone, some of its halogenated derivatives (e.g., the tear gas compound 2'-chloroacetophenone) are highly toxic and cause environmental problems when spilled (Olajos and Salem, 2001). Toxicity of acetophenone toward growth of microorganisms has been reported at concentrations of 0.4–30 mM (Fedorov et al., 1993; Hage et al., 2001; Yang et al., 2008).

Microbial degradation of acetophenone and chloroacetophenones has been known for a long time and was initially believed to be restricted to aerobic microorganisms, which initiate the metabolic pathway by a Baeyer-Villiger oxidation to (chloro)phenyl-acetate esters (Cripps, 1975; Havel and Reineke, 1993). This reaction is catalyzed by a variety of oxygenases that usually accept many different substrate analogs (Jones et al., 1994; Kamerbeek et al., 2003). An oxygen-independent degradation pathway of acetophenone has been discovered in denitrifying bacteria capable of anaerobic ethylbenzene degradation, with *A. aromaticum* EbN1 as the best characterized strain (Figure 1; Rabus and Widdel, 1995; Ball et al., 1996; Rabus and Heider, 1998; Champion et al., 1999; Jobst et al., 2010). This pathway starts by oxidizing ethylbenzene to

acetophenone in two enzymatic steps via (S)-1-phenylethanol, utilizing the molybdoenzyme ethylbenzene dehydrogenase (Johnson et al., 2001; Kniemeyer and Heider, 2001a) and an NAD-dependent (S)-1-phenylethanol dehydrogenase (Kniemeyer and Heider, 2001b; Höffken et al., 2006), while acetophenone is further degraded to benzoyl-CoA (Rabus and Heider, 1998; Jobst et al., 2010). *A. aromaticum* also degrades acetophenone as sole substrate, using the same pathway under anaerobic and aerobic growth conditions (Rabus and Widdel, 1995; Ball et al., 1996). The same strain is known to degrade the close chemical analog 4'-hydroxyacetophenone, albeit using a completely different pathway (Wöhlbrand et al., 2008).

Acetophenone degradation by *A. aromaticum* is initiated by a highly complex ATP-dependent acetophenone carboxylase (Apc) which produces benzoylacetate (Jobst et al., 2010). This enzyme has been purified and characterized from cells grown under denitrifying conditions on either ethylbenzene or acetophenone (Jobst et al., 2010). It consists of five subunits (ApcABCDE) that are encoded in an operon together with a gene coding for benzoylacetate CoA-ligase (*bal*; Figure 1; Rabus et al., 2002). Four subunits (ApcABCD) form a  $(\alpha\beta\gamma\delta)_2$  core complex of 485 kDa, which contains tightly bound Zn atoms believed to be essential for carboxylase activity. The fifth subunit (ApcE) is separated from the complex during purification and needs to be added to restore activity *in vitro*. The reconstituted enzyme exhibits a stoichiometry of two ATP hydrolyzed to ADP per acetophenone carboxylated (Jobst et al., 2010). The generated benzoylacetate is subsequently activated to the CoA-thioester by a CoA-ligase (Rabus and Heider, 1998; Rabus et al., 2002; Muhr et al., 2015), and benzoylacetate-CoA is cleaved by a so far unknown thiolase to acetyl-CoA and benzoyl-CoA, the common intermediate in



the anaerobic metabolism of aromatic compounds (Heider and Fuchs, 1997a,b; Carmona et al., 2009; Fuchs et al., 2011). The *apc-bal* operon is part of a larger gene cluster including the *ebd-ped* operon and genes coding for two two-component regulatory systems (Figure 1; Rabus et al., 2002).

The enzymes of acetophenone metabolism are apparently regulated in response to the availability of the substrate, but independently of those of ethylbenzene metabolism (Kühner et al., 2005; Rabus et al., 2014; Muhr et al., 2015) or those involved in degradation of the close chemical analogs 4'-ethylphenol and 4'-hydroxyacetophenone (Wöhlbrand et al., 2008; Rabus et al., 2014; Muhr et al., 2015). In order to analyze the mechanisms regulating the acetophenone-metabolic genes, we constructed an *A. aromaticum* strain carrying a chromosomally integrated fusion of the first gene of the *apc-bal* operon (*apcA*) with the gene for the fluorescent protein mCherry (Shaner et al., 2004) and tested for its expression in the presence of various potential inducers. This strain indeed responded to acetophenone and both enantiomers of 1-phenylethanol in a concentration- and time-dependent manner and showed high substrate specificity.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains and Growth Conditions

The streptomycin-resistant *A. aromaticum* strain EbN1-SR7 (Wöhlbrand and Rabus, 2009) was grown at 28°C under denitrifying conditions in mineral salt medium on a rotary shaker as described elsewhere (Rabus and Widdel, 1995; Rabus and Heider, 1998; Muhr et al., 2015). Bacterial growth was followed by measuring optical density at 578 nm and the consumption of nitrate by using semiquantitative test strips (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For time- and concentration-dependent analysis we inoculated the reporter strain in carbonate-buffered mineral salt media containing 1.5 mM of benzoate in hungate tubes under aerobic conditions. These cultures were incubated for 24 h at 28°C, until they had reached an OD<sub>578</sub> of 0.4–0.5 and most of the benzoate was consumed (typical residual benzoate concentrations were 0.2 mM). At this point ( $t = 0$  h), different concentrations of acetophenone were added. For conjugational plasmid transfer, strain EbN1-SR7 was grown in a modified mineral salt medium described previously (Wöhlbrand and Rabus, 2009).

*Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB media (Sambrook and Russell, 2001). If required, the growth medium was solidified with 1.5% (w/v) agar. Antibiotics were added at the following final concentrations: kanamycin 30–50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and streptomycin 30–50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The diaminopimelate (DAP) auxotrophic *E. coli* strain WM3064, a derivative of strain  $\beta$ 2155 (Dehio and Meyer, 1997), was grown on media containing 0.3 mM DAP. *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was used for all cloning purposes (Taylor et al., 1993).

### DNA Techniques and Plasmid Transfer

All enzymes and kits for the isolation of DNA or the purification of PCR products or restriction fragments were

purchased from Thermo Scientific™ (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) or Analytik Jena (Jena, Germany). Oligonucleotide primers were ordered from biomers.net GmbH (Ulm, Germany). Sequences were analyzed using pDRAW32 (ACACLONE software) and DNAMAN (Lynnon Biosoft) software.

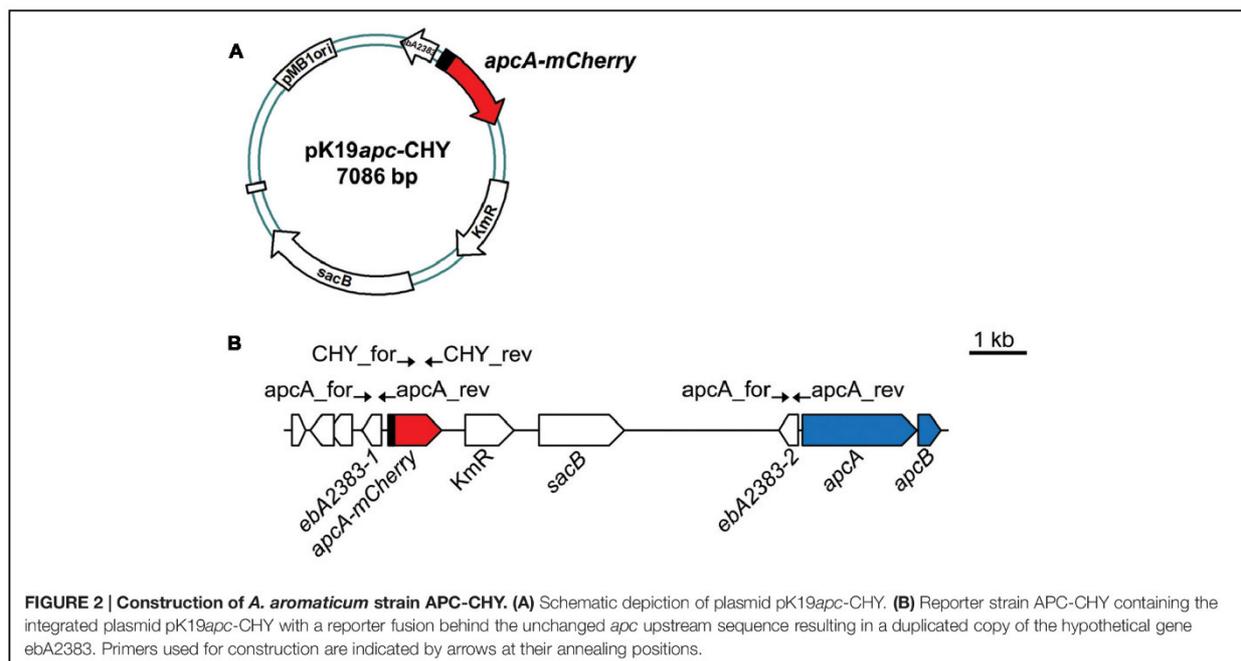
Plasmids were transferred into *E. coli* strains by transformation using chemically competent cells (Inoue et al., 1990) and into *A. aromaticum* by conjugation (Wöhlbrand and Rabus, 2009). Bacterial mating and conjugational plasmid transfer were performed as described before (Wöhlbrand and Rabus, 2009), with the exception that the DAP-auxotrophic *E. coli* strain WM3064 was used as donor strain.

### Construction of a Chromosomal *apcA*-mCherry Insertion Mutant

To generate a strain with a chromosomal integration of an *apcA*-mCherry fusion, we used the suicide-vector pK19mobsacB (Schäfer et al., 1994), which had previously been used to create a knock-out mutant in *A. aromaticum* (Wöhlbrand and Rabus, 2009). The procedure was modified to promote only a single crossover event with the chromosomal DNA, leading to the stable insertion of the entire vector plus the cloned fragment (Figure 2B). A fragment of the *mCherry* gene lacking the start codon (starting from third codon) was amplified from plasmid pCHYC-2 (Thanbichler et al., 2007) using primers CHY\_for\_XbaI (5'-AATCTAGAAAAGGGCGAGGAGGATAACATG-3') and CHY\_rev\_EcoRI (5'-AAGAATTCTTACTGTACAGCTC GTCCATG-3'), restricted with *Xba*I and *Eco*RI, and ligated into the equally treated vector pK19mobsacB to generate pK19CHY (6401 bp). In addition, a fragment including 607 bp of the 5' upstream region and the first 96 bp of the first gene of the *apc*-operon (*apcA*) was amplified from genomic DNA of strain EbN1-SR7 using primers *apcA*\_for\_HindIII (5'-GCAAGCTTGGCGATTACCCGTTTCG-3') and *apcA*\_rev\_XbaI (5'-AATCTAGACGGGGTGGTGTCCACCTTG-3'), restricted with *Hind*III and *Xba*I, and ligated into the equally treated pK19CHY. The resulting plasmid, pK19*apc*-CHY (7086 bp), was sequenced and contained the first 32 codons of *apcA* fused to the *mCherry* gene. It was conjugated into EbN1-SR7, and the transconjugants were purified at least three times on DAP-free media to guarantee the purity of the cultures and absence of residual *E. coli* contamination. The colonies were screened for the presence of plasmid-mediated kanamycin resistance, which should indicate chromosomal integration by a crossover event in the homologous upstream sequence of *apcA*. The proper insertion of the plasmid at the predicted site was verified by colony PCR of the kanamycin-resistant *apcA*-mCherry mutant (data not shown), henceforth designated as strain APC-CHY.

### Fluorescence Microscopy

Cultures of strain APC-CHY grown either aerobically or under denitrifying conditions were exposed to air for at least 1 h at room temperature before being immobilized on a 1% agarose-pad.



Cells were analyzed using a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss, Germany) equipped with a Zeiss Plan-Apochromat 100 $\times$ /1.46 numeric-aperture oil differential interference contrast (DIC) M27 objective, a Chroma ET-mCherry filter set, and a pco.edge sCMOS camera (PCO, Germany). Images were analyzed and processed with ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), Metamorph 7.7.5 (Universal Imaging Group, USA), and Illustrator CS5 (Adobe Systems, USA). All fluorescence images (500 ms exposure) shown in this study were scaled equally (monochrome, threshold setting 250/10,000) for comparison in brightness. For the quantitative analysis of relative mean and maximum fluorescence signal response (threshold set at 750 units), the fluorescence images were divided into 10–15 sectors each containing about 25 cells. Each sector was analyzed separately, and average values were generated.

### Flow Cytometry

For fluorescence-based flow cytometry, bacterial cells were washed two times with fresh mineral salt medium in which the substrates were omitted and diluted 1:100 in tethering buffer (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM lactic acid, 0.1 mM EDTA, and 1  $\mu$ M L-methionine, pH 7.0). Fluorescence-activated cell analysis was carried out on a BD LSRFortessa<sup>TM</sup> SORP flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; Piatkevich and Verkhusha, 2011; Telford et al., 2012). Fluorescence was detected using a 561-nm laser (yellow-green) at 100 mW for excitation and a 610/20 bandpass filter. The forward and side scatter values were monitored using a 488-nm laser (blue) at 50 mW. The acquired data were analyzed using BD FACSDiva<sup>TM</sup> software version 8.0 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) with data collected in FCS 3.0 file format.

### Electrophoretic Methods and Immunoblotting

Defined amounts of protein (50  $\mu$ g) from crude extracts were separated by discontinuous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12.5% (w/v) polyacrylamide gels in the Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, Munich, Germany) as described elsewhere (Laemmli, 1970). For extract preparation, cell suspensions were disrupted by sonication and cell debris and membranes were removed by ultracentrifugation at 100,000  $\times$  g and 4 $^{\circ}$ C for 1 h. Protein concentrations were determined using a Coomassie dye binding assay with bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). Immunodetection with anti-mCherry antiserum was performed as described before (Jung et al., 2014). For quantitation of the immunocomplexes, the signals were recorded by a ChemiDoc MP imaging system as volume (intensity) of the respective bands using Image Lab 5.0 software (Bio-Rad, Munich, Germany). All ApcA-mCherry fusion protein signals are presented in arbitrary units (a.u.), where one unit corresponds to an original volume (intensity) readout value of 10<sup>6</sup>. Data were fitted using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). To control for equal loading, all membranes were stained with Ponceau S [0.1% (w/v) in 5% (v/v) acetic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA].

### Determination of Benzoate Concentrations

To determine the concentrations of benzoate in culture supernatants, 10% (v/v) of a 1 M NaHSO<sub>4</sub> solution was added to reach a final pH of  $\sim$ 2.0. After centrifugation (15,000  $\times$  g for 5 min), the absorbance at 230 nm was detected using UV-cuvettes

(Robinson, 1991) and the concentration of benzoic acid was calculated from its extinction coefficient ( $\epsilon = 11,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## RESULTS

### Construction of a Chromosomal Fluorescent Reporter Fusion

Previous studies addressing enzyme activities in *A. aromaticum* cells grown on various substrates indicated that acetophenone-catabolic genes are exclusively induced in cells grown on acetophenone or ethylbenzene (Jobst et al., 2010; Rabus et al., 2014; Muhr et al., 2015). In order to further elucidate the induction pattern of these genes *in vivo*, we constructed a translational fusion of the first 32 codons of the *apcA* gene with the *mCherry* gene to generate a fluorescent reporter system (Figure 2). To avoid potential problems resulting from multiple copies of a plasmid-borne reporter gene, we integrated the *apcA-mCherry* reporter fusion into the chromosome of strain EbN1-SR7 (Wöhlbrand and Rabus, 2009) by inserting plasmid pK19*apc*-CHY upstream of the first gene of the *apc-bal* operon through a single cross-over event (Figure 2). The resulting mutant strain, APC-CHY, carried the reporter fusion behind the unchanged *apc* upstream sequence plus a duplicated copy of 607 bp of the *apc* upstream sequence, followed by the entire *apc-bal* operon. The identity of this strain was verified by its kanamycin resistance and by testing for proper integration of the plasmid using PCR analysis. Additionally, its growth properties with ethylbenzene, acetophenone, or benzoate did not differ significantly from those of the wild-type strain (data not shown).

### Reporter Gene Response to Different Growth Conditions

The reporter strain derived from *A. aromaticum* was grown to mid-exponential phase (72 h) under different conditions in carbonate-buffered mineral salt media. The expression of the reporter gene fusion was observed in parallel by fluorescence microscopy and quantitative immunoblotting with antiserum against mCherry (Figure 3). We observed increased fluorescence intensities in all APC-CHY cells grown anaerobically on 2 mM acetophenone or ethylbenzene as well as in those grown aerobically on acetophenone, whereas none of the cultures grown on 4 mM benzoate, 1 mM toluene, or 1 mM 4'-ethylphenol showed significant fluorescence intensities (Figure 3A; cultures on toluene or 4'-ethylphenol not shown).

The presence of ApcA-mCherry was additionally confirmed by quantitative immunoblotting of extracts separated on an SDS gel (Figure 3B). The antiserum reacted strongly with ApcA-mCherry (30.1 kDa) and with a protein corresponding in size to free mCherry protein (~27 kDa), which likely results from degradation of the fusion protein in cells grown on acetophenone (Figures 3B,C). The strongest signal intensity of ApcA-mCherry in cells grown on acetophenone was set as 100%. In comparison, cells grown anaerobically on benzoate plus acetophenone or aerobically on acetophenone showed

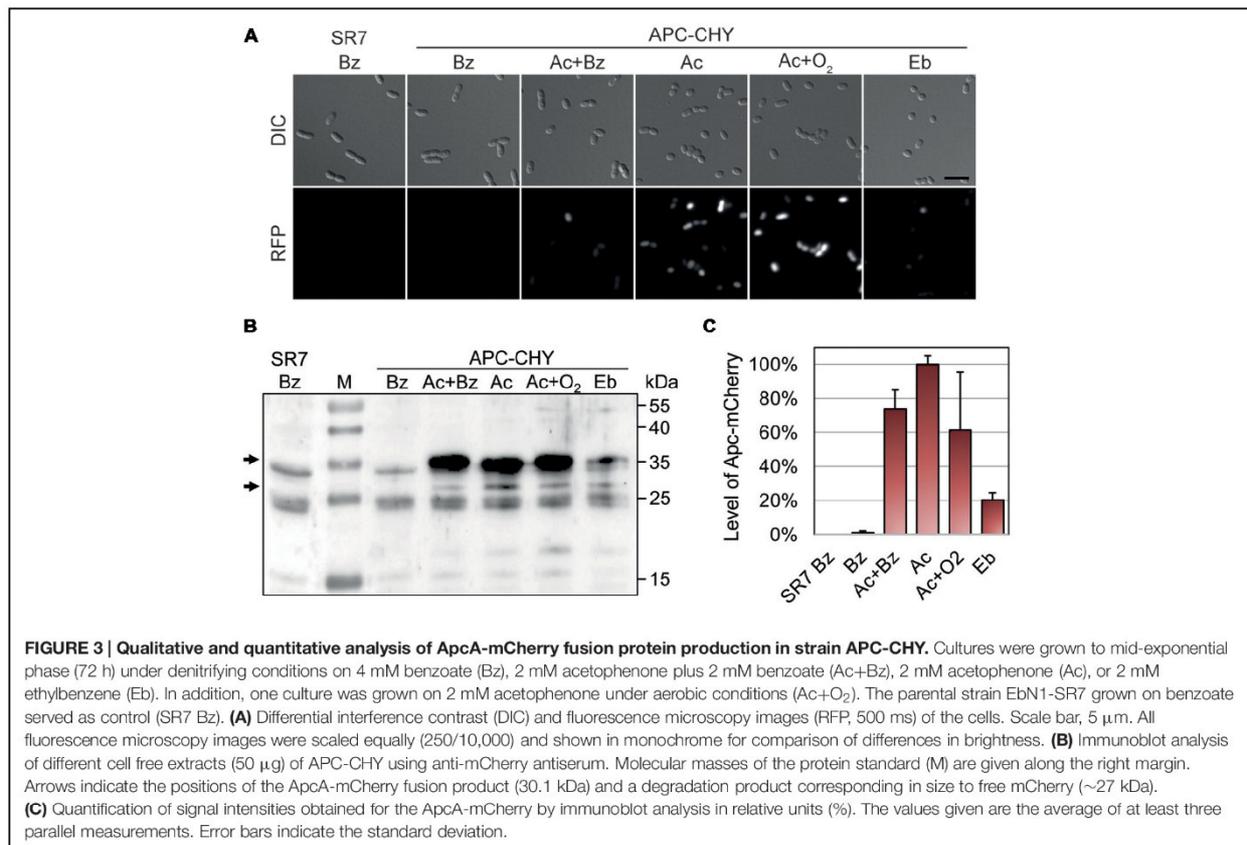
signal intensities of 75 and 60%, respectively. Cultures of strain APC-CHY grown on ethylbenzene showed signal intensities of 20% under the same conditions. In contrast, controls grown anaerobically on benzoate did not show significant immunoblot signals (Figures 3B,C). The few cross-reacting bands in the control show the same pattern as an immunoblot of the parental strain without chromosomally integrated mCherry and are therefore unrelated to the mCherry protein (Figure 3B).

### Development of a Quantitative Acetophenone Sensor System

We examined whether the newly constructed reporter system can be used to quantify the concentrations of acetophenone in growth media of *A. aromaticum*. To avoid problems with the oxygen demand for developing the mCherry fluorescence (Shaner et al., 2004), we decided to shift to aerobic growth conditions for setting up a sensory system. To this end, we inoculated the reporter strain in carbonate-buffered mineral salt media containing 1.5 mM of benzoate. After 24 h ( $t = 0$  h), different concentrations of acetophenone were added and samples were taken for up to 96 h. The respective reporter output values were analyzed by quantitation of the relative fluorescence intensities from fluorescence microscopy images as well as fluorescence based flow cytometry and confirmed by quantitative immunoblot analysis of ApcA-mCherry signals.

Various tested cultures showed a strict dependence of their fluorescence output on the applied acetophenone concentrations. To illustrate this correlation, samples of two biological replicates were taken 24 h after different concentrations of acetophenone (0–1000  $\mu\text{M}$ ) had been added. From each replicate at least two fluorescence microscopy images were taken and scaled equally for comparison of differences in brightness (Figure 4A). The acetophenone-dependent relative fluorescence signals were quantified by measuring the mean and maximum fluorescence signals of individual cells (threshold set at 750 units) and averaging the data. In both cases, a linear correlation was observed between acetophenone concentration and fluorescence output up to an acetophenone concentration of 250  $\mu\text{M}$  (Figure 4B, Supplementary Figure S1). For both evaluation methods, the fluorescence output was saturated at acetophenone concentrations over 250  $\mu\text{M}$ . Therefore, the reporter strain allows quantification of acetophenone within a concentration range of 50  $\mu\text{M}$  (detection limit) to 250  $\mu\text{M}$ .

The correlation of acetophenone concentration with mCherry fluorescence was also independently proven by flow cytometric analysis of samples taken from the same cultures that had been used for fluorescence microscopic analysis. To achieve this, 20,000 cells per acetophenone concentration from each replicate were analyzed by measuring their relative mean fluorescence signals (Figure 4C). Again, a linear correlation was observed for concentrations up to 250  $\mu\text{M}$  acetophenone, which turned over to a saturated reaction at higher substrate concentrations, exactly mimicking the results obtained from fluorescence measurements using microscopy images.



### Time-Dependence of the Assay

In addition to the concentration dependence, the quantitation of various samples taken after different incubation times showed a time-dependency of the fluorescence output. Apart from using the two fluorescence-based methods mentioned above, we analyzed the same samples for presence of ApcA-mCherry fusion proteins directly, using quantitative immunoblot analysis of the respective cell free extracts with antiserum against mCherry. Samples were analyzed for up to 96 h after exposing the cultures to different concentrations of acetophenone (Figure 5A). In contrast to the linear correlation between substrate concentration and output observed for the fluorescence-based methods, the direct quantitation of fusion protein yielded obvious saturation kinetics curves, at least for the samples analyzed after 12 and 24 h (Figures 5B,C). The data fitted very well to the following equation, where  $P$  is the measured immunoblot signal,  $c$  is the acetophenone concentration,  $max$  is the saturation value,  $K$  is the concentration at half-maximum saturation, and  $B$  is the background value without added acetophenone.

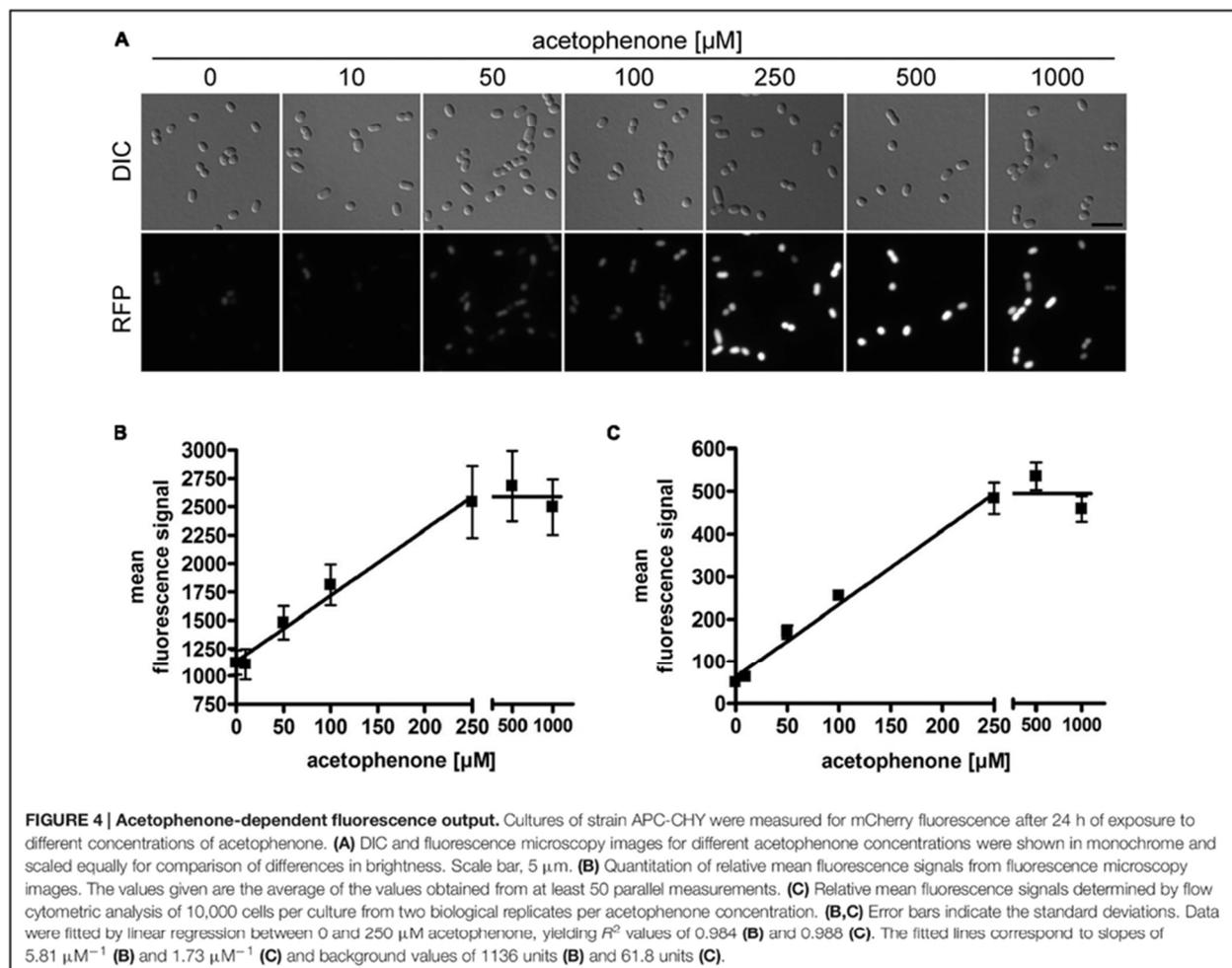
$$P = \frac{max * c}{K + c} + B$$

As an additional control, a sample of strain APC-CHY grown under denitrifying conditions on 2 mM acetophenone to mid-exponential phase (72 h, see Figure 3B) was included in the

immunoblots (Figure 5A, labeled with +). The concentration dependence of the Apc-mCherry levels after 12 and 24 h was very similar and again allowed a good resolution of acetophenone concentrations in the range of 50–250 μM. However, as seen in Figure 5A, the correlation between acetophenone concentration and Apc-mCherry content deteriorated with longer exposure times. Similar results were obtained by fluorescence microscopy from APC-CHY cells after 48 h exposure as well as by flow cytometry analysis after 48 and 72 h exposure (data not shown).

### Specificity of Acetophenone Sensing

Activity of acetophenone carboxylase (ApcABCDE) has been shown to be highly specific toward its natural substrate acetophenone (Jobst et al., 2010; Muhr et al., 2015). Therefore, we investigated the fluorescence signal response to metabolic precursors as well as different chemical analogs of acetophenone using the same experimental procedure described above. All these substrates were added individually to a culture pre-grown on benzoate for 24 h under aerobic conditions at final concentrations of 0.5 mM. After 16 h of exposure, samples were analyzed by fluorescence microscopy (Supplementary Figure S2). The relative mean fluorescence signals (threshold set at 750 units) as well as the maximum fluorescence signals were quantified from fluorescence microscopy images as

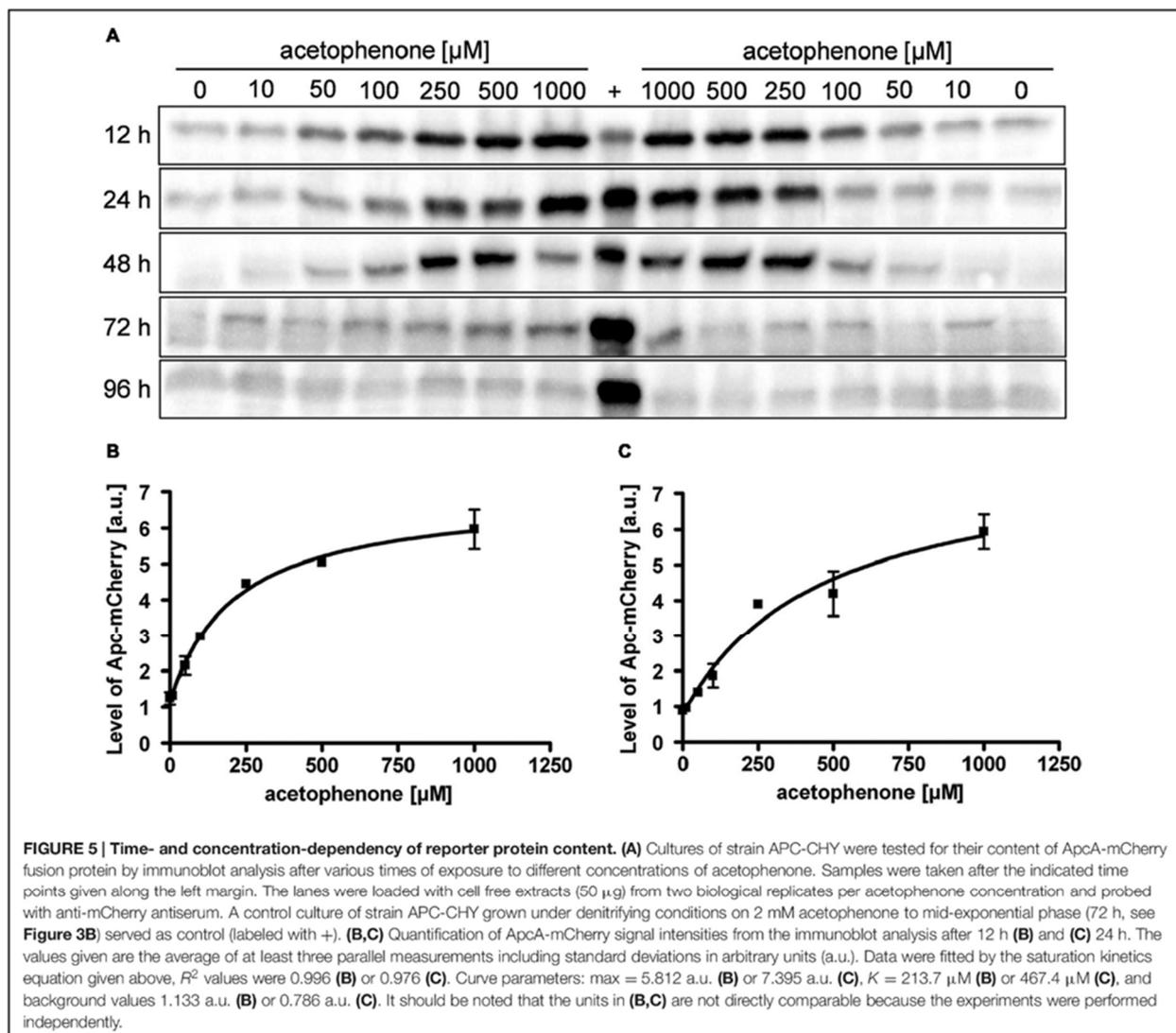


described above (Figure 6A, Supplementary Figure S3). The highest induction levels were observed if acetophenone or its immediate metabolic precursors, (S)- or (R)-1-phenylethanol were added (Figure 6A). The response obtained with acetophenone was taken as 100% reference. In both evaluation variants, the (S)-enantiomer of 1-phenylethanol showed a slightly higher fluorescence signal response than the (R)-enantiomer, reaching a mean value of 91% and a maximum value of 94% of the level obtained with acetophenone, compared to values of 82 and 80%, respectively (Figure 6A, Supplementary Figure S3). The inducing effect of the alcohols is most probably due to their conversion to acetophenone, as suggested by analyzing the concentration dependence for (S)-1-phenylethanol, which revealed virtually identical saturation kinetics as determined for acetophenone (Supplementary Figure S4).

Interestingly, the fluorescence signals observed under aerobic growth conditions with added ethylbenzene had approximately the same intensities as the ones obtained for the close acetophenone analog propiophenone with mean

values of 44 and 46% of the reference value, respectively (Figure 6A). Among all other substrate analogs tested, only the fluoroacetophenone isomers generated relatively high mean fluorescence signal values of 58, 43 and 58%, whereas cultures induced with the hydroxyacetophenone isomers showed very weak signals of 21–24% of the reference. A number of other tested compounds yielded only fluorescence values similar to the level of the negative control with benzoate (Figure 6A, Supplementary Figure S2). These substrates included further ring-substituted acetophenone derivatives such as 2'-chloroacetophenone, 2'-methylacetophenone, and 4'-methylacetophenone, the hydrocarbon analogs toluene and styrene, the phenolic analogs phenol, 4-cresol and 4'-ethylphenol, as well as the side chain analogs 2-phenylethanol, phenylacetaldehyde, and styrene oxide (for recorded data see Supplementary Figure S2).

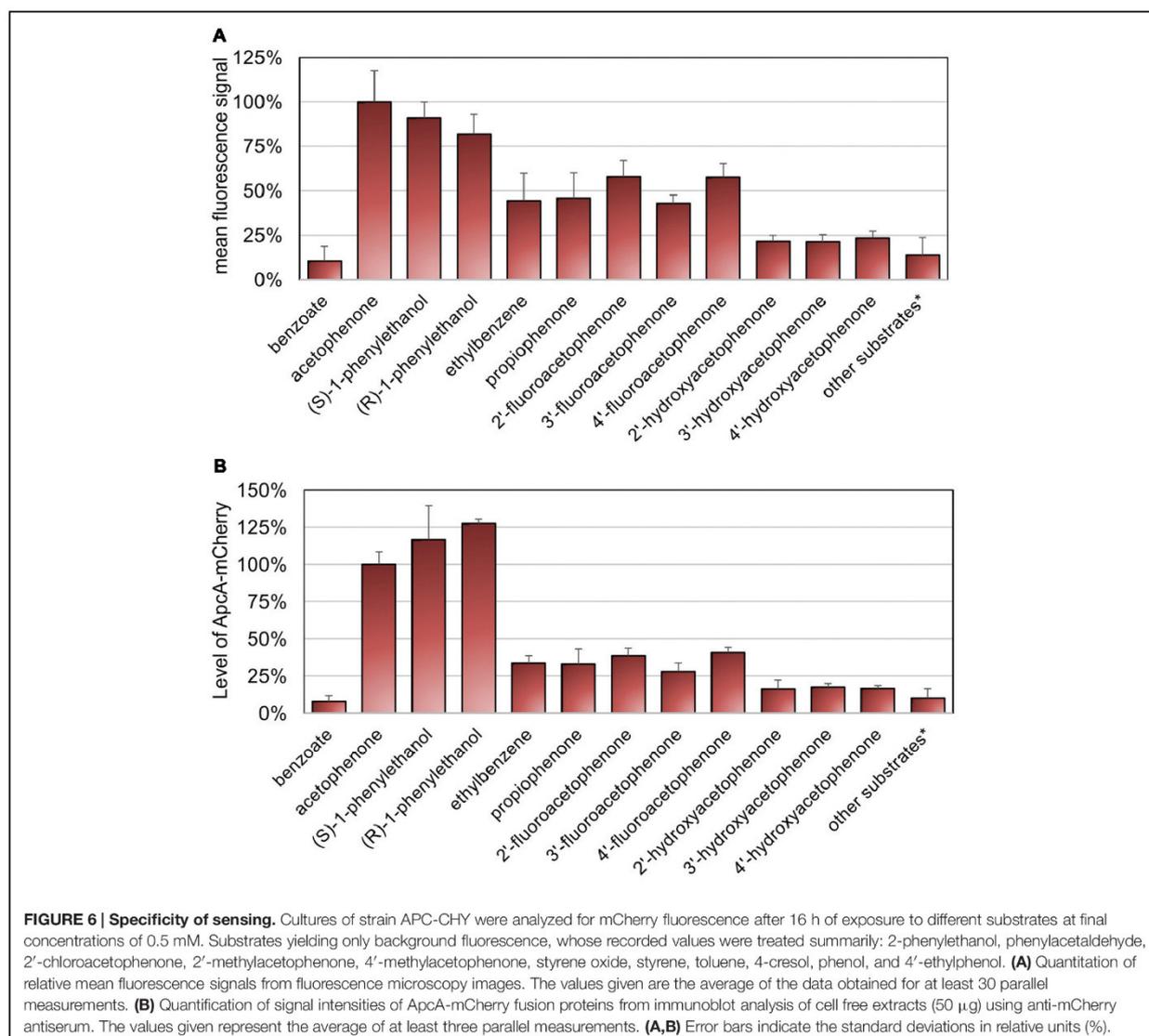
The relative fluorescence intensities determined for the various substrates were confirmed by quantitative immunoblot analysis (Figure 6B, Supplementary Figure S5). The signal intensities of ApcA-mCherry proteins were quantified and compared to cells induced with 0.5 mM acetophenone (set as



100%). As for the data evaluated by fluorescence microscopy, the highest content of ApcA-mCherry fusion protein was observed if acetophenone or its immediate metabolic precursors (*S*)- or (*R*)-1-phenylethanol were present. The induction levels measured for the (*S*)- and (*R*)-enantiomers of the alcohol were even 1.2 and 1.3 times higher than with acetophenone, respectively (**Figure 6B**). In contrast, control cells grown on benzoate showed only a basal level of 7.9% of the value obtained with acetophenone. Moreover, as observed by fluorescence microscopy, cells exposed to the fluoroacetophenone isomers showed a medium content of ApcA-mCherry fusion protein (39, 28, and 41%, respectively, compared to acetophenone), whereas the hydroxyacetophenone isomers yielded very weak induction levels in the range of 16–18% of the reference value. All other substrates tested in this study gave rise to Apc-mCherry levels of less than 16%, which were very close to the level of the control.

## DISCUSSION

In this study we present the first fluorescent reporter gene fusion constructed in the denitrifying betaproteobacterium *A. aromaticum*, which is a highly versatile degrader of many aromatic compounds (Rabus and Widdel, 1995; Rabus and Heider, 1998; Boll et al., 2002; Rabus et al., 2005, 2014). A strain containing a chromosomally integrated fusion of the first gene of the acetophenone-metabolic *apc-bal* operon with the gene for the fluorescent mCherry protein appears to serve as a reliable reporter system for the presence of certain aromatic compounds without changing the physiological properties of the host strain. Like most other available fluorescent protein reporter systems, mCherry is dependent on exposure to oxygen for the maturation of the protein-derived fluorophore, but it exhibits a relatively fast maturation rate (Shaner et al., 2004, 2005;



Merzlyak et al., 2007). We observed that even for cells from strictly anaerobic cultures, exposure of the samples to air for 60 min (including the required processing time for microscopy or other analytical procedures) was sufficient to ensure maturation of the mCherry fusion proteins. Cultures grown under aerobic conditions showed full fluorescence intensities already without preincubation. The presence and quantity of the mCherry fusion proteins was evaluated by three independent methods and showed an excellent correlation between reporter gene expression and the growth conditions under which the enzymes encoded by the induced operon are active (Rabus et al., 2002, 2014; Kühner et al., 2005; Muhr et al., 2015). It was also confirmed here that the *apc-bal* operon is highly induced during acetophenone metabolism under both anaerobic and aerobic growth conditions.

The reporter strain constructed in this study was used to establish a quantitative signal/response relation for the physiological substrate acetophenone based on three independent detection systems. Fluorescence intensities obtained from fluorescence microscopy images or flow cytometric analysis as well as mCherry fusion protein contents were proportional to the applied acetophenone concentrations, providing an effective means to determine unknown concentrations over a range spanning almost one order of magnitude. We observed a linear dependence of the fluorescence signals with acetophenone concentrations of up to 250  $\mu$ M for the two fluorescence-based detection methods, which turned abruptly into saturation at higher substrate concentrations. In contrast, the concentration dependence of immunologically detected fusion protein was best described by saturation kinetics.

This apparent discrepancy might be due to self-absorbance phenomena at high concentrations of fluorescent proteins in the cytoplasm. The readout of the system was very similar after 12 and 24 h of incubation and only deteriorated after 48 h or longer incubation times, probably because of different extents of degradation of the added acetophenone. Another explanation could lie in toxic or growth limiting effects of acetophenone when added at high concentrations of 0.5 and 1 mM.

Notably, the sensing system seems to be rather specific for acetophenone and its immediate metabolic precursors, (S)- or (R)-1-phenylethanol. Its inability to discriminate between the 1-phenylethanol enantiomers and acetophenone was expected, since *A. aromaticum* is known to contain several alcohol dehydrogenases with significant activities capable of interconverting acetophenone and the 1-phenylethanol enantiomers (Kniemeyer and Heider, 2001b; Rabus et al., 2005; Höffken et al., 2006). This notion is corroborated by the identical response kinetics recorded for (S)-1-phenylethanol and acetophenone. Weaker, but still significant fluorescence signals were also recorded after exposure to ethylbenzene, propiophenone, and the isomers of fluoroacetophenone. This suggests that lack of the oxo-group of acetophenone, elongation of the side chain by one C, or presence of a fluoro-substituent at the aromatic ring still allow partial recognition by the regulator protein(s) responsible. Remarkably, propiophenone and the fluoroacetophenones are also among the few substrates efficiently carboxylated by acetophenone carboxylase (Jobst et al., 2010).

In contrast to either of these compounds, the hydroxyacetophenone isomers elicit almost no response, while other ring-substituted analogs like 2'-chloroacetophenone, 2'- or 4'-methylacetophenone only yield values in the range of the negative control. This correlates well with the respective bond lengths, which are shortest for fluoro- and subsequently longer for hydroxyl-, methyl-, and chloro-substituents at aromatic rings (Clugston and Flemming, 2000). Therefore, the fluoroacetophenones are the closest mimics of acetophenone, whereas larger substituents prevent the respective molecules from binding to either the catalytic enzyme or the respective regulator(s). The absence of any response with 2-phenylethanol, styrene oxide, or phenylacetaldehyde indicates the regiospecificity of recognition, which probably requires the correct placement of the oxo group. Moreover, the lack of induction by toluene or styrene compared to a weak inducing effect by ethylbenzene points to the importance of proper size and orientation of the side chain of an inducing compound.

Remarkably, some of the weakly inducing compounds (propiophenone or the fluoroacetophenone isomers) do not serve as growth substrates for *A. aromaticum*, whereas the (almost) non-inducing 4'-hydroxyacetophenone is degraded by a completely different and specifically induced pathway (Wöhlbrand et al., 2008; Rabus et al., 2014; Muhr et al., 2015). It seems that an efficient regulatory machinery

has evolved in *A. aromaticum* to specifically discriminate between inducing the enzymes of acetophenone and 4'-hydroxyacetophenone degradation. Therefore, the reporter strain can principally be used as a rather specific bioreporter system for the presence of acetophenone (plus some closely related chemical analogs) in a concentration range of 50–250  $\mu$ M. Because acetophenone as well as the 1-phenylethanol isomers are common intermediates of aerobic and anaerobic pathways of ethylbenzene degradation (Filipovic et al., 1992; Bernhardt, 2006; Carmona et al., 2009; Fuchs et al., 2011; Rabus et al., 2014), a specific detection system for these compounds may be useful for applications in environmental monitoring or even in prospecting for new petroleum reservoirs, based on indirectly screening for hydrocarbons via their degradation products. Alternative detection systems for acetophenone include GC/MS methods which reach detection limits of around 80 nM (EPA method index: EPA-OSW 8270D). However, we think that a fluorescence-based method which discriminates the target substrates in complex mixtures of other compounds may be preferable for a fast field survey of environmental samples. Typical acetophenone concentrations in pristine environments are far below the detection limit of the bioreporter system (<10 nM), but they are expected to rise above the detection limit in oil-contaminated sites, judging from ethylbenzene contents of crude oil of up to 40 mM (Kolpin et al., 2002).

It seems to be a general property of anaerobic aromatics-degrading bacteria that they use more substrate-specific catabolic pathways than their aerobic counterparts (Bernhardt, 2006; Fuchs et al., 2011), which may go along with higher substrate specificities of the corresponding regulatory systems. These regulatory systems of anaerobic aromatics degraders (compared to mostly unspecific systems in aerobic bacteria) may provide a basis for the development of many more bioreporter systems. The suicide-vector based system for constructing specific sensor strains for aromatic compounds presented in this study can easily be adapted more broadly to other specifically regulated catabolic genes of *A. aromaticum* or other bacteria for detecting and quantifying these compounds.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

EM carried out the practical work, OL took and analyzed the fluorescence microscopy images, SGS performed the flow cytometry analysis, MT provided advice on fluorescence microscopy experiments and proofread the manuscript. EM and JH designed the experiments, analyzed the results, and wrote the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ralf Rabus for providing *A. aromaticum* strain EbN1-SR7, Victor Sourjik for helpful discussions, and Andrea Schmidt for technical assistance. This

work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (via SFB 987), the Max Planck Society, and the LOEWE program of the state of Hessen (LOEWE Centre for Synthetic Microbiology, SYNMIKRO, Marburg).

## REFERENCES

- Ball, H. A., Johnson, H. A., Reinhard, M., and Spormann, A. M. (1996). Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain Eb1. *J. Bacteriol.* 178, 5755–5761.
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 128–145. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.026
- Boll, M., Fuchs, G., and Heider, J. (2002). Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 604–611. doi: 10.1016/S1367-5931(02)00375-7
- Bradford, M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Carmona, M., Zamarró, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., et al. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 71–133. doi: 10.1128/MMBR.00021-08
- Champion, K. M., Zengler, K., and Rabus, R. (1999). Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 157–164.
- Clugston, M., and Flemming, R. (2000). *Advanced Chemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Cripps, R. E. (1975). The microbial metabolism of acetophenone. Metabolism of acetophenone and some chloroacetophenones by an *Arthrobacter* species. *Biochem. J.* 152, 233–241. doi: 10.1042/bj1520233
- Dehio, C., and Meyer, M. (1997). Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 538–540.
- Fedorov, A. Y., Volchenko, E., Krest'yaninov, V. Y., and Korzhenevich, V. (1993). Biodegradation of acetophenone by soil bacteria. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 29, 218–222.
- Filipovic, D., Paulsen, M. D., Loida, P. J., Slihar, S. G., and Ornstein, R. L. (1992). Ethylbenzene hydroxylation by cytochrome P450cam. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 488–495. doi: 10.1016/0006-291X(92)91584-D
- Fuchs, G., Boll, M., and Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 803–816. doi: 10.1038/nrmicro2652
- Hagan, E. C., Hansen, W. H., Fitzhugh, O. G., Jenner, P. M., Jones, W. I., Taylor, J. M., et al. (1967). Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet. Toxicol.* 5, 141–157. doi: 10.1016/S0015-6264(67)82961-4
- Hage, A., Schoemaker, H. E., Wever, R., Zennaro, E., and Heipieper, H. J. (2001). Determination of the toxicity of several aromatic carbonyl compounds and their reduced derivatives on *Phanerochaete chrysosporium* using a *Pseudomonas putida* test system. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 69–73. doi: 10.1002/1097-0290(20010405)73:1<69::AID-BIT1037>3.0.CO;2-W
- Havel, J., and Reineke, W. (1993). Microbial degradation of chlorinated acetophenones. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2706–2712.
- Heider, J., and Fuchs, G. (1997a). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* 243, 577–596. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00577.x
- Heider, J., and Fuchs, G. (1997b). Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe* 3, 1–22. doi: 10.1006/anae.1997.0073
- Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R., and Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 459–473. doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00381.x
- Höfken, H. W., Duong, M., Friedrich, T., Breuer, M., Hauer, B., Reinhardt, R., et al. (2006). Crystal structure and enzyme kinetics of the (S)-specific 1-phenylethanol dehydrogenase of the denitrifying bacterium strain EbN1. *Biochemistry* 45, 82–93. doi: 10.1021/bi051596b
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P
- Jobst, B., Schühle, K., Linne, U., and Heider, J. (2010). ATP-dependent carboxylation of acetophenone by a novel type of carboxylase. *J. Bacteriol.* 192, 1387–1394. doi: 10.1128/JB.01423-09
- Johnson, H. A., Pelletier, D. A., and Spormann, A. M. (2001). Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J. Bacteriol.* 183, 4536–4542. doi: 10.1128/JB.183.15.4536-4542.2001
- Jones, K. H., Trudgill, P. W., and Hopper, D. J. (1994). 4-Ethylphenol metabolism by *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1978–1983.
- Jung, A., Eisheuer, S., Cserti, E., Leicht, O., Strobel, W., Möll, A., et al. (2014). Molecular toolbox for genetic manipulation of the stalked budding bacterium *Hyphomonas neptunium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 736–744. doi: 10.1128/AEM.03104-14
- Kamerbeek, N. M., Olsthoorn, A. J. J., Fraaije, M. W., and Janssen, D. B. (2003). Substrate specificity and enantioselectivity of 4-hydroxyacetophenone monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 419–426. doi: 10.1128/AEM.69.1.419-426.2003
- Kniemeyer, O., and Heider, J. (2001a). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 21381–21386. doi: 10.1074/jbc.M101679200
- Kniemeyer, O., and Heider, J. (2001b). (S)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch. Microbiol.* 176, 129–135. doi: 10.1007/s002030100303
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., et al. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. doi: 10.1021/es011055j
- Kühner, S., Wöhlbrand, L., Fritz, I., Wruck, W., Hultschig, C., Hufnagel, P., et al. (2005). Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *J. Bacteriol.* 187, 1493–1503. doi: 10.1128/JB.187.4.1493-1503.2005
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., et al. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* 4, 555–557. doi: 10.1038/nmeth1062
- Muhr, E., Schühle, K., Clermont, L., Sünwoldt, K., Kleinsorge, D., Seyhan, D., et al. (2015). Enzymes of anaerobic ethylbenzene and p-ethylphenol catabolism in '*Aromatoleum aromaticum*': differentiation and differential induction. *Arch. Microbiol.* 197, 1051–1062. doi: 10.1007/s00203-015-1142-z
- Olajos, E. J., and Salem, H. (2001). Riot control agents: pharmacology, toxicology, biochemistry and chemistry. *J. Appl. Toxicol.* 21, 355–391. doi: 10.1002/jat.767
- Piatkevich, K. D., and Verkhusha, V. V. (2011). Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 102, 431–461. doi: 10.1016/b978-0-12-374912-3.00017-1
- Rabus, R., and Heider, J. (1998). Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 170, 377–384. doi: 10.1007/s002030050656
- Rabus, R., Kube, M., Beck, A., Widdel, F., and Reinhardt, R. (2002). Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* 178, 506–516. doi: 10.1007/s00203-002-0487-2
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., et al. (2005). The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* 183, 27–36. doi: 10.1007/s00203-004-0742-9
- Rabus, R., Trautwein, K., and Wöhlbrand, L. (2014). Towards habitat-oriented systems biology of '*Aromatoleum aromaticum*' EbN1: chemical sensing, catabolic network modulation and growth control in anaerobic aromatic

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

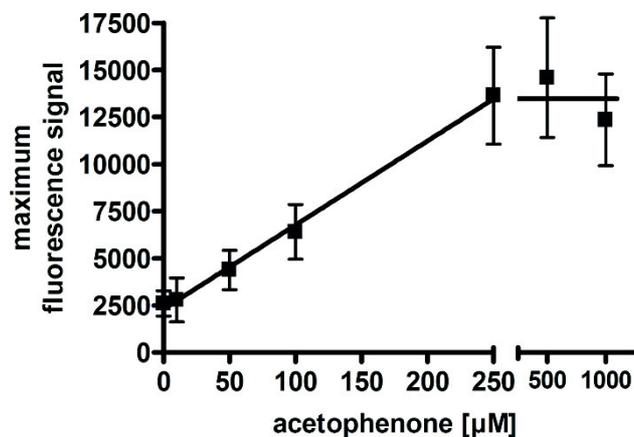
The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01561>

- compound degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3371–3388. doi: 10.1007/s00253-013-5466-9
- Rabus, R., and Widdel, F. (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163, 96–103. doi: 10.1007/BF00381782
- Robinson, J. W. (1991). *Practical Handbook of Spectroscopy*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572. doi: 10.1038/nbt1037
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2, 905–909. doi: 10.1038/nmeth819
- Taylor, R. G., Walker, D. C., and McInnes, R. R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 21, 1677–1678. doi: 10.1093/nar/21.7.1677
- Telford, W. G., Hawley, T., Subach, F., Verkhusha, V., and Hawley, R. G. (2012). Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods* 57, 318–330. doi: 10.1016/j.jymeth.2012.01.003
- Thanbichler, M., Iniesta, A. A., and Shapiro, L. (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.* 35, e137. doi: 10.1093/nar/gkm818
- US EPA (1999). *Integrated Risk Information System (IRIS) on Acetophenone*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- Wöhlbrand, L., and Rabus, R. (2009). Development of a genetic system for the denitrifying bacterium '*Aromatoleum aromaticum*' strain EbN1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 17, 41–52. doi: 10.1159/000159194
- Wöhlbrand, L., Wilkes, H., Halder, T., and Rabus, R. (2008). Anaerobic degradation of p-ethylphenol by '*Aromatoleum aromaticum*' strain EbN1: pathway, regulation, and involved proteins. *J. Bacteriol.* 190, 5699–5709. doi: 10.1128/JB.00409-08
- Yang, Z.-H., Zeng, R., Chang, X., Li, X.-K., and Wang, G.-H. (2008). Toxicity of aromatic ketone to yeast cell and improvement of the asymmetric reduction of aromatic ketone catalyzed by yeast cell with the introduction of resin adsorption. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 322–327.

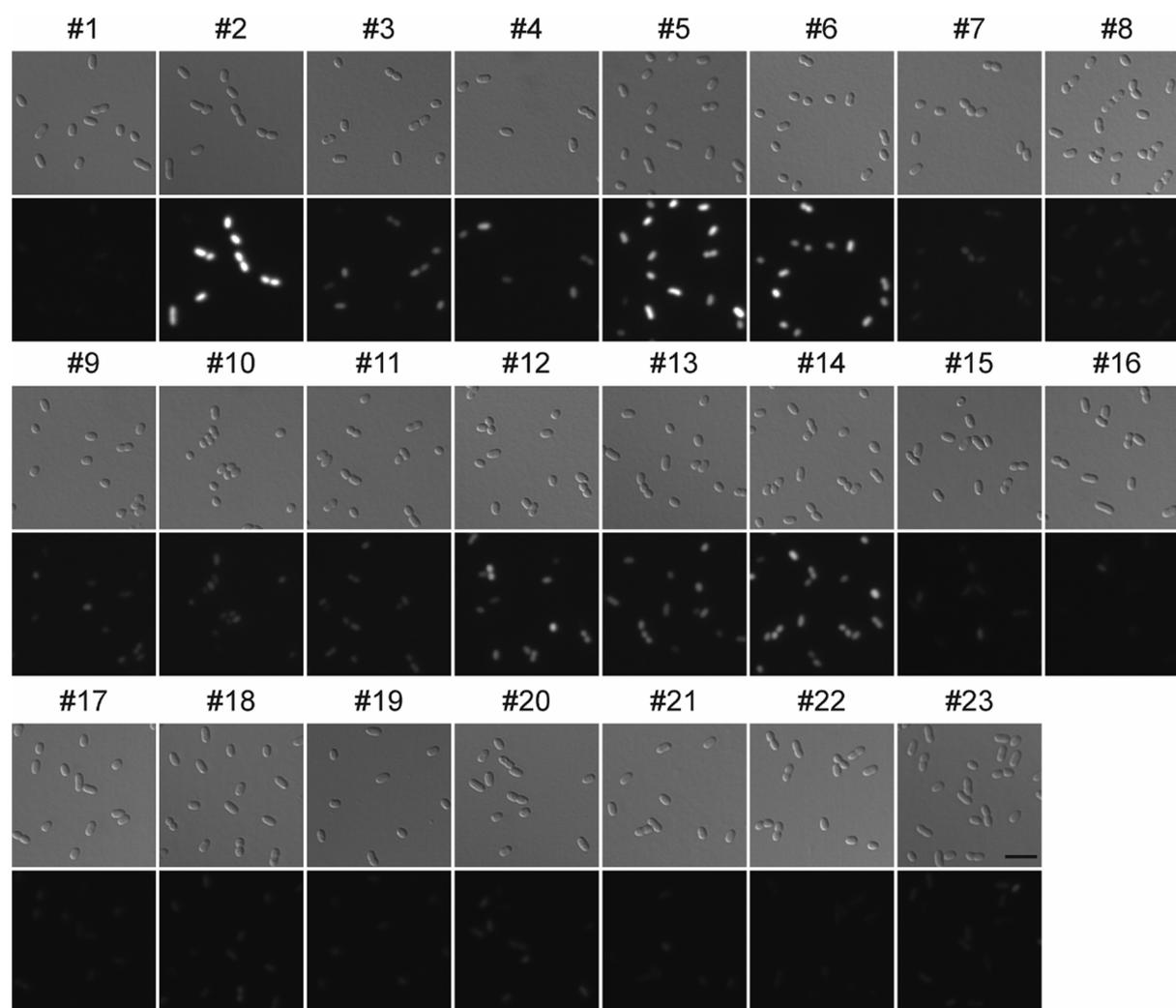
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Mühr, Leicht, González Sierra, Thanbichler and Heider. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

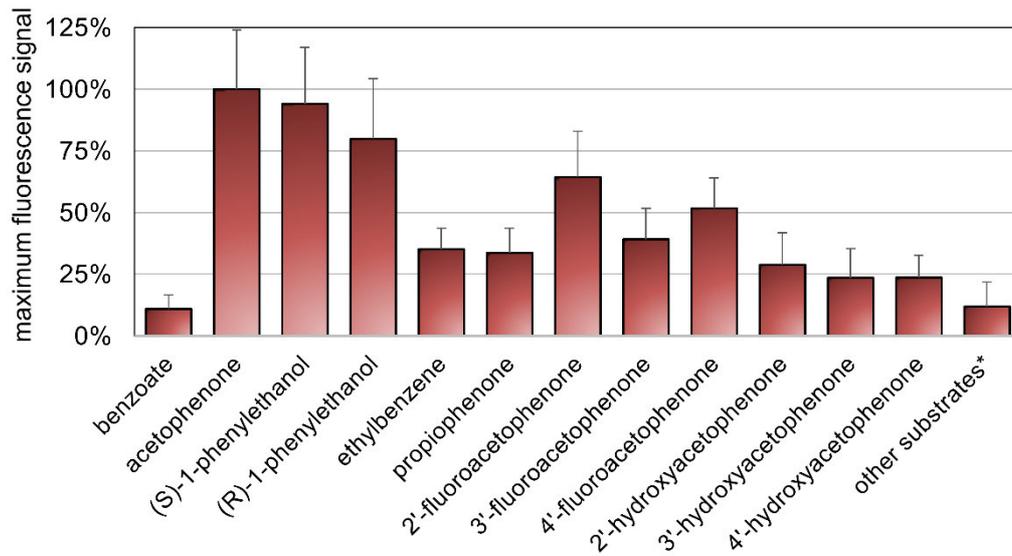
### 2.3. Supplementary material



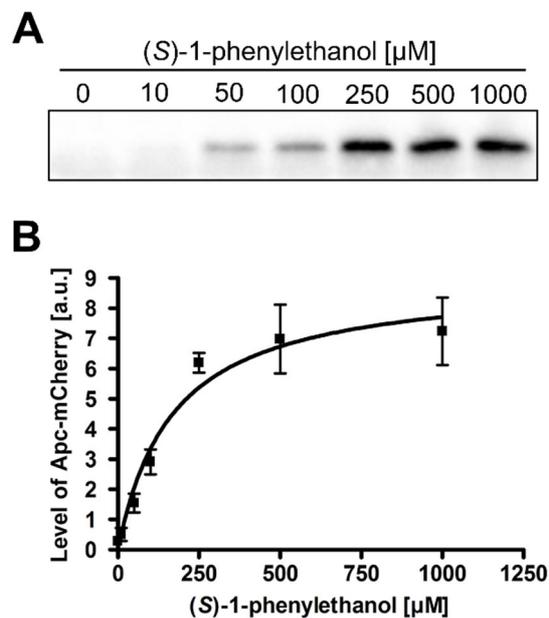
**Figure S1 Quantitation of maximum fluorescence signals for acetophenone-dependent fluorescence output from fluorescence microscopy images.** For images see Fig. 4A. The values given are the average of the values obtained from at least 50 parallel measurements. Error bars indicate the standard deviations. Data were fitted by linear regression between 0 and 250  $\mu\text{M}$  acetophenone, yielding  $R^2$  values of 0.997, a slope of  $44.63 \mu\text{M}^{-1}$ , and a background value of 2303 units.



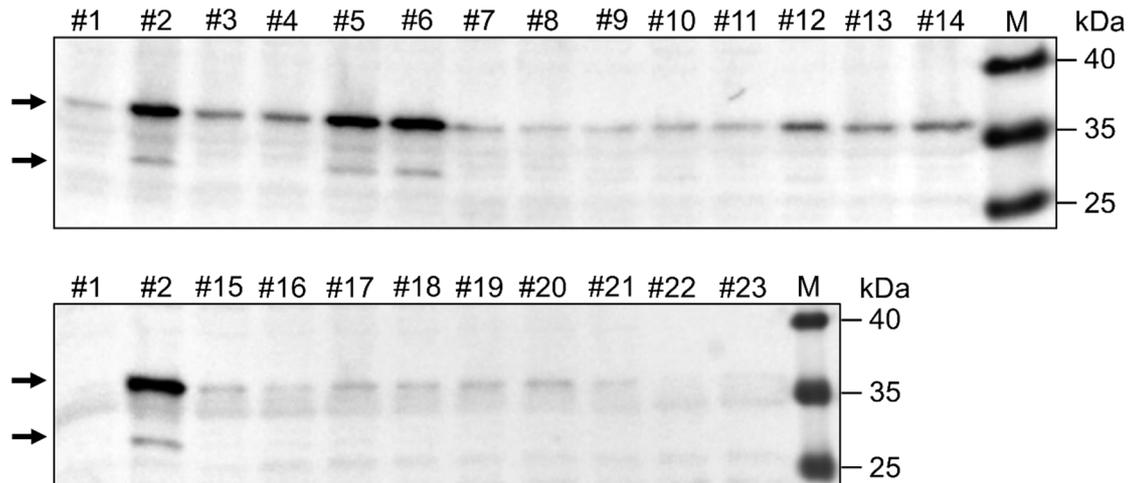
**Figure S2 Specificity of sensing acetophenone analogues.** DIC and fluorescence microscopy images (RFP, 500 ms) from cultures of strain APC-CHY after 16 h of exposure to different substrates at final concentrations of 0.5 mM (see Fig. 6): #1 benzoate, #2 acetophenone, #3 ethylbenzene, #4 propiophenone, #5 (*S*)-1-phenylethanol, #6 (*R*)-1-phenylethanol, #7 2-phenylethanol, #8 phenylacetaldehyde, #9 2'-hydroxyacetophenone, #10 3'-hydroxyacetophenone, #11 4'-hydroxyacetophenone, #12 2'-fluoroacetophenone, #13 3'-fluoroacetophenone, #14 4'-fluoroacetophenone, #15 2'-chloroacetophenone, #16 2'-methylacetophenone, #17 4'-methylacetophenone, #18 styrene oxide, #19 styrene, #20 toluene, #21 4-cresol, #22 phenol, #23 4'-ethylphenol. All fluorescence microscopy images were scaled equally (250/10,000) and shown in monochrome for comparison of differences in brightness. Scale bar, 5  $\mu$ m. Each picture shows a representative detail view of the full size images.



**Figure S3 Quantitation of maximum fluorescence signals with acetophenone analogues from fluorescence microscopy images.** For images see Fig. S3. The values given are the average of the data obtained for at least 30 parallel measurements. Error bars indicate the standard deviations in relative units (%).



**Figure S4 Concentration-dependency of reporter protein content to (S)-1-phenylethanol.** (A) Cultures of strain APC-CHY were tested for their content of ApcA-mCherry fusion protein by immunoblot analysis after 12 h exposure to different concentrations of (S)-1-phenylethanol. (B) Quantification of ApcA-mCherry signal intensities from the immunoblot analysis. The values given are the average of at least three parallel measurements including standard deviations in arbitrary units (a.u.). Data were fitted by the saturation kinetics equation given in this study, with an  $R^2$  value of 0.974. Curve parameters: max = 9.041 a.u.,  $K = 168.9 \mu\text{M}$ , background value = 0.186 a.u.. It should be noted that the units are not directly comparable to Fig. 5 because the experiments were performed independently.



**Figure S5 Immunoblot analysis of sensing specificity.** Cultures of strain APC-CHY were analyzed for their content of ApcA-mCherry fusion protein by immunoblot analysis of cell free extracts (50  $\mu$ g) using anti-mCherry antiserum after 16 h of exposure to different substrates at final concentrations of 0.5 mM (see Fig. 6): #1 benzoate, #2 acetophenone, #3 ethylbenzene, #4 propiophenone, #5 (*S*)-1-phenylethanol, #6 (*R*)-1-phenylethanol, #7 2-phenylethanol, #8 phenylacetaldehyde, #9 2'-hydroxyacetophenone, #10 3'-hydroxyacetophenone, #11 4'-hydroxyacetophenone, #12 2'-fluoroacetophenone, #13 3'-fluoroacetophenone, #14 4'-fluoroacetophenone, #15 2'-chloroacetophenone, #16 2'-methylacetophenone, #17 4'-methylacetophenone, #18 styrene oxide, #19 styrene, #20 toluene, #21 4-cresol, #22 phenol, #23 4'-ethylphenol. Molecular masses of the protein standard (M) are given along the right margin. Arrows indicate the positions of the ApcA-mCherry fusion product (30.1 kDa) and a degradation product corresponding in size to free mCherry (~27 kDa). It should be noted that the immunoblot analysis are not directly comparable because the experiments were performed independently.

### 3. Deletion of regulatory genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene and acetophenone in *Aromatoleum aromaticum*

#### 3.1. Zusammenfassung

*Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 wurde bereits auf physiologischer, proteogenomischer und biochemischer Ebene untersucht und stellt daher einen Modellorganismus für mehrere verwandte  $\beta$ -Proteobakterien dar, welche die ungewöhnliche Fähigkeit des anaeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen sowie phenolischen Verbindungen besitzen. Im Rahmen dieser Studie wurde das *adiRS* Operon analysiert, das für ein Zweikomponentensystem (TCS) kodiert, welches wahrscheinlich die Acetophenon-abhängige Induktion des *apc-bal* Operons in *A. aromaticum* reguliert. Hierfür wurde durch homologe Rekombination eine Chloramphenicol-resistente Mutante konstruiert, bei der die *adiRS* Gene deletiert wurden. Im Gegensatz zu den Erwartungen wuchs die *adiRS* Deletionsmutante sowohl aerob auf Acetophenon als auch anaerob auf Ethylbenzol oder Acetophenon. Allerdings wurden um 70% reduzierte Acetophenon-Carboxylase-Aktivitäten in Extrakten dieser Kulturen nachgewiesen. Überraschenderweise zeigte die Mutante zudem eine induzierte EbDH-Aktivität in Acetophenon-gezogenen Kulturen sowie eine erhöhte Synthese von zwei Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteinen in Ethylbenzol-gezogenen Kulturen. Die Komplementation der *adiRS* Gene *in trans* führte nur zu einer teilweisen Umkehr der beobachteten Abweichungen. Weiterhin wurde ein mCherry Reporterstamm konstruiert, bei dem die *adiRS* Gene deletiert wurden. Die hieraus ermittelten Ergebnisse gaben Indizien für eine zeitverzögerte und verminderte Expression der *apcA-mCherry* Fusion im Falle einer Deletion des *adiRS* Operons. Zusammenfassend führten die erhaltenen Daten zu der Annahme, dass die Acetophenon-abhängige Induktion des *apc-bal* Operons neben dem *AdiRS*-System möglicherweise durch ein zweites parallel wirkendes TCS beeinflusst wird. Ein möglicher Kandidat sind die *xdiRS* Genprodukte, welche jeweils hohe Ähnlichkeit zu *AdiRS* aufweisen. Abschließend wird ein vorläufiges Modell zur potentiellen Rolle der beiden TCS *AdiRS* und *XdiRS* in der Substraterkennung und -unterscheidung in *A. aromaticum* Stamm EbN1 vorgestellt.

Dieses Kapitel wird zur zukünftigen Publikation in Manuskriptform in englischer Sprache präsentiert, bedarf jedoch weiterer Experimente um finale Schlussfolgerungen zu ermöglichen.

#### 3.2. Manuskript

## Deletion of regulatory genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene and acetophenone in *Aromatoleum aromaticum*

Enrico Muhr<sup>1</sup>, Oliver Leicht<sup>2</sup>, Karola Schühle<sup>1</sup>, Jörg Kahnt<sup>3</sup>, Silvia González Sierra<sup>3,4</sup>, Lina Clermont<sup>1</sup>, Martin Thanbichler<sup>2,3,4</sup>, Johann Heider<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Microbial Biochemistry, Department of Microbiology, Philipps-University, Marburg, Germany, <sup>2</sup> Laboratory of Cellular Microbiology, Department of Microbiology, Philipps University, Marburg, Germany, <sup>3</sup> Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, Germany, <sup>4</sup> LOEWE Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO), Marburg, Germany

**Running Title:** regulation of anaerobic acetophenone metabolism

**Keywords:** *Aromatoleum aromaticum*, two-component regulatory system, ethylbenzene metabolism, acetophenone metabolism, gene knock-out, fluorescence microscopy, mCherry.

### Abstract

*Aromatoleum aromaticum* strain EbN1 has already been studied on a physiological, proteogenomic and biochemical level and therefore represents a model organism for several related  $\beta$ -proteobacterial genera, having the unusual metabolic capability of anaerobic degradation of hydrocarbons and phenolic compounds. In this study, we investigated the *adiRS* operon encoding a putative two-component regulatory system (TCS), proposed to regulate the acetophenone-dependent induction of the *apc-bal* operon in *A. aromaticum* by characterizing its effects in a deletion mutant. In contrast to our expectations, this gene deletion strain still grew aerobically on acetophenone and anaerobically on ethylbenzene or acetophenone. In addition, acetophenone carboxylase (Apc) was still detectable in extracts of the *adiRS* deletion mutant grown on acetophenone or ethylbenzene. However, reduced specific Apc activities of around 30% were determined compared to the wild type strain. Surprisingly, the mutant strain showed induced ethylbenzene dehydrogenase (EbdH) activity if grown on acetophenone as well as increased synthesis of two paralogous biotin-containing carrier proteins (XccB and XccB2) when grown on ethylbenzene. Restoring the *adiRS* genes on a broad host-range plasmid only resulted in a partial reversal of these deviations. Furthermore, a fluorescent reporter strain lacking the *adiRS* genes was constructed as described recently (Muhr *et al.*, 2016). The results indicated a probable time-delayed and decreased expression of the *apcA-mCherry* gene fusion

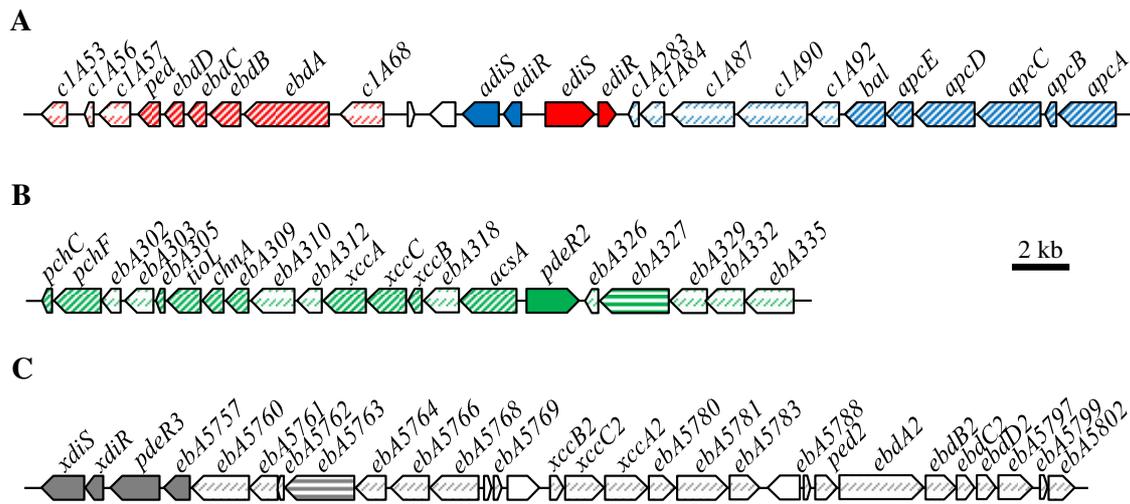
in the reporter strain lacking the genes encoding AdiRS. Taken together, we assume that acetophenone-dependent induction of the *apc-bal* operon may be mediated by two independent regulatory systems which would be expected to complement each other in this deletion mutant. In this regard, two genes coding for a TCS (*xdiRS*) closely related to the putative acetophenone-dependent AdiRS are prime candidates. Finally, this study presents a tentative model of the potential role of the AdiRS and XdiRS regulatory systems in substrate recognition and discrimination in *A. aromaticum* strain EbN1.

## Introduction

Along with many other aromatic hydrocarbons and phenolic compounds, the  $\beta$ -proteobacterium *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1 is able to degrade ethylbenzene in the absence of oxygen (Rabus and Widdel, 1995; Rabus and Heider, 1998). The first step of the degradation pathway is an oxygen-independent enantiospecific hydroxylation of the hydrocarbon substrate to (*S*)-1-phenylethanol (Ball *et al.*, 1996; Rabus and Heider, 1998; Johnson and Spormann, 1999) via ethylbenzene dehydrogenase (EbDH), an oxygen-labile molybdenum enzyme (Johnson *et al.*, 2001; Kniemeyer and Heider, 2001a; Kloe *et al.*, 2006; Heider *et al.*, 2016b). The intermediate (*S*)-1-phenylethanol is further oxidized to acetophenone by an enantiospecific alcohol dehydrogenase (Champion *et al.*, 1999; Kniemeyer and Heider, 2001b; Höffken *et al.*, 2006; Dudzik *et al.*, 2014), which is encoded in a common operon with the subunits of EbDH (Fig. 1A) (Rabus *et al.*, 2002).

The aromatic ketone acetophenone (phenylmethylketone) is produced as metabolic intermediate in the oxygen-sensitive degradation pathway of ethylbenzene (Rabus and Widdel, 1995; Rabus and Heider, 1998). The subsequent degradation pathway of acetophenone has been shown to be initiated by a novel type of a highly complex ATP-dependent carboxylase (Jobst *et al.*, 2010; Heider *et al.*, 2016a). The acetophenone carboxylase involved in this pathway consists of five subunits (ApcABCDE) with tightly bound zinc atoms, which are believed to be essential for its carboxylase activity. The purified and reconstituted enzyme complex exhibits a stoichiometry of two ATP hydrolyzed to ADP per acetophenone carboxylated to benzoylacetate. Similar to anaerobic degradation of acetophenone, *A. aromaticum* is also able to degrade the ketone as sole substrate under aerobic conditions, but not ethylbenzene (Rabus and Widdel, 1995). The next degradation steps comprise an activation to the CoA-thioester by a CoA-ligase (Rabus and Heider, 1998; Rabus *et al.*, 2002; Muhr *et al.*, 2015) and a further conversion to acetyl-CoA and benzoyl-CoA, the common intermediate of most anaerobic

metabolism of aromatic compounds, by a so far unknown thiolase (Harwood *et al.*, 1998; Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011). The gene coding for the benzoylacetate CoA-ligase (*bal*) is located in an operon together with the five genes encoding the acetophenone carboxylase (Rabus *et al.*, 2002). This *apc-bal* operon forms together with the *ebd-ped* operon a larger gene cluster with genes coding for two two-component systems (Fig. 1A).



**Figure 1** Scheme of the three gene clusters potentially involved in a common regulatory network effecting the metabolism of ethylbenzene, acetophenone, *p*-ethylphenol and phenol in *A. aromaticum*. Modified from Rabus *et al.*, 2002, Wöhlbrand *et al.*, 2008 and Muhr *et al.*, 2015. Gene cluster coding for enzymes of ethylbenzene and acetophenone metabolism (A), for enzymes of *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone metabolism (B) and for paralogous enzymes of anaerobic ethylbenzene, *p*-ethylphenol and phenol metabolism (C). Predicted functions of gene products are indicated by different colors and hatching patterns: *red*: ethylbenzene degradation, *blue*: ethylbenzene and acetophenone degradation, *green*: *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone degradation, *grey*: paralogous enzymes, *white*: transposase/transposase fragment, *filled*: transcriptional regulation, *horizontal stripes*: transporter protein involved in stress response, *diagonal stripes*: identified or predicted function in previous publications, and *broken lines*: protein of unknown function.

The enzymes of ethylbenzene and acetophenone metabolism are known to be regulated in a sequential manner in response to the availability of the substrates ethylbenzene and acetophenone, respectively (Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2014; Muhr *et al.*, 2015). Since the *ebd-apc* gene cluster contains two operons coding for related two-component regulatory systems (TCS), their gene products were proposed to be involved in mediating the substrate-dependent induction of either the *ebd-ped* or the *apc-bal* operons (Fig. 1A) (Rabus *et al.*, 2002; Kühner *et al.*, 2005). EdiS and EdiR (ethylbenzene degradation inducing sensor/regulator) were suggested to be responsible for inducing the *ebd-ped* operon because of their particularly high sequence similarity to the *tdiSR* gene products, which are involved in regulation of the genes of

anaerobic toluene metabolism (Leuthner and Heider, 1998; Rabus *et al.*, 2002). Based on the similarity to the *p*-hydroxyacetophenone-responsive TCS VirAG from *Agrobacterium tumefaciens* (Lee *et al.*, 1995), AdiR and AdiS (acetophenone degradation inducing regulator/sensor) have been proposed as probable regulatory compounds for the induction of the *apc-bal* operon (Rabus *et al.*, 2002).

In addition to the metabolic pathways of ethylbenzene and acetophenone, we also elucidate the anaerobic degradation pathway of *p*-ethylphenol and its ketone derivative *p*-hydroxyacetophenone in our study. These two compounds are very close chemical analogs of ethylbenzene and acetophenone, but are degraded via a different *p*-ethylphenol-induced pathway (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Rabus *et al.*, 2014; Muhr *et al.*, 2015). The metabolic enzymes probable involved in this pathway are encoded on an apparent single  $\sigma^{54}$ -dependent *etp* operon (Fig. 1B) preceded by a gene coding for a XylR-type regulatory protein (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Büsing *et al.*, 2015). The *etp* operon includes a flavin-containing *p*-ethylphenol hydroxylase instead of a molybdoenzyme-type hydroxylase, several alcohol dehydrogenases and a biotin-containing carboxylase in addition to enzymes involved in CoA-thioester formation and beta oxidation reactions (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Rabus *et al.*, 2014).

Furthermore, *A. aromaticum* possesses a third gene cluster (Fig. 1C), which consists of genes coding for paralogues of enzymes involved in the metabolism of ethylbenzene, *p*-ethylphenol and phenol as well as paralogues of solvent stress proteins (Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2005; Wöhlbrand and Rabus, 2009; Rabus *et al.*, 2014). E. g. the *ebd*- and *ped*-like genes show a sequence similarity in the range from 47.2 to 83.5% (Rabus *et al.*, 2005). Additionally, this cluster harbors a gene coding for a  $\sigma^{54}$ -dependent regulator (*ebA5755*, renamed in this study as *pdeR3*) closely related to the XylR-type regulatory protein in the *etp* operon (*pdeR2*, 44% identity). Remarkably, it also contains two genes coding for a so far unknown TCS (*ebA5752/ebA5750*, renamed in this study as *xdiRS*) related to the putative acetophenone dependent AdiRS, with identities of 61% and 48%, respectively (Rabus *et al.*, 2005).

Previous investigations on the regulation of ethylbenzene and acetophenone degradation were always lacking genetic studies. To address this issue, this work is based on recorded effects of the deletion of the *adiRS* genes in *A. aromaticum*, constructed by using a modified genetic system described previously (Wöhlbrand and Rabus, 2009). The desired deletion mutant was investigated for the specific activity of key enzymes of ethylbenzene and acetophenone degradation in cells grown on different carbon and energy sources combined with immuno- and biotin-blotting analyses. Furthermore, a fluorescent reporter construct was integrated into the

chromosome of the deletion mutant as described recently for strain EbN1-SR7 (Muhr *et al.*, 2016) to examine the induction pattern of the *apc-bal* operon *in vivo* as well as the influence of the predicted TCS AdiRS.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. The streptomycin-resistant *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1-SR7 was grown under denitrifying conditions at 28°C in mineral salt medium on benzoate, acetophenone, ethylbenzene, *p*-ethylphenol, *p*-hydroxyacetophenone or toluene (at 1 to 5 mM) as described elsewhere (Rabus and Widdel, 1995; Muhr *et al.*, 2015). Every culture was adapted to anaerobic growth on the respective substrate for at least four passages. Bacterial growth was followed by measuring optical density at 578 nm and the consumption of nitrate. For time- and concentration dependent analysis, the reporter strains were cultivated under aerobic conditions as described previously (Muhr *et al.*, 2016), except using mineral salt media containing 4 mM instead of 1.5 mM benzoate. For the generation of deletion mutants or conjugational plasmid transfer, EbN1-SR7 was grown in a modified mineral salt medium described previously (Wöhlbrand and Rabus, 2009).

**Table 1** Strains used in this study.

Strain	Genotype; characteristics and uses	Reference/source
<i>A. aromaticum</i>		
EbN1-SR7	Sm <sup>R</sup> mutant of EbN1 wild type (Rabus and Widdel, 1995)	(Wöhlbrand and Rabus, 2009)
$\Delta$ <i>adiRS</i>	EbN1-SR7 deletion mutant $\Delta$ <i>adiRS</i> ::cat $\Delta$ <i>tnp22</i> , $\Delta$ <i>tnpF7</i> , Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ <i>adiRS</i> com SR7-CHY	$\Delta$ <i>adiRS</i> , pAwt1m(-) <i>adiRS</i> , Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , EbN1-SR7, chromosomal integration of pK19 <i>apcA</i> -CHY, Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	This study Renamed from APC-CHY (Muhr <i>et al.</i> , 2016)
$\Delta$ <i>adiRS</i> -CHY	$\Delta$ <i>adiRS</i> , chromosomal integration of pK19 <i>apcA</i> -CHY, Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	Host for <i>E. coli</i> cloning; F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Taylor <i>et al.</i> , 1993)
WM3064	Donor strain for conjugation; <i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> $\Delta$ M15 RP4-1360 $\Delta$ ( <i>araBAD</i> )567 $\Delta$ <i>dapA1341</i> ::[ <i>erm pir</i> (wt)]	W. Metcalf, unpublished

*Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB media (Sambrook and Russell, 2001). The growth medium was solidified with 1.5% (w/v) agar if required. Antibiotics were added at the following final concentrations: ampicillin 50-150 µg ml<sup>-1</sup>, carbenicillin 50 µg ml<sup>-1</sup>, chloramphenicol 10-30 µg ml<sup>-1</sup>, kanamycin 30-50 µg ml<sup>-1</sup> and streptomycin 30-50 µg ml<sup>-1</sup>. The diaminopimelate (DAP) auxotrophic *E. coli* strain WM3064 was grown on medium containing 0.3 mM DAP.

### **DNA Techniques and plasmid transfer**

*E. coli* strain DH5α was used for all cloning purposes. All enzymes and kits for isolation of genomic or plasmid DNA as well as for purification and gel extraction of PCR products or restriction fragments were purchased from Thermo Scientific™ (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany), Analytik Jena (Jena, Germany) or New England Biolabs (Frankfurt, Germany). Oligonucleotide primers (biomers.net GmbH, Ulm, Germany) used in this study are listed in Table S1. Sequence analyzes were evaluated using pDRAW32 (ACACLONE software) and DNAMAN (Lynnon Biosoft) software.

Plasmids were transferred into *E. coli* strains by transformation using chemically competent cells (Inoue *et al.*, 1990) and into *A. aromaticum* by conjugation using the DAP auxotrophic *E. coli* strain WM3064 (Wöhlbrand and Rabus, 2009; Muhr *et al.*, 2016). Solid mating medium was supplemented with 0.3 mM DAP (see above).

### **Construction of *adiRS* deletion mutant**

To generate a gene deletion mutant of the *adiRS* operon in *A. aromaticum*, we used a modified two-step protocol based on suicide-vector pK19mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) as previously described in Wöhlbrand and Rabus (2009; see Fig. S1A for schematic depiction). The *adiRS* operon and two predicted adjacent genes coding for a transposase (*tnp22*) and a transposase fragment (*tnpF7*) were replaced by a resistance marker cassette encoding a chloramphenicol acetyl transferase (CAT). The *cat* gene (921 bp) and two fragments flanking each side of the desired deletion (1040 bp) were amplified from the plasmid pACYC184 (Chang and Cohen, 1978) or from genomic DNA of *A. aromaticum* strain EbN1-SR7, respectively using the primer pairs listed in Table S1 (Fig. S1A). The three fragments were then fused together via PCR using the primer pair P1/P4 (2881 bp), restricted with *Pst*I and *Xba*I, and ligated into the similarly treated pK19mobsacB containing the *sacB* gene as counter-selection marker. The resulting plasmid pK19Δ*adiRS* was conjugated into EbN1-SR7 as described above. As mentioned the desired deletion mutant was obtained in two steps. At first, transconjugants were screened for chromosomal insertion of the introduced plasmid via kanamycin (and chloramphenicol)

resistance and analyzed by colony PCR using the primer pairs P7/9 (upstream, 1584 bp) and P8/P10 (downstream, 1274 bp) (Table S1, data not shown). Positive single-crossover mutants were grown at least four passages under non-selective conditions and subsequently screened for a second crossover event for deletion of the plasmid portion via resistance against added sucrose and chloramphenicol. The kanamycin-sensitive deletion mutant strain was confirmed by colony PCR analysis using different primer pairs (see Table S1 and Fig. S1) and designated as  $\Delta adiRS$ .

### Construction of complementation plasmid

For complementation of the *adiRS* deletion *in trans* (modified from Wöhlbrand and Rabus, 2009), the corresponding gene pair was amplified from genomic DNA using the primer pair *adiRS\_com\_for3/adiRS\_com\_rev3* (Table S1). The expected PCR product (2211 bp) which contained the complete *adiRS* genes and 248 bp upstream region of *adiRS*, was cloned with the StarGate® cloning system (IBA GmbH, Goettingen, Germany) according to the protocol into the acceptor vector pASG-IBAw1. Since EbN1-SR7 is not able to replicate these expression vectors and only can import mobilizable plasmids via conjugation, the *ColE1 ori* was replaced by a synthesized mob-site fragment (Gene Art, Regensburg, Germany) containing the pBR322 *ori* to get a wider broad host range. The vector pBBR1-MCS4 (Kovach *et al.*, 1995) served as template for synthesis of the fragment, which was synthesized without any disturbing restriction sites. This mob-site fragment was cloned to a DNA fragment, amplified from plasmid pAwt1*adiRS* using the primer pair Sense\_pASG\_Mob(-ColE1)/Antisense\_pASG\_Mob (Table S1), according to the StarGate® cloning system. The modified and confirmed plasmid pAwt1m(-)*adiRS* (7487 bp) was transferred to  $\Delta adiRS$  as described above. The resulting mutant was designated as  $\Delta adiRScom$ .

### Construction of a chromosomal *apcA-mCherry* insertion mutant

To generate a  $\Delta adiRS$  strain harboring a chromosomal integration of an *apcA-mCherry* fusion, we used a method previously described for EbN1-SR7 (Muhr *et al.*, 2016). The proper insertion of the plasmid at the predicted site was verified by colony PCR using different combination of primers (see Table S1 and Fig. S3). For better comparison in this study the insertion mutants were designated as strains SR7-CHY (in Muhr *et al.*, 2016 designated as APC-CHY) and  $\Delta adiRS$ -CHY.

### Preparation of cell free extracts

Harvested cells (20 min at 17,000 × g) were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For extract preparation, frozen cells were resuspended in an equal volume of 10 mM

Tris/HCl buffer pH 7.5 containing 0.05 mg lysozyme and 0.05 mg DNase I per ml. Cell suspensions were disrupted by sonication or passed two times through a French pressure cell press at 110 MPa. Cell debris and membranes were removed by ultracentrifugation at  $125,000 \times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The cell free extracts (soluble fractions) were used immediately or stored in aliquots with added 10% (v/v) glycerol at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Electrophoretic methods and immunoblotting**

Defined amounts of protein (50  $\mu\text{g}$ ) from crude extract from at least two biological replicates per strain and substrate were prepared and separated by discontinuous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% till 16.5% (w/v) polyacrylamide gels in the Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, Munich, Germany) as described previously (Laemmli, 1970). Biotin-blot analyses with HRP-coupled avidin and immunoblot analyses using antisera raised against the purified core enzyme of acetophenone carboxylase or against purified ethylbenzene dehydrogenase were performed as described before (Muhr *et al.*, 2015). Immunodetection with anti-mCherry antiserum and quantitative analyses of the immunocomplexes were performed as described previously (Jung *et al.*, 2014; Muhr *et al.*, 2016). For quantitation of the immunocomplexes, the ApcA-mCherry fusion protein signals were recorded by a ChemiDoc MP imaging system as volume (intensity) of the respective bands using Image Lab 5.0 software (Bio-Rad, Munich, Germany) and are presented in arbitrary units (a.u.), where one unit corresponds to an original volume (intensity) readout value of  $10^6$ .

### **Enzyme assays**

EbDH activity was observed by a photometric assay in 100 mM Tris/HCl buffer pH 7.5 containing 200  $\mu\text{M}$  ferricenium tetrafluoroborate as electron acceptor (Kniemeyer and Heider, 2001a; Muhr *et al.*, 2015). Carboxylase activities were measured via substrate-dependent incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]bicarbonate into nonvolatile acid-stable products as described previously (Jobst *et al.*, 2010; Muhr *et al.*, 2015).

### **Other methods**

Determination of protein concentrations was done by the Coomassie dye binding assay with bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). The identities of proteins separated by SDS-PAGE were determined by LC-MS using a PepMap100 C-18 RP nanocolumn (Dionex, Idstein, Germany) and separated on an UltiMate 3000 liquid chromatography system (Dionex, Idstein, Germany). MALDI-TOF-TOF analysis was carried out on a 4800 Proteomics Analyzer (MDS Sciex, Concord, ON, Canada) and evaluated against an in-house database using Mascot embedded into GPS explorer software (MDS Sciex, Concord, ON, Canada). Fluorescence

microscopy and fluorescence-based flow cytometry were performed exactly as described in Muhr *et al.*, 2016.

## Results

### Knock-out of the *adiRS* operon and complementation

Previous studies which addressed the regulation of anaerobic acetophenone degradation in *A. aromaticum* proposed the *adiRS* gene products as probable two-component regulatory system (TCS) involved in the synthesis of acetophenone metabolic enzymes (Rabus *et al.*, 2002; Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2014). To prove the hypothesis a chloramphenicol resistant deletion mutant lacking the *adiRS* operon was constructed by homologous recombination (see Fig. S1A and Materials and Methods). Additionally, two predicted adjacent genes coding for a transposase (*tnp22*) and a transposase fragment (*tnpF7*) were deleted together with the *adiRS* operon to “clean up” the genome of EbN1-SR7 and to counteract unwanted transposase effects. The resulting deletion mutant was designated as  $\Delta$ *adiRS*.

To control the correct integration of the plasmid pK19 $\Delta$ *adiRS* into the genome of EbN1-SR7 (single crossover) as well as the correct second recombination (double crossover) to get rid of the integrated plasmid again, while replacing the *adiRS* operon with a chloramphenicol resistance cassette (*cat*), colony PCR reactions were run using different combinations of primer pairs listed in Table S1. Resulting PCR products, analyzed on 1% agarose gels, confirmed the *adiRS* deletion mutant (Fig. S1B). To rule out secondary mutation effects of the *adiRS* deletion, the corresponding gene pair was expressed *in trans* (modified from Wöhlbrand and Rabus, 2009). Therefore a broad-host-range plasmid pAwt1m(-)*adiRS* was constructed and transferred into  $\Delta$ *adiRS* resulting strain  $\Delta$ *adiRS*com. PCR reactions were run to confirm the presence of the genes *adiR* and *adiS* (Table S1; Fig. S1C).

### Growth characteristics of $\Delta$ *adiRS* and $\Delta$ *adiRS*com

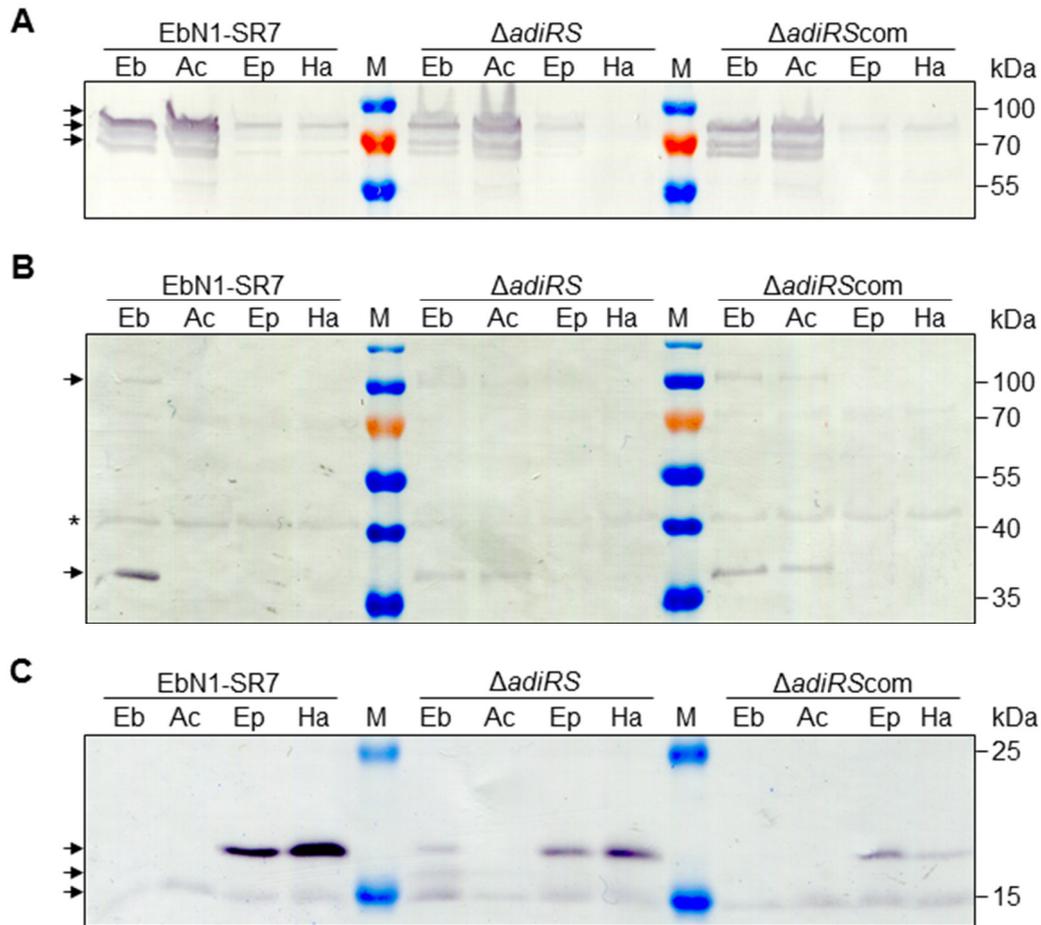
Contrary to our expectations the isolated *adiRS* mutant was still able to grow on acetophenone and ethylbenzene. Cell growth of  $\Delta$ *adiRS*, cultivated under denitrifying conditions on acetophenone, was monitored over 102 h compared to EbN1-SR7 and  $\Delta$ *adiRS*com (see Fig. S2A). To exclude impairments of strain  $\Delta$ *adiRS*, no chloramphenicol was added to the media. Only slightly decreased growth rates of the deletion strain compared to the wild type were reported both on acetophenone and other carbon sources like benzoate or ethylbenzene (data not shown). The deletion mutant was also able to grow on *p*-ethylphenol,

*p*-hydroxyacetophenone and toluene. To verify the absence of *adiRS* genes, colony PCR analyses were done using isolated DNA of  $\Delta$ *adiRS* adapted cultures (48 h) grown on benzoate, acetophenone and ethylbenzene (Fig. S2BC). PCR reactions using primer pair *adiR\_for/adiR\_rev* (Table S1) confirmed the absence of this gene in cells adapted to acetophenone or ethylbenzene (Fig. S2B). To validate these template DNA PCR products of the gene *ediR*, nearby the deleted operon (Fig. 1A), were amplified using primer pair *ediR\_for/ediR\_rev* (Table S1; Fig. S2C).

Slightly reduced growth rates compared to EbN1-SR7 and  $\Delta$ *adiRS* were recorded with strain  $\Delta$ *adiRS*com possessing the complementation plasmid pAwt1m(-)*adiRS* (Fig. S2A) due to the fact of added ampicillin ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) as described previously (Wöhlbrand and Rabus, 2009). A second reason could be explained by expression stress of the *adiRS* genes *in trans* from the multicopy plasmid. This effect was enhanced by the addition of anhydrotetracycline (Fig. S2A) also known from previous experiments with different plasmids (K. Schühle and J. Heider, unpublished results).

### **Presence of enzymes of anaerobic hydrocarbon metabolism in strain $\Delta$ *adiRS***

The TCS *AdiRS* is proposed to be involved in the regulation of the *apc-bal* operon (Rabus *et al.*, 2002) containing the genes encoding the acetophenone carboxylase (*apcABCDE*) and benzoylacetate-CoA ligase (*bal*; Fig. 1A). Along with the growth ability of  $\Delta$ *adiRS* on acetophenone and ethylbenzene under denitrifying conditions, we were also able to detect the presence of Apc in cell free extracts of cells grown on these substrates by immunoblotting experiments with antiserum raised against the purified Apc core enzyme (Fig. 2A). The three large subunits of Apc (87 kDa, 75 kDa and 70 kDa) were induced in cells grown under denitrifying conditions on ethylbenzene or acetophenone. Stronger signals were detectable for the wild type strain EbN1-SR7 compared to the strains  $\Delta$ *adiRS* and  $\Delta$ *adiRS*com. Sometimes faint signals corresponding to the large subunits of Apc were also seen in cells grown on *p*-ethylphenol or *p*-hydroxyacetophenone.



**Figure 2** Immuno- and biotin-blot analysis of cell free extracts of EbN1-SR7,  $\Delta adiRS$  and  $\Delta adiRScom$  grown under denitrifying conditions on different substrates. Extracts (50  $\mu$ g of total protein per lane) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Lanes: Cultures grown under denitrifying conditions on ethylbenzene (*Eb*), acetophenone (*Ac*), *p*-ethylphenol (*Ep*) and *p*-hydroxyacetophenone (*Ha*); molecular mass marker (*M*). Molecular masses of the protein standard are given along the right margin. **(A)** Immunoblot analysis (12% (w/v) SDS-gel) using antiserum raised against purified core complex of acetophenone carboxylase. Arrows indicate three subunits ApcC, ApcD and ApcA (87, 75 and 70 kDa). **(B)** Immunoblot analysis (12% (w/v) SDS-gel) using antiserum raised against purified ethylbenzene dehydrogenase. Arrows indicate two subunits EbdA and EbdB (96 and 43 kDa). The asterisk indicates an unidentified cross-reacting polypeptide. **(C)** Biotin-blot analysis (16.5% (w/v) SDS-gel) with HRP-coupled avidin. The arrows indicate the constitutive expressed biotin carrier protein AccB (EbA1472, 16 kDa) and two additional induced proteins identified as biotin carrier proteins XccB (EbB9, 17.6 kDa) and XccB2 (EbA5773, 16.7 kDa).

Since Apc is known to be active in cells grown under denitrifying conditions on ethylbenzene or acetophenone but not on *p*-ethylphenol (Jobst *et al.*, 2010; Muhr *et al.*, 2015), we additionally measured the enzyme activity to determine the influence of the *adiRS* deletion on the presence of this key enzyme (Table 2). Specific Apc activities of 9.88 and 5.20 nmol [ $^{14}$ C]bicarbonate incorporated into acid-stable products per min and mg of protein were observed in extracts of EbN1-SR7 cells grown under denitrifying conditions on acetophenone or ethylbenzene, respectively. In contrast, no measurable activity was detected in extracts of EbN1-SR7 cells

grown on *p*-ethylphenol, *p*-hydroxyacetophenone, toluene or benzoate as substrate (toluene and benzoate not shown). Compared to the wild type strains grown on acetophenone or ethylbenzene (defined as 100%) reduced relative specific Apc activities of around 29% and 27% were detected in cell extracts of the *adiRS* deletion mutant grown on acetophenone or ethylbenzene, respectively. Similar to the wild type strain, no Apc activity was detectable in all cells grown on benzoate. After complementation of the *adiRS* genes *in trans* the relative Apc activity increased only a little up to 39% in cells grown on acetophenone, as compared to EbN1-SR7 cells grown on acetophenone. Apc activity of only 18% relative to the reference value was determined in cell free extract of strain  $\Delta$ *adiRS*com if grown under denitrifying conditions on ethylbenzene.

**Table 2 Activities of acetophenone carboxylase (Apc) and ethylbenzene dehydrogenase (EbdH) in cell free extracts of EbN1-SR7,  $\Delta$ *adiRS* and  $\Delta$ *adiRS*com grown under denitrifying conditions on different substrates.**

Growth substrate \ Strain	Specific activity of Apc			Specific activity of EbdH		
	EbN1-SR7	$\Delta$ <i>adiRS</i>	$\Delta$ <i>adiRS</i> com	EbN1-SR7	$\Delta$ <i>adiRS</i>	$\Delta$ <i>adiRS</i> com
Ethylbenzene	5.20 ± 2.61	1.38 ± 0.88	0.93 ± 0.04	2.68 ± 0.56	2.23 ± 0.12	2.15 ± 0.15
Acetophenone	9.88 ± 4.01	2.84 ± 1.02	3.82 ± 2.80	<0.1	2.59 ± 0.24	1.13 ± 0.73
<i>p</i> -Ethylphenol	<0.5	nd	nd	<0.1	<0.1	<0.1
<i>p</i> -Hydroxyacetophenone	<0.5	nd	nd	<0.1	<0.1	<0.1

Specific activities are given in nmol per min and mg of protein. The values given are the average of at least four parallel measurements including the standard deviation. nd = not determined.

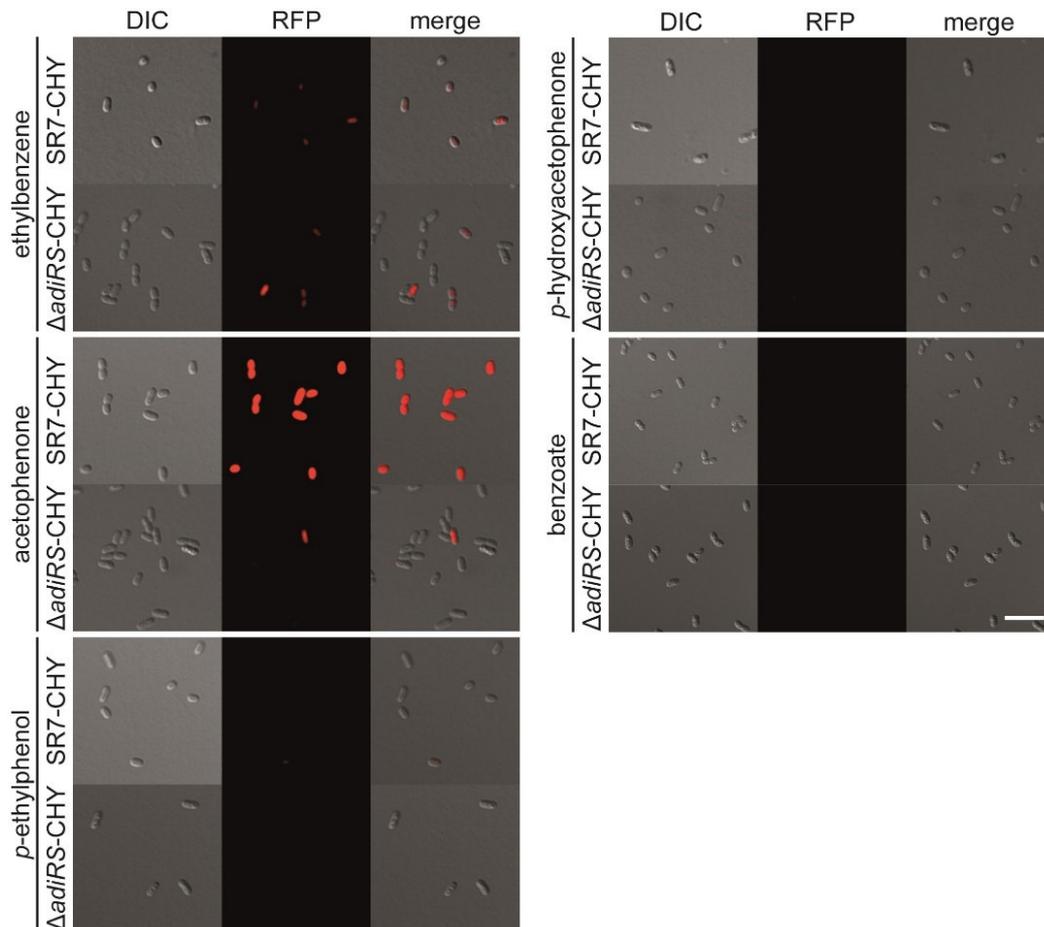
Additionally to Apc, we also confirmed the presence of the ethylbenzene dehydrogenase (EbdH) by immunoblot analysis using antisera raised against the purified EbdH in all ethylbenzene-grown cells of strains EbN1-SR7,  $\Delta$ *adiRS* and  $\Delta$ *adiRS*com (Fig. 2B). In contrast, cells grown on *p*-ethylphenol or *p*-hydroxyacetophenone showed only unspecific cross-reacting polypeptides. As expected, we detected an ethylbenzene-hydroxylating enzyme in cell free extracts of strain EbN1-SR7 grown on ethylbenzene (Table 2) with specific activities of around 2.68 nmol min<sup>-1</sup> (mg protein)<sup>-1</sup> by using a photometric enzyme assay with ferricenium tetrafluoroborate as artificial electron acceptor. Furthermore, no measurable activity was detected with ethylbenzene in EbN1-SR7 cells grown on other substrates (Table 2). Unexpectedly, the anti-EbdH antiserum revealed the presence of the two larger subunits of EbdH (96 kDa and 43 kDa), in extracts of the *adiRS* deletion strain with or without complementation when grown anaerobically on acetophenone. None of the extracts grown on *p*-ethylphenol, *p*-hydroxyacetophenone or benzoate showed any immunological reaction (Fig. 2B, benzoate not shown). In compliance with the immunoblot analysis, specific

ethylbenzene-hydroxylating activity was determined in extracts of  $\Delta adiRS$  and  $\Delta adiRScom$  grown under denitrifying conditions on acetophenone, although the complemented mutant showed a reduced value of EbdH activity of 1.13 nmol per min and mg protein (Table 2).

The *p*-ethylphenol degradation is proposed to involve a *p*-hydroxyacetophenone carboxylation step catalyzed by a biotin-dependent carboxylase (XccABC) encoded in the apparent *p*-ethylphenol operon (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Muhr *et al.*, 2015). We determined the presence of biotin-containing proteins by staining blotted SDS-gels with a commercially available horseradish peroxidase-avidin conjugate (Fig. 2C). In addition to the constitutive expressed biotin carrier protein of acetyl-CoA carboxylase, AccB (16 kDa; *ebA1472* gene product) we observed the presence of the XccB subunit (17.6 kDa; *ebB9* gene product) in extracts of strains EbN1-SR7 as well as  $\Delta adiRS$  and  $\Delta adiRScom$  grown on *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone (Fig. 2C). Moreover, the biotin-blot revealed the induction of XccB and an additional biotin-containing protein in extracts of the *adiRS* deletion mutant grown on ethylbenzene. LC-MS analysis identified these polypeptides as the XccB subunit mentioned above and a second putative XccB2 paralog (*ebA5773* gene product, 16.7 kDa) which is encoded downstream of the paralogous *ebd2* operon (Fig. 1C) (Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2005; Wöhlbrand *et al.*, 2008; 2009). Interestingly, these XccB subunits were not detected in extracts of the complemented strain grown on ethylbenzene or in any cells grown on acetophenone (Fig. 2C).

### Substrate-dependent fluorescence output in the *adiRS* deletion mutant

As recently described for the wild type strain EbN1-SR7 (Muhr *et al.*, 2016), an acetophenone-responsive fluorescent reporter construct was also integrated into the chromosome of the deletion mutant  $\Delta adiRS$ . The constructed gene fusion of the first gene of the acetophenone-catabolic operon with the gene coding for the fluorescent protein mCherry (*apcA-mCherry*) was incorporated into the chromosome in tandem with the unchanged *apc-bal* operon to avoid potential multi-copy effects (see Fig. S3A). The proper insertion of the whole plasmid at the predicted site was verified by using PCR analysis (see Table S1 and Fig. S3B). For better comparison in this study the insertion mutants were designated as strains SR7-CHY (designated as APC-CHY in Muhr *et al.*, 2016) and  $\Delta adiRS$ -CHY. In contrast to the reporter strain SR7-CHY, which responded significantly and consistently to the applied acetophenone concentrations, the induction pattern of ApcA-mCherry in the reporter strain  $\Delta adiRS$ -CHY was much more complicated.

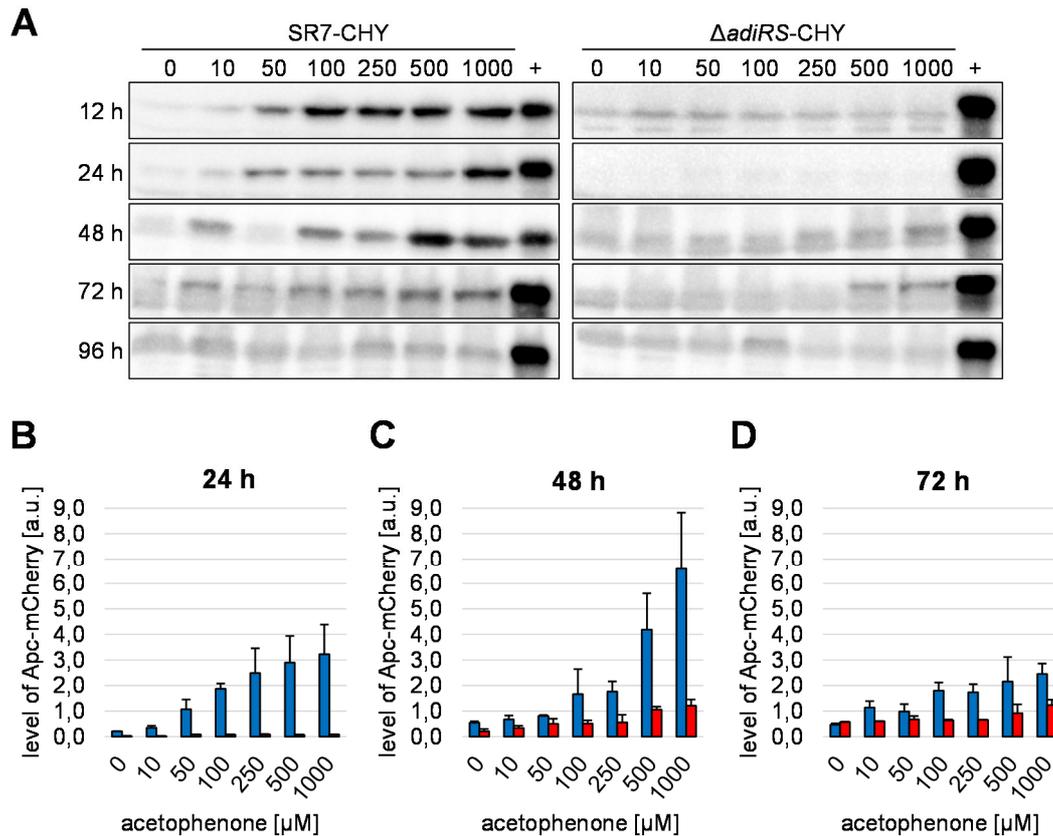


**Figure 3 Substrate-dependent fluorescence output in strains SR7-CHY and  $\Delta adiRS$ -CHY.** Cultures were grown under denitrifying conditions on ethylbenzene, acetophenone, *p*-ethylphenol, *p*-hydroxyacetophenone and benzoate. Samples were taken 48 h after inoculation. Differential interference contrast (DIC) and fluorescence microscopy images (RFP, 500 ms) of the cells are shown and scaled equally for comparison of differences in brightness (750/1750). Scale bar, 5  $\mu$ m.

Both reporter strains were grown in parallel under denitrifying conditions on different carbon sources. Samples were taken at certain time points after inoculation and analyzed for expression of the *apcA-mCherry* gene fusion by fluorescence microscopy (Fig. 3, 48 h) as well as for presence of ApcA-mCherry fusion proteins by quantitative immunoblot analysis (Fig. S4). The highest fluorescence signal response at each time point was observed in acetophenone-grown wild type strains. Furthermore, wild type strain SR7-CHY showed increased fluorescence intensities as well as specific ApcA-mCherry production in either ethylbenzene- or acetophenone-grown cells, whereas none of the cultures grown on *p*-ethylphenol, *p*-hydroxyacetophenone or benzoate showed significant response (Fig. 3; Fig. S4). In contrast, no ApcA-mCherry fusion protein was produced 24 h after induction in any cells of strain  $\Delta adiRS$ -CHY tested under these conditions (Fig. S4), apparently showing a delayed phenotype compared to the wild type strain. Increased fluorescence intensities and fusion protein production were observed in mutant strain  $\Delta adiRS$ -CHY when grown on either ethylbenzene

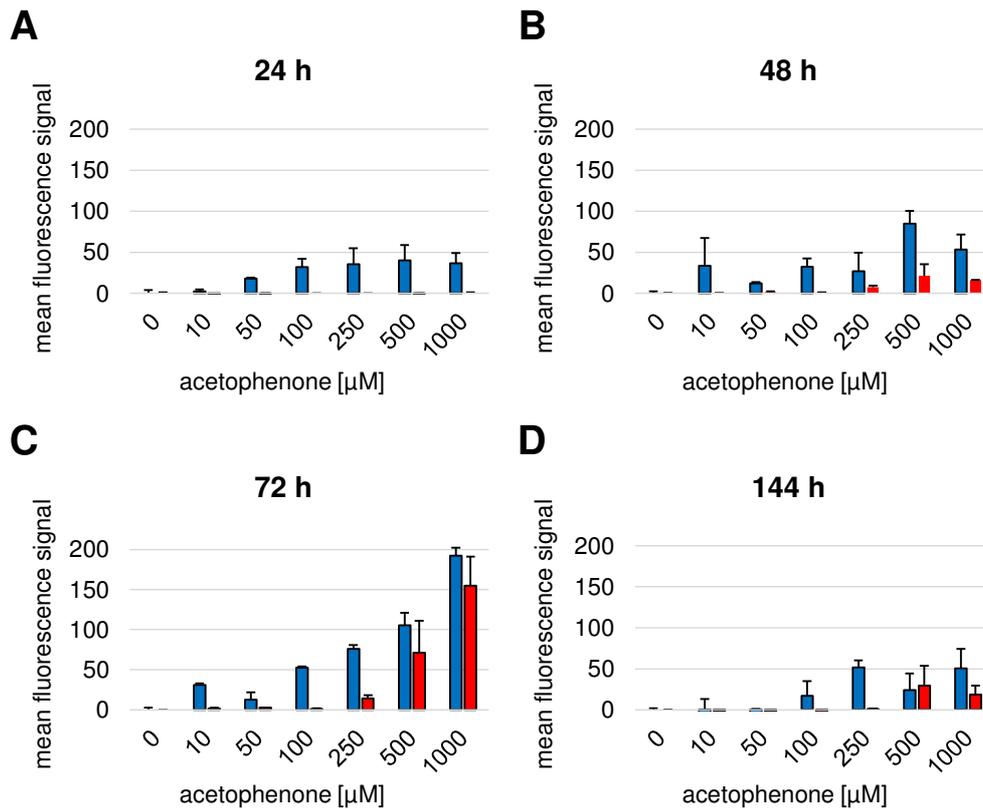
or acetophenone over 48 h (Fig. 3; Fig. S4), and even higher ApcA-mCherry levels were determined after 96 h in acetophenone-grown cells (Fig. S4). Nevertheless, cells of strain  $\Delta adiRS$ -CHY grown on ethylbenzene or acetophenone showed reduced signal response and more heterologous mixtures of fluorescent and non-fluorescent cells in comparison to the wild type strain SR7-CHY (Fig. 3). This is also reflected in a much higher variability in ApcA-mCherry fusion protein production in acetophenone-grown cells of strain  $\Delta adiRS$ -CHY compared to acetophenone-grown wild type strains (Fig. S4C).

To further elucidate the ApcA-mCherry fusion protein production in the reporter strain lacking the genes encoding AdiRS, we used a slight modified procedure presented in Muhr *et al.* (2016). Both reporter strains were inoculated in parallel in carbonate-buffered mineral salt media containing 4 mM benzoate. After 24 h growth under aerobic conditions different concentrations of acetophenone were added ( $t = 0$ ). Samples were taken for up to 144 h after induction and analyzed by quantitative immunoblot analysis of ApcA-mCherry signals (Fig. 4) as well as fluorescence based flow cytometry (Fig. 5). Immunoblot analysis of samples taken after 12 and 24 h revealed linear correlation between the added acetophenone concentration and the ApcA-mCherry level in strain SR7-CHY whereas only cross-reacting polypeptides were detected in strain  $\Delta adiRS$ -CHY (Fig. 4AB). These unidentified proteins are unrelated to the mCherry protein (Muhr *et al.*, 2016), but still impede the determination of low amounts of ApcA-mCherry. The fusion protein production in wild type strain SR7-CHY showed the highest values after 48 h and decreased with longer exposure times under the test conditions (Fig. 4ACD). In contrast, quantitation of various samples taken after different incubation times from the *adiRS* deletion mutant showed that the development of fluorescence required longer incubation periods. Moreover, the determined ApcA-mCherry protein levels in the reporter strain lacking the *adiRS* genes after 48 and 72 h were much lower than those observed in the wild type strain SR7-CHY (Fig. 4ACD).



**Figure 4 Time- and concentration-dependent analysis of ApcA-mCherry fusion protein production.** Cultures of strains SR7-CHY (blue) and  $\Delta\text{adiRS-CHY}$  (red) were analyzed for their content of ApcA-mCherry by immunoblot analysis after various times of exposure to different concentrations of acetophenone. (A) Samples were taken after the indicated time points given along the left margin. Lanes were loaded with cell free extracts (50  $\mu\text{g}$  of total protein each) and probed with anti-mCherry antiserum. For comparison a sample of strain SR7-CHY grown under denitrifying conditions on 2 mM acetophenone to mid-exponential phase (72 h) served as control (labeled with +). (B-D) Quantification of ApcA-mCherry signal intensities from the immunoblot analysis after 24 h (B), 48 h (C) and 72 h (D). The values given are the average of two parallel measurements including standard deviations in arbitrary units (a.u.).

The acetophenone-dependent fluorescence response was additionally confirmed by fluorescence based flow cytometry after different time points (Fig. 5). For this assay, 10,000 cells of each replicate at either substrate concentration were analyzed by measuring their relative mean fluorescence signals. The wild type strain SR7-CHY showed the highest fluorescence output primarily after 72 h of exposure to acetophenone under the tested conditions (Fig. 5C). The relative mean fluorescence observed for strain  $\Delta\text{adiRS-CHY}$  after 72 h exposure to 0.5 and 1 mM acetophenone were close to values observed for the wild type strain (Fig. 5C). However, no significant fluorescence output was detectable in any sample with acetophenone concentrations lower than 0.5 mM added to the assay (Fig. 5). In addition, samples of strain  $\Delta\text{adiRS-CHY}$  taken after 24 or 48 h exhibited nearly no significant fluorescence signal response (Fig. 5AB).



**Figure 5 Time- and concentration-dependent fluorescence output.** Cultures of strains SR7-CHY (blue) and  $\Delta$ adiRS-CHY (red) were measured for mCherry fluorescence after 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C), and 144 h (D) of exposure to different acetophenone concentrations. Shown are relative mean fluorescence signals determined by flow cytometric analysis of 10,000 cells per culture from two biological replicates per acetophenone concentration. Error bars indicate the standard deviations.

## Discussion

The regulation of anaerobic ethylbenzene and acetophenone degradation in the metabolically versatile *A. aromaticum* strain EbN1 has been proposed to be carried out by two TCS, EdiSR and AdiRS (Rabus *et al.*, 2002). Both regulatory systems are encoded as separate operons in a common gene cluster with the genes coding for enzymes of the respective ethylbenzene and acetophenone degradation pathways (Fig. 1, *ebd-ped* and *apc-bal* operon, respectively). In this publication, we intend to verify the role of the *adiRS* operon which has been proposed to regulate the induction of acetophenone-catabolic genes (Rabus *et al.*, 2002; Kühner *et al.*, 2005) by characterizing its effects in a deletion mutant lacking the *adiRS* genes as well as in an *adiR* gene disruption strain (see supplementary material).

Contrary to our expectations, both mutant strains still grew aerobically on acetophenone and anaerobically on ethylbenzene or acetophenone, showing only slightly lower growth rates than the wild type strain. Due to the high chemical similarity of ethylbenzene and *p*-ethylphenol a

first possible explanation for the observed phenotype may therefore be a deviation of ethylbenzene degradation via the *p*-ethylphenol-catabolic pathway (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Muhr *et al.*, 2015). In addition, *p*-ethylphenol oxidation is known to be catalyzed with very high activities by the physiologically “wrong” enzyme initiating anaerobic ethylbenzene metabolism (Kniemeyer and Heider, 2001a; 2001b; Knack *et al.*, 2012). In support of this hypothesis, ethylbenzene-grown cultures of the deletion strain showed increased synthesis of the biotin-containing carrier protein XccB which is encoded in the putative *p*-ethylphenol-induced operon (Fig. 1B), which is usually regulated by the  $\sigma^{54}$ -dependent regulator PdeR2 (Büsing *et al.*, 2015). To further test this hypothesis, a double-deletion mutant lacking the *adiRS* and *pdeR2* genes should be tested for its growth phenotypes and the induction of the enzymes of ethylbenzene or *p*-ethylphenol metabolism. A recently study on a deletion mutant of the *pdeR2* gene provided experimental evidence that the encoded protein is needed as transcription activator for the expression of the genes involved in the anaerobic *p*-ethylphenol degradation (Büsing *et al.*, 2015; named in this study as EtpR).

In contradiction to the first explanation, ethylbenzene dehydrogenase (EbdH) as well as acetophenone carboxylase (Apc) were still detectable in extracts of the *adiRS* deletion mutant grown on either ethylbenzene or acetophenone. However, specific enzyme activities were reduced compared to the wild type strain. Furthermore, the deletion mutant showed induction of EbdH if grown under denitrifying conditions on acetophenone whereas complete absence of EbdH was described for the wild type strain grown on any carbon source except ethylbenzene (Kniemeyer and Heider, 2001a; Kühner *et al.*, 2005; Muhr *et al.*, 2015). This effect of the deletion led to a first assumption that *AdiRS* possesses a kind of repressor function. In addition, the deletion strain revealed an increased induction of a second biotin-containing carrier protein XccB2, when grown on ethylbenzene. XccB2 is a subunit of an enzyme paralogous to an apparent carboxylase of the *p*-ethylphenol-catabolic pathway (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Muhr *et al.*, 2015). This observation corroborates the results obtained in RNA-Seq analysis (L. Clermont & J. Heider, unpublished data), showing already a low-level induction of the genes of the corresponding *xcc2* operon (Fig. 1C) by ethylbenzene in wildtype cells, which is apparently elevated in the *adiRS* deletion mutant. Restoring the *adiRS* genes on a broad host-range plasmid only resulted in a partial reversal of the observed deviations and did not lead to the same growth rate on acetophenone or a complete repression of the additional induced genes. To examine the induction pattern of the *apc-bal* operon *in vivo* as well as the influence of the predicted TCS, a fluorescent reporter strain lacking the *adiRS* genes was constructed as described (Muhr *et al.*, 2016). It has to be noted, that the experiments presented in this study

were done before the bioreporter assays were optimized in the wild type strain, and therefore are not directly comparable to the quantitative acetophenone sensor system performed in Muhr *et al.* (2016). However, it was clearly shown that inoculation with 1.5 mM instead of 4 mM benzoate in the first step has an impact and is necessary for acetophenone quantification. The results led to the assumption that the development of fluorescence required longer incubation periods in the deletion mutant. Additionally to probable time-delayed and decreased expression, fluorescence-dependent and immunoblot analysis of strain  $\Delta adiRS$ -CHY revealed strong variations of the fluorescence output and mCherry fusion protein level, respectively, when grown under denitrifying conditions on acetophenone. The probable time-delayed expression of genes encoding the acetophenone-catabolic enzymes correspond with the determined Apc activities since these cultures were grown and incubated longer on the respective carbon source to obtain a sufficient amount of cell mass for each enzyme assay.

Based on the observed results, we assume that acetophenone-dependent induction of the *apc-bal* operon may be regulated by a second independent regulatory system which would be expected to complement the *adiRS* deletion mutant. In this regard, it is highly interesting that genes coding for a TCS very closely related to *AdiRS* (named *xdiRS*) and a gene coding for a  $\sigma^{54}$ -dependent regulator similar to *PdeR2* (named *pdeR3*) are part of the gene cluster for the paralogous proteins that are apparently derepressed in the *adiRS* mutant (Fig. 1C). So far, none of the gene products encoded in this gene cluster have been detected under any growth conditions or ascribed to any physiological function (Kühner *et al.*, 2005; Rabus, 2005; Wöhlbrand and Rabus, 2009).

Beside the two putative regulatory systems *EdiRS* and *AdiRS* (Rabus *et al.*, 2002), our recent results suggest that a third TCS *XdiRS* may be an additional partner in the overall regulation mechanism. All three regulator compounds consist of a response receiver domain with a conserved aspartate accepting a phosphoryl group from the phosphorylated histidine of the respective sensor compound and a helix-turn-helix domain for DNA-binding. Full sequences alignment of *AdiR* and *XdiR* revealed a very strong similarity of 58.3% (Fig. 5A). Furthermore, alignment of the C-terminal signal transduction histidine kinase domains of *AdiS* and *XdiS* showed a similarity of 48.7%, whereas the sensory PAS domains of the two sensors are not similar to each other (Fig. 5B). The sensor compound of all three systems contains either one (*AdiS*, *XdiS*) or two (*EdiS*) putative sensory domains of the PAS family and a conserved histidine kinase domain related to that of oxygen-sensing *FixL* proteins (Leuthner and Heider, 1998; Rabus *et al.*, 2005).

**A**

```

AdiR 1 mieilvaddhpiivreglktvismapdiavtgeaanggevlalirrkfdvllldmsmpgh 60
XdiR 1 mirvfvaddhflvreglkmiaamqdvvevaeatnggevlaalktcnahnvllldmsmpgl 60
      **:*****:*****.:*:*:*.**:******:*:*:*****
AdiR 61 dgvdlikrvraeqpllpilvltmhgeaqlaasalklgvagyltkgkdvesltnairkvaa 120
XdiR 61 sgvdlvrvrksewpglpilvlsmygetqlaakvlqsgasgyvtkgkgreilllsairkvas 120
      .*****:***:* * *****:***:*****.:*:*:***** * * *****:
AdiR 121 gpcidpdlaekiiifnarffa-gpgeplereigvlrmlqlgktvteisvelslsptkvs 179
XdiR 121 ghryidpdlaekilfdvrmptasvgeclthresqilrmlqagksvtqianelsvspkvs 180
      *: *****:***:*.**:*.**:***** ***:*****
AdiR 180 thkvhlmrklgianna dliry rpeegl---- 206
XdiR 181 thkiramgklhcnvvellykapeaveacf 211
      ***:*.**: * ** ***:***** ***:

```

**B**

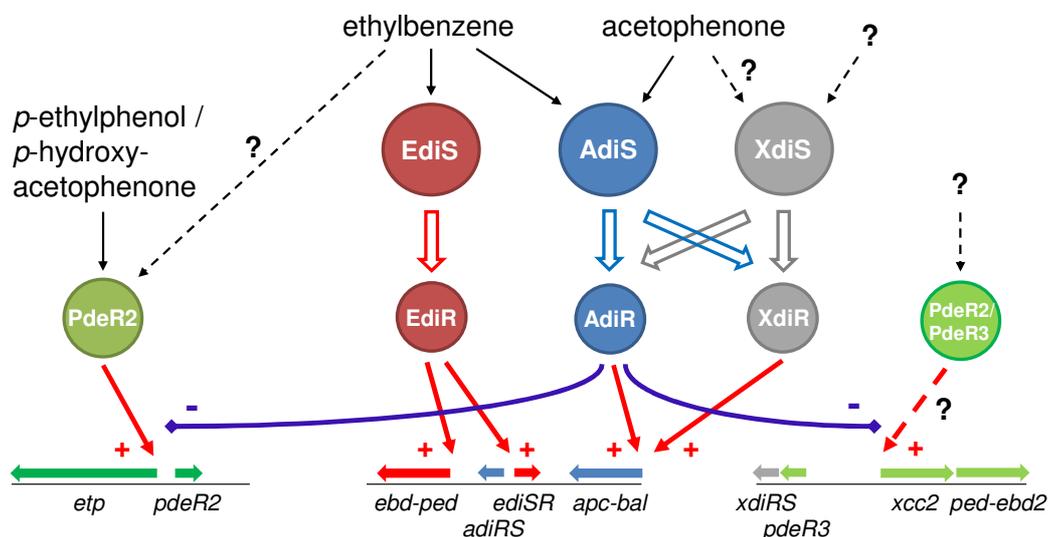
```

AdiS 1 ----mpldasailvmpp-----gvrvc----- 19
XdiS 1 mkrampmevtaagapqlnydqafatwvqqskdmfarfggnfdiqyanpafcrnfgiamd 60
      ***:..* *
AdiS 20 ----ggavlnqveevvlywviamkdhk-ngvn----fgkgssgpcggn----- 59
XdiS 61 aiadaglsqfgilreistgwcdllera yndgkerseelwlp tqnglrcfrmhvaperltg 120
      .* : : * : : * : : * : : * : :
AdiS 60 -----cetssataialresekfrtifeksnpvtl dngvfvdcdatvsl 106
XdiS 121 ngpvesvwadgrditdirgaqsilgetearfkaiivsnvpgavfq lamhrfddlprfqyvs 180
      : : * * : : : : * * : *
AdiS 107 hqyenkaqliglt padvspesqpdgrlssekaievvrial---engsyhfpwairrkdge 163
XdiS 181 qgi---valsrllapeklrrssdnftgllhpddiaafhqsmksssetl trwswagrlcagt 237
      .* . * * : * : * * . * . * : : : : * * * *
AdiS 164 vldaevvl---taifvggkkihahatwgdvtagnrakkkli eserflretckhveevree 220
XdiS 238 haerwislqatprlmdagmvlwdgimlqatdarrneeklrqseeflrdlcvrvgmiree 297
      : : * : : * : : * * . * . * : : * * * * : * * : * *
AdiS 221 kasiareihdelgqlltal kmevf cikpgrshdvelmskadamgvli dsliivr vrdiata 280
XdiS 298 ksaiaareihdelgqlltv lkm dls cmreaggldsrsvakmlrmesltd dilyr vrdiast 357
      *:*****:*****:***:*.**:*.**:***** * * * * : * * : * * : * * :
AdiS 281 lrpkvlelglvvavewllgdfmrrsgihcqlhledegvvnslgssqtlalfrilqesltn 340
XdiS 358 lrpkvldlglapaiewlqefssht rlvcr l singdelcgnldstaitaifri vqesltn 417
      *****:***: * * * * * * : : * * * * : : : : * * * * : * * : * *
AdiS 341 aarhskasnygvwlarngkfaelvi eddgvgfdpsgddqlrglglrgikertillggrf 400
XdiS 418 aarharakhidisltrrgqlql lirdgvgfdpdalp--iccnlgsgireravilgael 475
      *****:..* : * * * * * * : : * * * * * * : * * * * * : * * :
AdiS 401 eigsrregagvklkvalpvsgp-- 421
XdiS 476 ridssahtgttle vli phvvtsa 498
      . * * : * * * * *

```

**Figure 5** Amino acid sequence comparison of the putative two-component regulatory systems *AdiRS* and *XdiRS* of *A. aromaticum* strain EbN1. Sequences alignments and identities were analyzed by using the Clustal Omega program provided on the Uniprot web-page (<http://www.uniprot.org/align>). Amino acids are indicated by their standard one-letter code. Identical residues (\*), conservative (:), and semi-conservative (.) substitutions are highlighted in *dark gray*, *gray* and *light gray*, respectively. **(A)** Full sequence alignment of the putative response regulators *AdiR* (CAI07437) and *XdiR* (CAI09390) with a sequence identity of 58.3%. The signal receiver domain with the phosphoacceptor Asp residue highlighted in *yellow*, and the C-terminal DNA-binding domain with a HTH motif are *boxed*. **(B)** Full sequence alignment of the putative sensory histidine kinases *AdiS* (CAI07436) and *XdiS* (CAI09389) with a sequence identity of 28.4% and 48.7% for the signal transduction histidine kinase domain. The HisKA and HATPase domains of the two-component sensor histidine kinases are *boxed*. The putative PAS domain of *AdiS* is highlighted in *light blue*.

Taken together all results and findings it became apparent that the regulation of genes involved in anaerobic degradation of ethylbenzene, acetophenone and *p*-ethylphenol degradation is closely interconnected. It appears that three large gene clusters in the genome of *A. aromaticum* are involved in this complex regulatory network (Fig. 1). This study presents a tentative model as proposal for an interconnected regulatory network between the various regulators and metabolic operons (Fig. 6). Similar redundant regulatory systems are well known in bacteria, most prominently the induction of nitrate-respiration in *E. coli* by the TCS NarXL and NarQP (Noriega *et al.*, 2010). Remarkable, a previous study revealed a novel “four-component” signaling system RedCDEF including a histidine kinase, a histidine-kinase like protein, and two response regulators in *Myxococcus xanthus* (Jagadeesan *et al.*, 2009).



**Figure 6 Proposed interconnected regulatory network.** Scheme of metabolic operons and various regulatory enzymes involved in the substrate-specific induction of ethylbenzene (*ebd*) and acetophenone (*apc*) as well as *p*-ethylphenol (*etp*) and *p*-hydroxyacetophenone metabolism. Red arrows (+) indicate predicted induction of gene expression in the presence of the appropriate substrate, whereas blue arrows (-) indicate repression by the AdiRS system if ethylbenzene is present. A potential role of the paralogous regulation system XdiRS in complementing for an *adiRS* deletion is indicated here.

As stated at the beginning, this manuscript needs further experiments to allow final conclusions. Apart from some open questions and verifications it will be worthy of publication. As example of necessary examinations see Chapter 3.4 in which first experiments for the development of a complementation system *in cis* are described.

## Acknowledgments

We thank Iris Schall and Andrea Schmidt for excellent technical assistance and Ashraf Alhapel for his work during the initial phase of the project. EM thanks Nilanjan Pal Chowdhury for helpful discussions. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 987), the Max Planck Society, and by the LOEWE program of the state Hessen (LOEWE Centre for Synthetic Microbiology, SYNMIKRO, Marburg).

## References

- Ball HA, Johnson HA, Reinhard M and Spormann AM (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J Bacteriol* 178:5755-5761
- Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254 doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Büsing I, Kant M, Dörries M, Wöhlbrand L and Rabus R (2015) The predicted  $\sigma^{54}$ -dependent regulator EtpR is essential for expression of genes for anaerobic *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone degradation in "Aromatoleum aromaticum" EbN1. *BMC Microbiol* 15:251: doi: 10.1186/s12866-015-0571-9
- Carmona M, Zamarro MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF *et al.* (2009) Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:71-133 doi: 10.1128/MMBR.00021-08
- Champion KM, Zengler K and Rabus R (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:157-164
- Chang ACY and Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134:1141-1156
- Dudzik A, Snoch W, Borowiecki P, Opalinska-Piskorz J, Witko M *et al.* (2014) Asymmetric reduction of ketones and  $\beta$ -keto esters by (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase from denitrifying bacterium *Aromatoleum aromaticum*. *Appl Microbiol Biotechnol* doi: 10.1007/s00253-014-6309-z
- Fuchs G, Boll M and Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology* 9:803-816 doi: 10.1038/nrmicro2652
- Harwood CS, Burchhardt G, Herrmann H and Fuchs G (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22:439-458 doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00380.x
- Heider J, Schühle K, Frey J and Schink B (2016a) Activation of Acetone and Other Simple Ketones in Anaerobic Bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26:152-164 doi: 10.1159/000441500
- Heider J, Szaleniec M, Sünwoldt K and Boll M (2016b) Ethylbenzene Dehydrogenase and Related Molybdenum Enzymes Involved in Oxygen-Independent Alkyl Chain Hydroxylation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26:45-62 doi: 10.1159/000441357
- Höffken HW, Duong M, Friedrich T, Breuer M, Hauer B *et al.* (2006) Crystal structure and enzyme kinetics of the (*S*)-specific 1-phenylethanol dehydrogenase of the denitrifying bacterium strain EbN1. *Biochemistry* 45:82-93 doi: 10.1021/bi051596b

- Inoue H, Nojima H and Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28 doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P
- Jagadeesan S, Mann P, Schink CW and Higgs PI (2009) A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* 284:21435-21445
- Jobst B, Schühle K, Linne U and Heider J (2010) ATP-Dependent Carboxylation of Acetophenone by a Novel Type of Carboxylase. *J Bacteriol* 192:1387-1394 doi: 10.1128/JB.01423-09
- Johnson HA, Pelletier DA and Spormann AM (2001) Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol* 183:4536-4542 doi: 10.1128/JB.183.15.4536-4542.2001
- Johnson HA and Spormann AM (1999) *In Vitro* Studies on the Initial Reactions of Anaerobic Ethylbenzene Mineralization. *J Bacteriol* 181:5662-5668
- Jung A, Eisheuer S, Cserti E, Leicht O, Strobel W *et al.* (2014) Molecular Toolbox for Genetic Manipulation of the Stalked Budding Bacterium *Hyphomonas neptunium*. *Appl Environ Microbiol* 81:736-744 doi: 10.1128/AEM.03104-14
- Kloer DP, Hagel C, Heider J and Schulz GE (2006) Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure* 14:1377-1388 doi: 10.1016/j.str.2006.07.001
- Knack D, Hagel C, Szaleniec M, Dudzik A, Salwinski A and Heider J (2012) Substrate and inhibitor spectrum of ethylbenzene dehydrogenase: perspectives on application potential and catalytic mechanism. *Appl Environ Microbiol* 78:6475-6482 doi: 10.1128/AEM.01551-12
- Kniemeyer O and Heider J (2001a) Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J Biol Chem* 276:21381-21386 doi: 10.1074/jbc.M101679200
- Kniemeyer O and Heider J (2001b) (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch Microbiol* 176:129-135 doi: 10.1007/s002030100303
- Kühner S, Wöhlbrand L, Fritz I, Wruck W, Hultschig C *et al.* (2005) Substrate-Dependent Regulation of Anaerobic Degradation Pathways for Toluene and Ethylbenzene in a Denitrifying Bacterium, Strain EbN1. *J Bacteriol* 187:1493-1503 doi: 10.1128/JB.187.4.1493-1503.2005
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee Y-W, Jin S, Sim W-S and Nester EW (1995) Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:12245-12249
- Leuthner B and Heider J (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiol Lett* 166:35-41 doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13180.x
- Muhr E, Leicht O, González Sierra S, Thanbichler M and Heider J (2016) A Fluorescent Bioreporter for Acetophenone and 1-Phenylethanol derived from a Specifically Induced Catabolic Operon. *Frontiers in Microbiology* 6:1561: doi: 10.3389/fmicb.2015.01561

- Muhr E, Schühle K, Clermont L, Sünwoldt K, Kleinsorge D *et al.* (2015) Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in '*Aromatoleum aromaticum*': differentiation and differential induction. *Arch Microbiol* doi: 10.1007/s00203-015-1142-z
- Noriega CE, Lin H-Y, Chen L-L, Williams SB and Stewart V (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 75:394-412 doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06987.x
- Rabus R (2005) Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:580-587 doi: 10.1007/s00253-005-0030-x
- Rabus R and Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 170:377-384 doi: 10.1007/s002030050656
- Rabus R, Kube M, Beck A, Widdel F and Reinhardt R (2002) Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 178:506-516 doi: 10.1007/s00203-002-0487-2
- Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K *et al.* (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 183:27-36 doi: 10.1007/s00203-004-0742-9
- Rabus R, Trautwein K and Wöhlbrand L (2014) Towards habitat-oriented systems biology of "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1: chemical sensing, catabolic network modulation and growth control in anaerobic aromatic compound degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:3371-3388 doi: 10.1007/s00253-013-5466-9
- Rabus R and Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163:96-103 doi: 10.1007/BF00381782
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G and Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73
- Taylor RG, Walker DC and McInnes RR (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21:1677-1678 doi: 10.1093/nar/21.7.1677
- Wöhlbrand L and Rabus R (2009) Development of a genetic system for the denitrifying bacterium '*Aromatoleum aromaticum*' strain EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17:41-52 doi: 10.1159/000159194
- Wöhlbrand L, Wilkes H, Halder T and Rabus R (2008) Anaerobic degradation of *p*-ethylphenol by "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1: pathway, regulation, and involved proteins. *J Bacteriol* 190:5699-5709 doi: 10.1128/JB.00409-08

### 3.3. Supplementary material

#### Construction and characterization of an *adiR* gene-disrupted mutant of *A. aromaticum*

To further elucidate the role of the two-component system AdiRS a kanamycin resistant strain with a disruption of the gene coding for the putative acetophenone response regulator AdiR was generated (*adiR* 621 bp). Therefore, a modified procedure of the construction of a chromosomal *apcA-mCherry* insertion mutant was used. A fragment of the *adiR* gene lacking the first 49 and last 121 codons (451 bp) was amplified from genomic DNA of strain EbN1-SR7 using the primer pair Dis\_aR\_for\_XbaI/Dis\_aR\_rev\_XbaI (Table S1), restricted with *XbaI*, and ligated into the equally treated vector pK19mobsacB. The resulting plasmid pK19*daR* (6176 bp) was sequenced and conjugated into EbN1-SR7. Kanamycin resistant transconjugants were screened for a single crossover event with the chromosomal DNA, leading to the stable insertion of the entire vector within the *adiR* gene. The proper insertion of the whole plasmid at the predicted site results in a duplication of the internal part of the *adiR* gene (450 bp) and thereby two non-functional *adiR* versions (*adiR1*: start codon – 500 bp and *adiR2*: 51 bp – stop codon). The disruption mutant strain was verified by colony PCR using different primer pairs (see Table S1) and designated as *dadiR*.

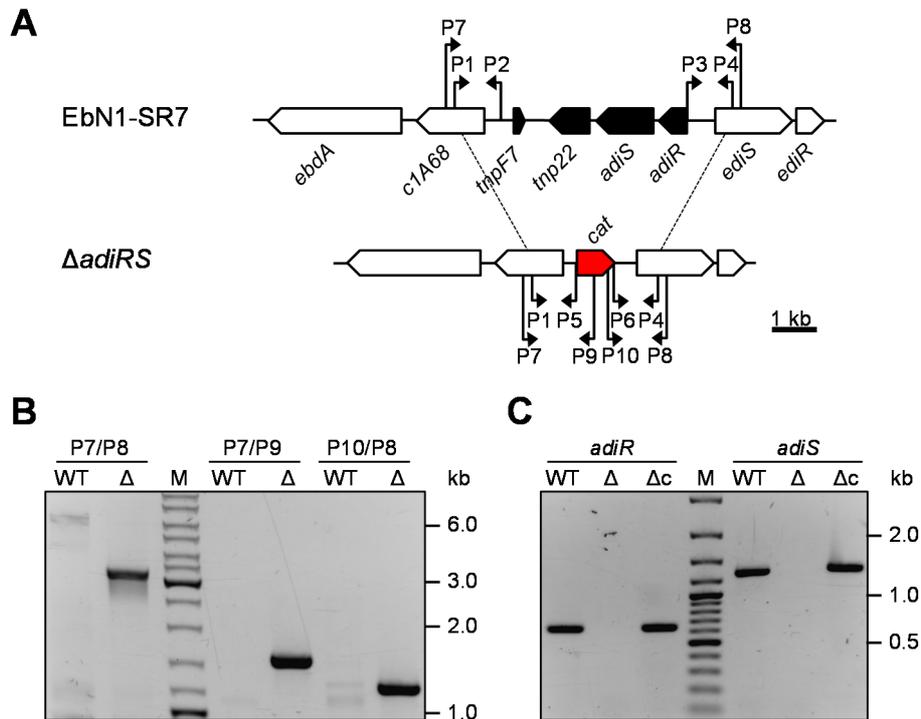
According to the *adiRS* deletion mutant, strain *dadiR* was still able to grow under denitrifying conditions on acetophenone and ethylbenzene as well as benzoate, toluene, *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone (data not shown). Similarly to strain  $\Delta$ *adiRS* the absence of a full version *adiR* gene was verified by PCR using chromosomal DNA of *dadiR* adapted cultures grown on benzoate, acetophenone, ethylbenzene or toluene (data not shown). Since, no significant decrease in growth rates were detectable for the disruption strain, all further experiments were carried out only with the deletion strain.

## Supplementary tables

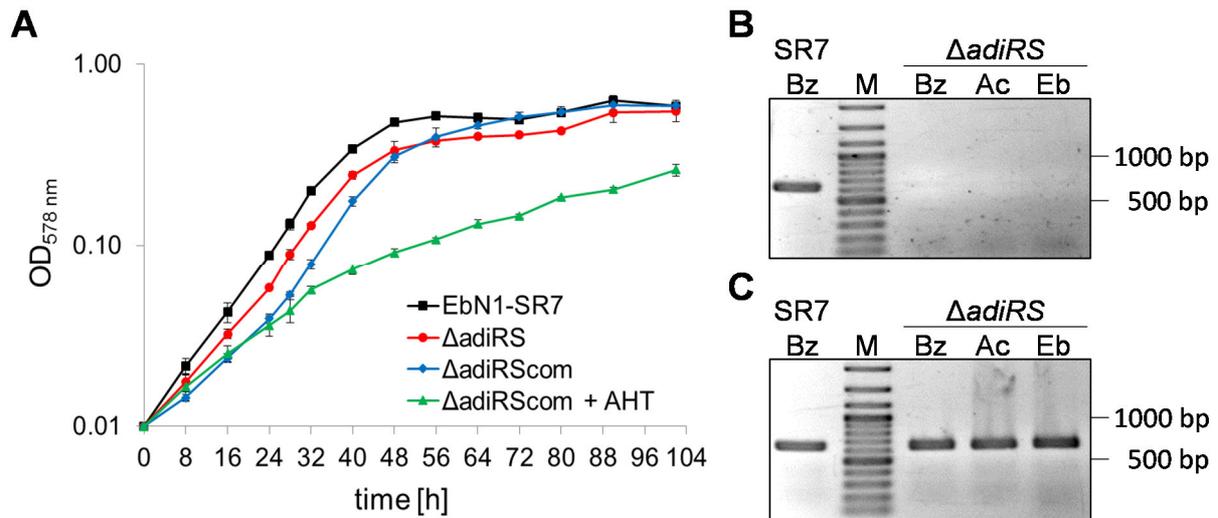
**Table S1** Sequences of oligonucleotide primers derived from the genome sequence of *A. aromaticum* strain EbN1 used in this study (integrated restriction sites are underlined).

Primer	Sequence (5' → 3')
<i>adiRS</i> deletion and <i>cat</i> integration construct	
P1_Δ <i>adiRS</i> _PstI	AAA <u>ACTG</u> CAG AGATTCCCCT ATAAATATCG GCGGGATTGG
P2_Δ <i>adiRS</i>	TTCTGCGAAG TGATCTTCCG TCACAGGTAT TTTCACGTCG TGCTTCCTCT CGTTGCGTCA
P3_Δ <i>adiRS</i>	TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TCGATCATGT GAGTCTCCTG CCACAGTCGC
P4_Δ <i>adiRS</i> _XbaI	AAAATCTAG <u>A</u> TGACACCAA ATATTTTCGCC GTTTTTGCGC
P5_Δ <i>adiRS</i>	TGACGCAACG AGAGGAAGCA CGACGTGAAA ATACCTGTGA CGGAAGATCA CTTGCGAGAA
P6_Δ <i>adiRS</i>	GCGACTGTGG CAGGAGACTC ACATGATCGA TTACGCCCCG CCCTGCCACT CATCGCAGTA
P7_conf_for	ACGCATCCGT CGTCTGGCCG GT
P8_conf_rev	GCTGCAAATT GACAGTGCGC CGCTC
P9_CAT_rev	CATTGCCATA CGGAATTCCG GATG
P10_CAT_for	CGACAAGGTG CTGATGCCGC TGGC
<i>adiR</i> _for	ATGATCGAGA TTCTGGTGGC AG
<i>adiR</i> _rev	CTAAAGTCCT TCCTCGGGAC GATAG
<i>adiS</i> _for	ATTGCCCTC GATGCGAGC
<i>adiS</i> _rev	CTAGGGGCCA GATACGGGAA TGG
<i>ediR</i> _for	ATGAACCCGC ATCAAGTGAC AGTG
<i>ediR</i> _rev	GTATTGCGAC TTCTCCTGAG CGTG
<i>adiRS</i> complementation construct	
<i>adiRS</i> _com_for3	AAGCTCTTCA ATGGGGCAGT CGCTGTCC
<i>adiRS</i> _com_rev3	AAGCTCTTCA CCCTGAATAG ATCAGAGTTT C
Modification of complementation plasmid with <i>mob</i> -site	
Sense_pASG_Mob(-ColE1)	AAGCTCTTCA ATGACGGTTC CTGGCCTTTT GCTG
Antisense_pASG_Mob	AAGCTCTTCA CCCAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATC
<i>adiR</i> disruption construct	
Dis_aR_for_XbaI	AAATCTAGAG AAGACAGTGA TATCCATGGC CCCGGATAT
Dis_aR_rev_XbaI	AAATCTAGAA TTTCTGTAAC CGTCTTTCCC AGCTGCAGC
<i>apcA-mCherry</i> fusion and integration construct	
P11_apcA_for_HindIII	GCAAGCTTGG CGATTCACCC GTTTCG
P12_apcA_rev_XbaI	AATCTAGACG GGGTGGTGTC CACCTTG
P13_apcA_+186bp_rev	GACCTTGGCG AGAAAGGCCT
P14_CHY_for_XbaI	AATCTAGAAA GGGCGAGGAG GATAACATG
P15_CHY_rev_EcoRI	AAGAATTCCT ACTTGACAG CTCGTCCATG
M13_for	TGTAAAACGA CGGCCAGT
M13_rev	CAGGAAACAG CTATGACC

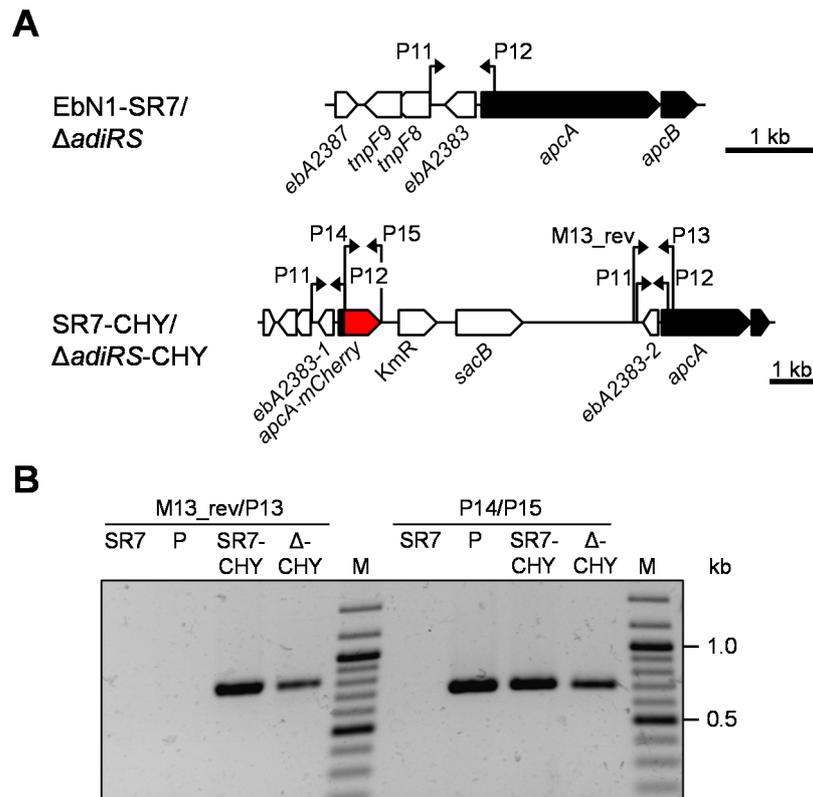
## Supplementary figures



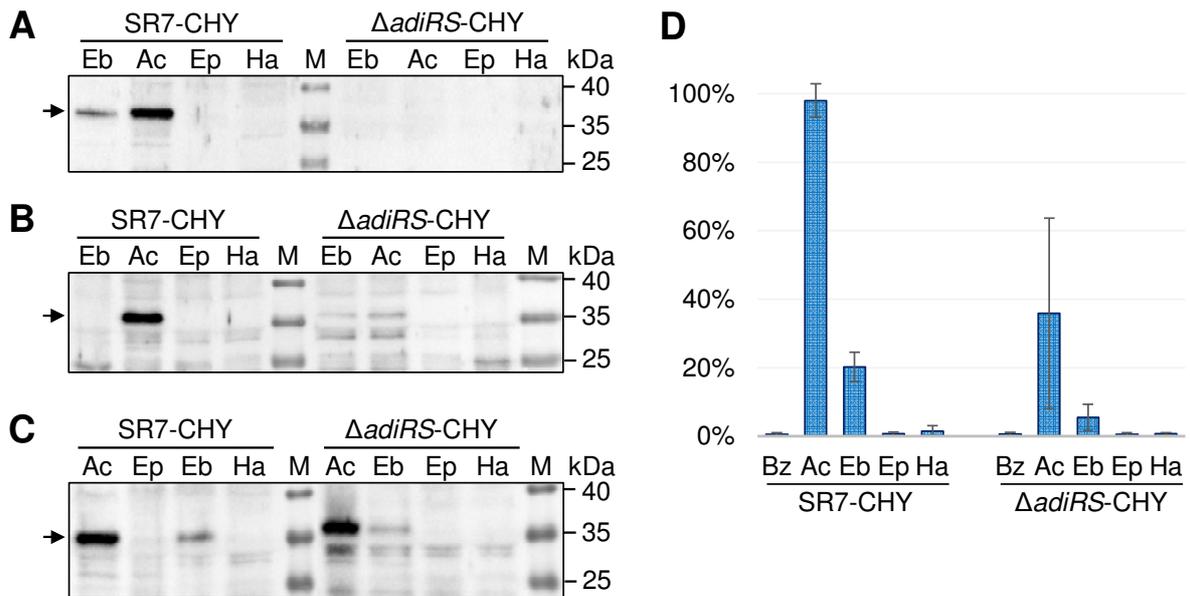
**Figure S1 Schematic depiction for deletion of the *adiRS* operon in the genome of EbN1-SR7 and PCR analysis confirming this gene deletion.** (A) Overview of the gene organization of the *A. aromaticum* strain EbN1-SR7 compared to the deletion strain  $\Delta$ *adiRS*. Primers used for construction and confirmation are indicated by arrows at their binding positions (see Table S1). (B+C) PCR products analyzed on a 1% agarose gel to confirm the in-frame *adiRS* deletion mutant by replacement with a chloramphenicol resistance cassette (*cat*). Therefore, genomic DNA of EbN1-SR7 (WT),  $\Delta$ *adiRS* ( $\Delta$ ) and  $\Delta$ *adiRS*com ( $\Delta$ c) was isolated and used as template for PCR reactions using the primers listed in Table S1. (B) P7/P8: 6103 bp for EbN1-SR7 or 3163 bp for  $\Delta$ *adiRS*, P7/P9: 1584 bp and P10/P8: 1274 bp, M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix. (C) *adiR*\_for/*adiR*\_rev: 621 bp, *adiS*\_for/*adiS*\_rev: 1266 bp, M: GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder.



**Figure S2 Time course of anaerobic growth on acetophenone and PCR analysis to confirm the *adiRS* deletion mutant.** (A) Cell growth of *A. aromaticum* strains EbN1-SR7 (black square),  $\Delta$ adiRS (red circle),  $\Delta$ adiRScom (blue diamond) and  $\Delta$ adiRScom with  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  AHT (green triangle), cultivated under denitrifying conditions on acetophenone in 0.5-liter bottles, was monitored over 102 h ( $n = 3$ ). No antibiotics were added except ampicillin ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the case of  $\Delta$ adiRScom. AHT ( $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was added after 16 h. (B+C) PCR products analyzed on 1% agarose gels to confirm the *adiRS* deletion mutant. Therefore, genomic DNA of  $\Delta$ adiRS cultures (48 h) grown on benzoate (Bz), acetophenone (Ac) and ethylbenzene (Eb) was isolated and used as template for PCR reactions using the primers listed in Table S1: *adiR\_for/adiR\_rev* (B; 621 bp) or *ediR\_for/ediR\_rev* (C; 624 bp). Genomic DNA of EbN1-SR7 grown on benzoate served as positive control (SR7 Bz). M: GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder.



**Figure S3 Schematic depiction for integration of *apcA-mCherry* fusion construct into the genome of EbN1-SR7 and  $\Delta$ *adiRS* as well as PCR analysis confirming these mutants. (A) Overview of the gene organization of the *A. aromaticum* strain EbN1-SR7 and  $\Delta$ *adiRS* compared to the strains containing a chromosomal integration of an *apcA-mCherry* fusion. Primers used for construction and confirmation are indicated by arrows at their binding positions (see Table S1). (B) PCR products analyzed on a 1% agarose gel to confirm the SR7-CHY and  $\Delta$ *adiRS*-CHY mutants. Therefore, genomic DNA of SR7-CHY and  $\Delta$ *adiRS*-CHY ( $\Delta$ -CHY) was isolated and used as template for PCR reactions using the primers listed in Table S1. Genomic DNA of EbN1-SR7 (SR7) and plasmid DNA of pK19*apcA*-CHY (P) served as controls. M13\_rev/P13: 791 bp, P14/P15: 714 bp, M: GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder.**



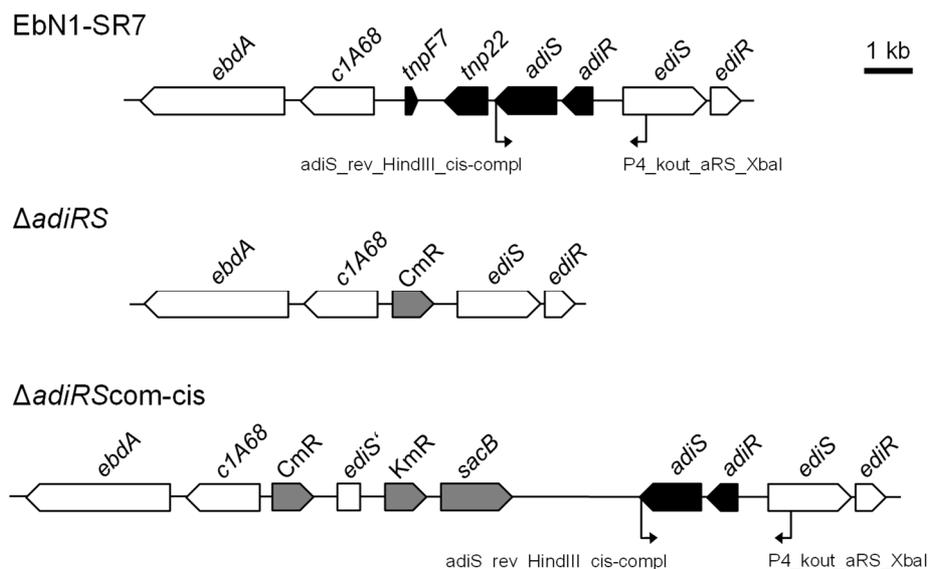
**Figure S4 Quantitative and time-dependent analysis of ApcA-mCherry fusion protein production in strain SR7-CHY and  $\Delta adiRS$ -CHY.** (A-C) Immunoblot analysis of cell free extracts (50  $\mu$ g per lane) using anti-mCherry antiserum. Cultures of both reporter strains were grown under denitrifying conditions on ethylbenzene (Eb), acetophenone (Ac), *p*-ethylphenol (Ep), *p*-hydroxyacetophenone (Ha) and benzoate (Bz). Samples were taken after 24 h (A), 48 h (B) and 96 h (C) after inoculation. The arrows indicate the position of the ApcA-mCherry fusion product (30.1 kDa). Molecular masses of the protein standard (M) are given along the right margin. Attention, immunoblot C has an altered order compared to A+B. (D) Quantification of signal intensities obtained for the ApcA-mCherry by immunoblot analysis in relative units (%) compared to strain SR7-CHY grown on acetophenone as positive control (set 100%). The values given are the average of at least three parallel measurements. Error bars indicate the standard deviation.

### 3.4. Additional material of ongoing experiments

#### Development of a complementation system *in cis*

The construction of a working complementation strain  $\Delta adiRS$  *in trans* by using two different plasmids was not possible so far and much more difficult than we thought. To confirm that the mutant phenotype is caused by the *adiRS* gene deletion, and not by a secondary gene mutation, a *cis* complementation of *adiRS* has been constructed. The construction will be described in the next paragraph.

To restore the *adiRS* genes *in cis* the same modified procedure based on the plasmid pK19mobsacB described for the construction of a chromosomal *apcA-mCherry* insertion mutant and the *adiR* gene-disrupted mutant was used. Therefore, a 2932 bp fragment, including 992 bp of the 5' upstream region of *adiR* up to the stop codon of *adiS*, was amplified from genomic DNA of strain EbN1-SR7 using the primer pair *adiS\_rev\_HindIII\_cis-compl* (5'-GCAAGCTTTGAATAGATCAGAGTTTC-3') and P4\_kout\_aRS\_XbaI (5'-AAAATCTAGATGACACCAAATATTTTCGCCGTTTTTGCGC-3'). This fragment, including the first 335 bp of the *ediS* gene, was restricted with *HindIII* and *XbaI*, and ligated into the equally treated pK19mobsacB. The resulting plasmid pK19aRScom (8634 bp) was sequenced and conjugated into  $\Delta adiRS$  (see Abb. 6) and EbN1-SR7 as control using the DAP-auxotrophic *E. coli* strain WM3064.



**Abb. 6 Schematic depiction for complementation of the *adiRS* gene deletion *in cis***

Overview of the gene organization of *A. aromaticum* strains EbN1-SR7 and  $\Delta adiRS$  compared to strain  $\Delta adiRS$ com-*cis* containing a chromosomal integration of plasmid pK19aRScom. Primers used for amplification of the complementation fragment are indicated by arrows at their binding positions.

So far, the resulting transconjugants were purified three times on DAP-free mineral salt media (containing streptomycin, kanamycin and chloramphenicol) to guarantee the purity of the cultures and absence of residual *E. coli* contamination. The colonies were screened for the presence of plasmid-mediated kanamycin resistance, which should indicate chromosomal integration by a single crossover event in the homologous upstream sequence of the chloramphenicol resistance cassette. This kanamycin-resistant complemented mutant was designated as strain  $\Delta adiRS_{com-cis}$ .

Ongoing experiments (following this PhD thesis) should start with testing this complementation mutant strain for proper integration of the plasmid using PCR analysis. Furthermore,  $\Delta adiRS_{com-cis}$  should be investigated for the specific activity of key enzymes of ethylbenzene, acetophenone and *p*-ethylphenol degradation combined with immuno- and biotin-blotting analyses in comparison to strains  $\Delta adiRS$ , EbN1-SR7 as well as strain EbN1-SR7 with the chromosomal integration of plasmid pK19aRSc<sub>om</sub>.

## 4. Transkriptionsstartbestimmungen der Operons des Ethylbenzol- und Acetophenonmetabolismus

### Zusammenfassung

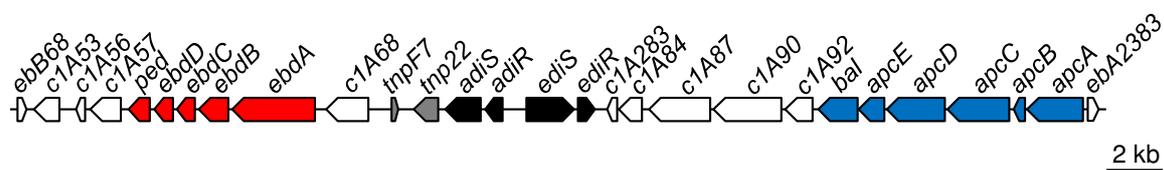
Im fünften und abschließenden Ergebnis-Kapitel dieser Dissertation werden erste Experimente zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte (TSP) und RNA-Sekundärstrukturanalysen der 5'-untranslatierten Bereiche (5'-UTR) der Operons des anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonmetabolismus in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 präsentiert (*ebd-ped* bzw. *apc-bal* Operon).

Trotz nötiger, noch ausstehender Bestätigungen, wurden im Rahmen dieser Dissertation erstmals putative TSP mit Hilfe der Primer-Extension-Analyse für die am anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonabbau beteiligten Operons experimentell ermittelt. Zwei putative TSP lagen 185 bzw. 141 Basenpaare vor dem vorhergesagten Translationsstart des ersten Gens des *apc-bal* Operons (*apcA*). Der umfangreiche 5'-UTR und die vorhergesagte Sekundärstruktur mit einer berechneten minimalen freien Energie (MFE) von  $-61,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ , könnten ein Indiz für die Beteiligung dieser RNA-Struktur an der transkriptionellen oder translationellen Regulation sein. Weiterhin wurden zwei potentielle TSP 98 bzw. nur 9 Basenpaare vor dem vorhergesagten Translationsstart des *ebdA* Gens ermittelt. Dagegen blieben erste Versuche zur Bestimmung putativer TSP vor dem Gen *cIA68*, welches wahrscheinlich mit dem *ebd-ped* Operon ko-transkribiert wird, erfolglos (Abb. 7). Allen identifizierten Startpunkten konnten durch den Vergleich mit Konsensussequenzen  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren putative -35 und -10 Regionen zugeordnet werden. Die ermittelten Primer-Extension-Produkte beider Operons zeigten jedoch keine substratspezifische Induktion.

### Einleitung

*Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 ist bis heute eines der wenigen bekannten Bakterien, welches in der Lage ist, die Substrate Ethylbenzol und Acetophenon unter anaeroben Bedingungen zu verstoffwechseln (Rabus und Widdel, 1995; Heider *et al.*, 1999; 2016b; 2016c). Auch aus diesen Grund ist keine weitere Sequenz eines ähnlichen Operons bekannt. Ebenso gibt es kaum Informationen über die Induktionsmechanismen sowie die Transkriptionsstartpunkte (TSP) und Promotorregionen der Operons des anaeroben Ethylbenzol- (*ebd-ped*) und Acetophenonmetabolismus (*apc-bal*, Abb. 7). Jedoch wurden

bereits TSP-Bestimmungen für andere Gene in den nahe verwandten Organismen *Thauera aromatica* und *Azoarcus* sp. CIB erfolgreich durchgeführt. Im Falle von *T. aromatica* ist es gelungen die TSP der Operons des anaeroben Toluolabbaus (*bss* und *bbs*) zu ermitteln (Leuthner *et al.*, 2000; Hermuth *et al.*, 2002). Die TSP und Promotorregionen des am anaeroben Benzoatabbau beteiligten *bzd* Genclusters konnten für den Denitrifizierer *Azoarcus* sp. CIB aufgeklärt werden (Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2008). Zur experimentellen Bestimmung der Promotoren und der 5'-UTR der *ebd-ped* und *apc-bal* Operons von *A. aromaticum* wurden im Rahmen dieser Dissertation erste Primer-Extension-Analysen durchgeführt.



**Abb. 7 Schematische Darstellung und Organisation der Gene des anaeroben Ethylbenzol- und Acetophenonabbaus in *A. aromaticum* Stamm EbN1.**

Modifiziert nach Rabus *et al.*, 2002 und Muhr *et al.*, 2016. Die unterschiedlichen Farben entsprechen den prognostizierten Funktionen der entsprechenden Genprodukte: *rot*: Ethylbenzolabbau, *blau*: Ethylbenzol- und Acetophenonabbau, *grau*: Transposase/Transposase-Fragment, *schwarz*: TCS-Regulationssystem und *weiß*: Protein mit unbekannter Funktion.

## Material & Methoden

### Wachstumsbedingungen

Die anaerobe Kultivierung von *A. aromaticum* Stamm EbN1 erfolgte schüttelnd bei 28°C in gasdicht verschlossenen 0,5 bzw. 1 Liter Serumflaschen. Die Kulturen wurden unter denitrifizierenden Bedingungen in Carbonat-gepufferten Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen angezogen (Rabus und Widdel, 1995; Muhr *et al.*, 2015). Zur Präparation der Gesamt-RNA war es nötig die Kulturen während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>578 nm</sub> von ungefähr 1,0 bis 1,5 zu ernten. Die geernteten Zellen wurden unmittelbar zur Isolierung der Gesamt-RNA eingesetzt.

### Präparation von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte durch verschiedene Methoden in Kooperation mit Lina Clermont (AG Heider). Zum einen wurde die RNA mittels einer modifizierten Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, welche auf einer mehrmaligen heißen Phenol-Extraktion beruht (Aiba *et al.*, 1981; Dissertation B. Leuthner, 1999). Zum anderen wurden RNA-Extraktions Kits verschiedener Hersteller, unter Befolgung der entsprechenden

Herstellerprotokolle, getestet. Hierbei wurden unter anderem die Kits innuPREP RNA Mini (Analytik Jena, Jena) und NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Düren) genutzt, welche auf Spin-Filter-Säulen (innuPREP) bzw. auf einer Kombination aus Silikamembran-Technologie und der Bindung durch chaotrope Salze (NucleoSpin) basieren. Die Reinheit und Konzentration der erhaltenen RNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und Messung am NanoDrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen) ermittelt. Die Gesamt-RNA wurde direkt in Primer-Extension-Analysen eingesetzt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *Analyse von Transkriptionsstartpunkten via Primer Extension*

Zur Ermittlung der mRNA-Startpunkte wurde die isolierte RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Die cDNA Synthese erfolgte nach Protokollangaben durch die *Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase*, eine genetisch modifizierte *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, unter Zugabe des RiboLock RNase Inhibitors (Life Technologies GmbH, Darmstadt). Weiterhin enthielt jeder Reaktionsansatz einen Gen-spezifischen Primer, welcher eine 5'-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-781 aufwies. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von der biomers.net GmbH (Ulm) bezogen und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Im Anschluss an die Termination der cDNA Synthese wurden die Reaktionsansätze (20  $\mu\text{l}$ ) mit 4  $\mu\text{l}$  Stopplösung versetzt (aus *DNA Cycle Sequencing Kit*, Jena Bioscience, Jena), für 5 min bei  $90^{\circ}\text{C}$  denaturiert und bis zur Analyse auf Eis bzw. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Neben jeder cDNA-Synthese wurde eine Sequenzreaktion mit dem gleichen Primer mit Hilfe des *DNA Cycle Sequencing Kit* (Jena Bioscience, Jena) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Als DNA Matrize dienen Plasmidkonstrukte, welche das DNA-Fragment von Interesse enthielten. Die verwendeten Plasmide wurden mittels StarGate<sup>®</sup> Klonierungssystem erstellt (IBA GmbH, Göttingen) und werden in Tabelle 2 näher erläutert.

Die erhaltenen cDNA-Fragmente sowie die entsprechenden Sequenzreaktionen wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen (6% Long Ranger<sup>™</sup> Gellösung, 7 M Harnstoff, 1,2x TBE-Puffer, 41 cm Glasplatten) und nach Herstellerangaben mit dem LI-COR DNA-Sequencer Modell 4000 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der entstehenden Sequenzleiter konnte mit Hilfe der e-Seq<sup>™</sup> Software (LI-COR Biosciences) die Länge des jeweiligen cDNA-Fragmentes ermittelt und daraus das 5'-Ende der mRNA abgeleitet werden.

**Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Primer)** abgeleitet von der Genomsequenz von *A. aromaticum* Stamm EbN1 (integrierte Restriktions-Schnittstellen sind unterstrichen)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
<i>cDNA Synthese und Sequenzierung</i>		
apcA_ext2	GTGTAGTCGT <u>GCGGGGTGGT</u> GTCC	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>apc-bal</i> Operons (+84 nt vom putativen Startcodon des <i>apcA</i> Gens)
apcA_ext3	CGTGAGCGTT <u>GAACTGGACT</u> GC	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>apc-bal</i> Operons (-65 nt vom putativen Startcodon des <i>apcA</i> Gens)
ebdA_ext	CAATTCTGCG <u>GCTTCGGG</u>	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>ebd-ped</i> Operons (+31 nt vom putativen Startcodon des <i>ebdA</i> Gens)
c1A68_ext3	CGCACAGGTC <u>AGCGCGACGC</u> CGA	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>ebd-ped</i> Operons (+20 nt vom putativen Startcodon des <i>c1A68</i> Gens)
c1A68_ext4	GCATCAGTAA <u>CCGCTCTTGC</u> CG	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>ebd-ped</i> Operons (+65 nt vom putativen Startcodon des <i>c1A68</i> Gens)
<i>Plasmidkonstruktion</i>		
apcA_-400bp _for_LguI_2	<u>AAGCTCTTCA</u> ATGGGAATTT AATAAATATT TA	<i>LguI</i> -Restriktions-Schnittstelle, Amplifizierung des 550 bp Fragments für pSeq5' <i>apc</i>
apcA_+150bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> <u>CCCCAGGCGC</u> TTGGCCGCCT CGC	
c1A68_-499bp _for_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> ATGCAGCGTT TGCTCGACCA	<i>LguI</i> -Restriktions-Schnittstelle, Amplifizierung des 2231 bp Fragments für pSeq5' <i>ebd</i>
ebdA_+150bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> <u>CCCTTTAGAA</u> AGCCTGGAAC	

**Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Plasmide**

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pEntry-IBA20	StarGate® Vector, Km <sup>R</sup>	IBA GmbH
pSeq5' <i>apc</i>	Derivat von pEntry-IBA20; trägt 550 bp Fragment der 5' upstream Region des <i>apc-bal</i> Operons (-400 bis +150 nt des <i>apcA</i> Gens), Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSeq5' <i>ebd</i>	Derivat von pEntry-IBA20; trägt 2231 bp Fragment der 5' upstream Region des <i>ebd-ped</i> Operons (-499 nt des <i>c1A68</i> Gens bis +150 nt des <i>ebdA</i> Gens), Km <sup>R</sup>	diese Arbeit

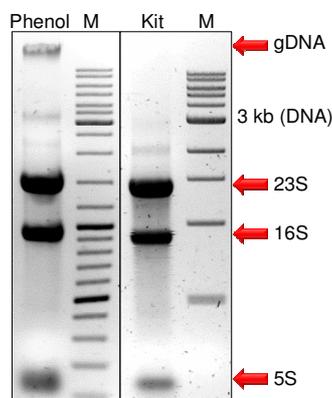
### Bioinformatische Methoden

Sequenzanalysen wurden mit Hilfe der Programme pDRAW32 (ACACLONE Software), DNAMAN (Lynnon Biosoft), e-Seq™ (LI-COR Biosciences) sowie des Online-Werkzeugs MultAlin (Corpet, 1988) ausgewertet. Weiterhin wurden Datenbankvergleiche mit bekannten Sequenzen mittels BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990; *National Center for Biotechnology Information*) durchgeführt. Zur Vorhersage der minimalen freien Energie und Visualisierung der Sekundärstrukturen der 5'-UTR der mRNA-Transkripte wurde der *RNAfold WebServer* (Institut für Theoretische Chemie, Universität Wien; Gruber *et al.*, 2008) verwendet.

## Ergebnisse & Diskussion

### Präparation von Gesamt-RNA aus *A. aromaticum* Stamm EbN1

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden im Rahmen dieser Dissertation verschiedene Methoden auf ihre Effizienz und Eignung für *A. aromaticum* getestet. Hierfür wurde die RNA aus Kulturen präpariert, welche unter denitrifizierenden Bedingungen in Gegenwart der Kohlenwasserstoffe Benzoat, Acetophenon, Ethylbenzol oder Toluol kultiviert wurden. Die Zellernte erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten bei einer  $OD_{578\text{ nm}}$  von mindestens 1,0 bis maximal 2,0. Mit Hilfe der modifizierten Phenol-Extraktions-Methode (Aiba *et al.*, 1981; Leuthner, 1999) konnten deutlich höhere Zellmengen eingesetzt und somit im direkten Vergleich zu allen Kits auch deutlich höhere Mengen an RNA isoliert werden. Die hohe Ausbeute ging in den Versuchen jedoch teilweise zu Lasten der Reinheit der RNA (Abb. 8). Die hier aufgetragene Probe isolierter Gesamt-RNA zeigt Spuren von chromosomaler DNA (gDNA).



### Abb. 8 Übersicht extrahierter Gesamt-RNA aus *A. aromaticum* Stamm EbN1

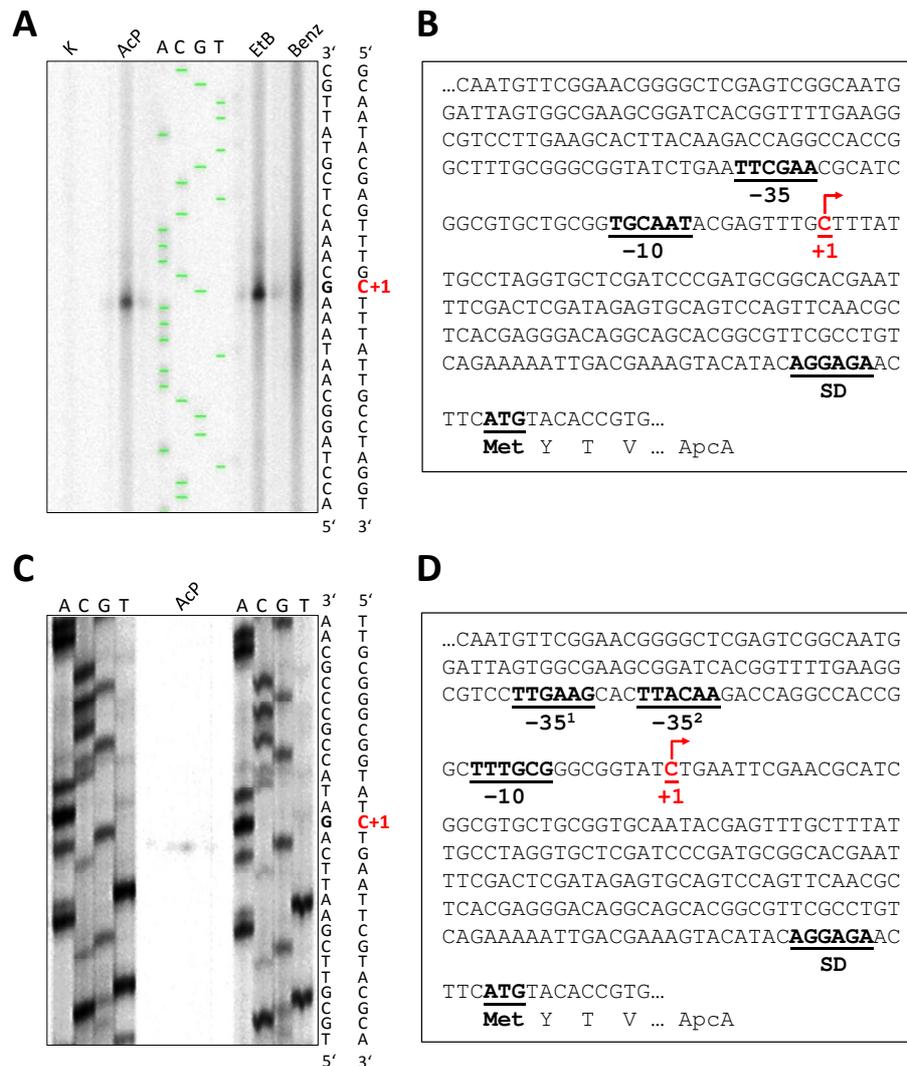
Agarose-Gelelektrophorese (1,5% (w/v)) zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe der heißen Phenol-Extraktion und des RNA-Extraktions Kits (innuPREP RNA Mini, Analytik Jena). Die Zuordnung der RNA/DNA Banden ist auf der rechten Seite ersichtlich. (M) GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) bzw. 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

Durch den Vergleich verschiedener RNA-Extraktions-Kits wurde vorab eine Auswahl getroffen, welches am besten für die Isolierung aus *A. aromaticum* geeignet ist. Für die RNA-Isolierung zeigten vor allem die bereits im Material & Methoden Teil näher erläuterten Kits innuPREP RNA Mini und NucleoSpin RNA (Analytik Jena bzw. Macherey-Nagel) sehr gute Ergebnisse. Trotz der deutlich geringer einzusetzenden Zellmenge und der damit einhergehenden geringeren RNA-Ausbeute gegenüber der klassischen Phenol-Extraktion, wiesen beide Kits reinere RNA-Isolate auf (Abb. 8). Alle Extraktionen zeigten mittels Gelelektrophorese keine Spuren chromosomaler DNA und nur wenige Degradationsprodukte der RNA. Andere getestete Kits weiterer Hersteller waren hingegen weniger nützlich bzw. erwiesen sich als unbrauchbar für *A. aromaticum* und werden daher nicht weiter angeführt. Für erste Transkriptomanalysen von *A. aromaticum* Stamm EbN1 wurde ausschließlich das Macherey-Nagel-Kit genutzt (L. Clermont, persönliche Kommunikation).

#### *Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des 5'-Endes der mRNA vor dem apc-bal Operon*

Zur Bestimmung des transkriptionellen Startpunktes des *apc-bal* Operons aus *A. aromaticum* Stamm EbN1 wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription durch die Anlagerung eines spezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidprimers (5'-DY-781; Tabelle 1) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde Gesamt-RNA beider Isolierungsmethoden als Matrize verwendet. Wie erwartet zeigte die mit Hilfe der Extraktions-Kits präparierte RNA eindeutige Signale gegenüber der mittels heißer Phenol-Extraktion isolierten RNA. Für die Reaktionsansätze mit letztgenannter Gesamt-RNA wurden hingegen zu viele Signale bzw. Primer-Extension-Produkte erhalten (Daten nicht gezeigt), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit durch DNA Kontaminationen begründet sind. In diesem Fall wäre ein zusätzlicher Reinigungsschritt bzw. eine mRNA Anreicherung nötig gewesen. Im Folgenden werden ausschließlich die Primer-Extension-Produkte erläutert, welche mit Hilfe der isolierten RNA der Kits innuPREP RNA Mini und NucleoSpin RNA ermittelt wurden.

Die erhaltenen Primer-Extension-Produkte spiegeln dabei die Länge der mRNAs von den Bindestellen der *apcA*-spezifischen Oligonukleotidprimer (siehe Tabelle 1) bis zu deren 5'-Ende wider. Um die genaue Lage der putativen TSP zu bestimmen, wurden Sequenzreaktionen mit demselben fluoreszenzmarkierten Primer und dem Plasmid pSeq5'*apc* (Tabelle 2), welches die entsprechende Genom-Region enthält, als DNA-Matrize durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden als Größenstandard neben den entsprechenden Primer-Extension-Produkten in einem Sequenziergel aufgetrennt. Unter Verwendung des Primers *apcA\_ext2* wurden zwei potentielle TSP für das *apc-bal* Operon ermittelt (Abb. 9).



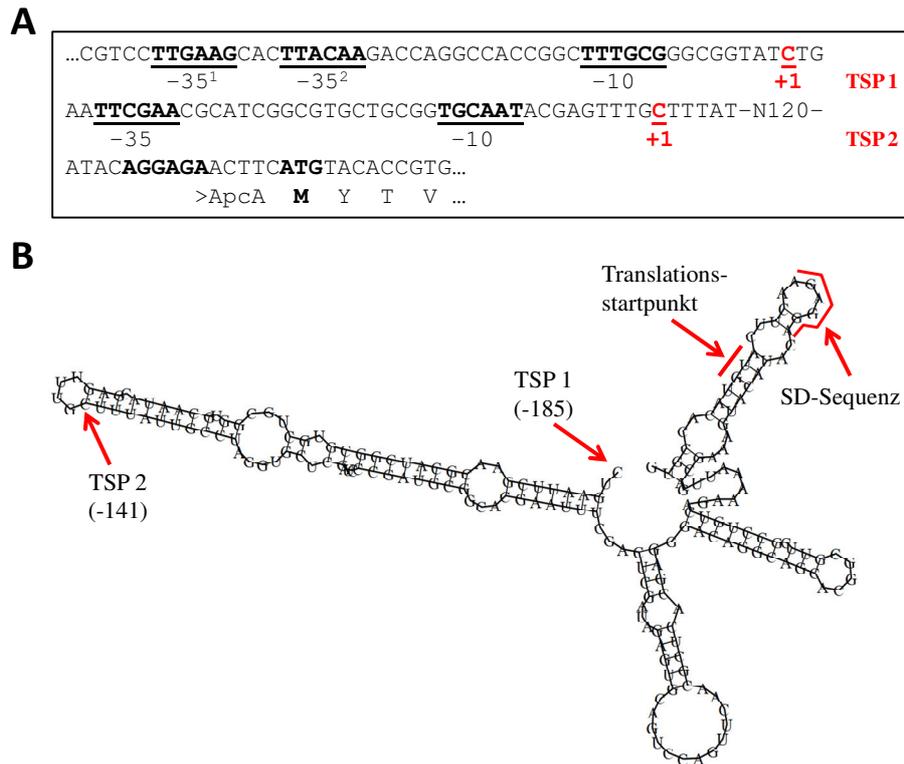
### Abb. 9 Identifizierung zwei putativer transkriptioneller Startpunkte des *apc-bal* Operons

(A) Primer-Extension-Analyse zur Identifikation der potentiellen TSP und Analyse der putativen Promotorregionen des *apc-bal* Operons. Die eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus *A. aromaticum* Stamm EbN1 Kulturen präpariert, welche zuvor unter denitrifizierenden Bedingungen mit Substraten Acetophenon (AcP), Ethylbenzol (EtB) oder Benzoat (Benz) angezogen wurden. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne die Zugabe von RNA (K). Die cDNA Synthese erfolgte unter Zugabe des Primers *apcA\_ext2*, welcher 84 bp downstream vom putativen Startcodon des *apcA* Gens bindet. Die entsprechenden Reaktionsprodukte wurden neben der DNA-Sequenzierungsreaktion mit dem identischen Primer in einem Sequenziergel aufgetrennt. Die erhaltene Sequenzleiter wurde zur besseren Darstellung mit Hilfe des Programmes e-Seq™ zusätzlich grün hervorgeben. Die erhaltene Sequenz ist dargestellt und der ermittelte TSP rot hervorgehoben (+1). (B) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der Promotorregion des *apc-bal* Operons. Der ermittelte Transkriptionsstart (+1) ist mit einem Pfeil markiert und liegt 141 Basenpaare upstream des Translationsstarts des *apcA* Gens. Die potentiellen -35 und -10 Regionen werden durch 18 bp getrennt und sind ebenfalls hervorgehoben. Die Ribosomenbindestelle/ Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) sowie das Translationsstartcodon des *apcA* Gens sind zusätzlich markiert. (C) Die Durchführung dieser Primer-Extension-Analyse erfolgte durch Dr. Ashraf Alhapel (ehemaliger Postdoc der AG Heider). Die eingesetzte RNA wurde aus *A. aromaticum* Stamm EbN1 Kulturen präpariert, welche zuvor unter denitrifizierenden Bedingungen mit Acetophenon (AcP) angezogen wurden. Die erhaltene Sequenz ist dargestellt und der ermittelte TSP rot hervorgehoben (+1). (D) Der hierbei ermittelte Transkriptionsstart (+1) ist in der Nukleotidsequenz mit einem Pfeil markiert und liegt 185 Basenpaare upstream des Translationsstarts des *apcA* Gens. Die zwei potentiellen -35 Regionen und die -10 Region werden durch 24 bp bzw. 15 bp getrennt und sind ebenfalls hervorgehoben.

Die zwei identifizierten, putativen Startpunkte des Transkriptes liegen 141 bp bzw. 185 bp vor dem vorhergesagten Translationsstart des *apcA* Gens, beginnend jeweils mit einem Cytosin (Abb. 9; Durchführung der Experimente zu Abb. 9C erfolgte durch Dr. A. Alhapel, ehemaliger Postdoc der AG Heider). Durch den Vergleich mit Konsensussequenzen  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren (5'-TTGACA-3' und 5'-TATAAT-3') wurden putative -35 und -10 Regionen gefunden (Abb. 9B+D), welche vermutlich dem „Housekeeping“ Sigmafaktor in *A. aromaticum* zuzuordnen sind. Die Induktion der Transkripte konnte jedoch nicht eindeutig dem Acetophenon- bzw. Ethylbenzolmetabolismus zugeordnet werden, da auch Benzoat-gezogene Kulturen die gleichen Primer-Extension-Produkte aufwiesen (Abb. 9A). Jedoch zeigten erste Transkriptomanalysen von *A. aromaticum* eine erhöhte Induktion der Gene des Acetophenon-abhängigen *apc-bal* Operons in Zellen, die auf Ethylbenzol oder Acetophenon kultiviert wurden (L. Clermont und J. Heider, persönliche Kommunikation). Zur Bestätigung der putativen TSP sollte unter identischen Bedingungen ein zweiter Oligonukleotidprimer genutzt werden. Unter Verwendung des Primers *apc\_ext3* wurde im Rahmen dieser Dissertation jedoch ausschließlich ein Schmier und kein eindeutiges Primer-Extension-Signal auf Höhe des TSP bei -141 bp ermittelt (Daten nicht gezeigt). Als weitere Alternativen könnten in Zukunft Primer-Extension-Analysen unter Verwendung einer anderen Reversen Transkriptase durchgeführt oder die Methoden der 5'-RACE-PCR (Zhang und Frohman, 1997) und der S1-Kartierung (*S1 nuclease protection mapping*; Smith, 1993) angewandt werden.

#### *Sekundärstrukturanalyse der 5'-UTR des mRNA-Transkripts des apc-bal Operons*

Ausgehend von den Ergebnissen der Primer-Extension-Analysen wurde mit Hilfe des *RNAfold WebServers* (Gruber *et al.*, 2008) die MFE-Sekundärstruktur des mRNA-Transkripts, beginnend mit dem ermittelten TSP1 (-185) vorhergesagt (Abb. 10). Hierbei wird anhand der gegebenen Nukleotidsequenz die Struktur mit der minimalen freien Energie (MFE) errechnet. Die MFE entspricht dabei der Menge der freien Energie  $\Delta G$ , welche durch die Bildung der Basenpaare freigesetzt wird. Für die vorhergesagte Struktur der 5'-UTR vom potentiellen TSP1 (-185) bis zum zwölften Nukleotid des *apcA* Gens wurde eine MFE von  $-61,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  errechnet. Die vorhergesagte RNA-Sekundärstruktur der umfangreichen 5'-UTR könnte Einfluss auf die Regulation der Transkription oder Translation haben. Diese könnte z. B. eine Bindestelle für Proteine sein, welche die Stabilität der mRNA oder deren Translation beeinflussen. Weiterhin könnte diese 5'-UTR, unabhängig von Proteinen, als Riboswitch wirken und Acetophenon oder andere Metabolite direkt erkennen und durch Bindung eine Konformationsänderung durchführen. Diese Annahme würde jedoch der Regulation durch das Zweikomponentensystem AdiRS widersprechen.



#### Abb. 10 RNA-Sekundärstrukturanalyse der 5'-UTR des *apc-bal* Operons

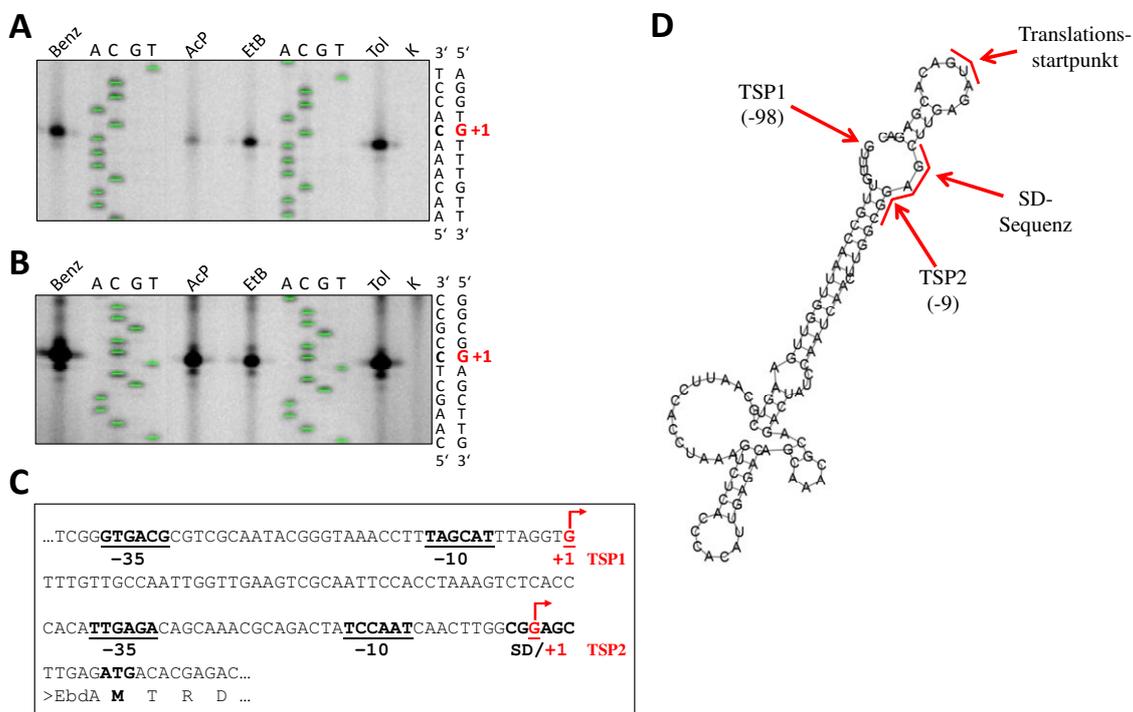
(A) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der 5'-upstream Region des *apc-bal* Operons von *A. aromaticum* Stamm EbN1. Die beiden ermittelten, putativen TSP1/TSP2 (+1 bis -185 bzw. -141 nt), sowie die potentiellen -35 und -10 Regionen sind markiert. Zusätzlich sind die Shine-Dalgarno-Sequenz und der Translationsstart des ersten Gens des *apc-bal* Operons, *apcA* hervorgehoben. (B) Die MFE-Sekundärstruktur des mRNA-Transkripts, beginnend mit dem ermittelten TSP1 (-185), wurde mit Hilfe des *RNAfold WebServers* dargestellt und eine minimale freie Energie von  $-61,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  vorhergesagt.

Wie anhand der vorhergesagten MFE-Sekundärstruktur ersichtlich wird, könnte es sich bei dem ermittelten TSP2 (-141) nur um ein verkürztes Primer-Extension-Produkt des tatsächlichen mRNA-Transkriptes handeln. Zum Beispiel könnte während der Isolierung der mRNA eine endonukleolytische Zersetzung genau an dieser Schleifenposition der Haarnadelstruktur stattgefunden haben. Erste RT-PCRs, mit verschiedenen Primern inner- bzw. außerhalb der putativen mRNA-Transkripte, lieferten bisher kein aussagekräftiges Ergebnis zur Bestätigung oder Widerlegung der ermittelten TSP (L. Clermont, persönliche Kommunikation).

#### *Primer-Extension- und RNA-Sekundärstrukturanalyse der 5'-UTR des ebd-ped Operons*

Die Bestimmung transkriptioneller Startpunkte des *ebd-ped* Operons aus *A. aromaticum* erfolgte analog der vorherigen Beschreibungen für das *apc-bal* Operon. Die Primer-Extension bzw. Sequenz-Reaktionen wurden mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidprimern *ebdA\_ext*, *c1A68\_ext3* und *c1A68\_ext4* (Tabelle 1) und dem Plasmid *pSeq5'ebd* (Tabelle 2), welches die entsprechende Genom-Region enthält, durchgeführt.

Unter Verwendung des Primers *ebdA\_ext* wurden zwei potentielle TSP für das *ebd-ped* Operon ermittelt (Abb. 11), welche es jedoch zu bestätigen gilt. Die zwei putativen Startpunkte liegen 98 bp bzw. 9 bp vor dem vorhergesagten Translationsstart des *ebdA* Gens, beginnend jeweils mit einem Guanin. Der putative TSP2 läge somit unmittelbar vor dem ATG und in der putativen SD-Sequenz (Abb. 11D). Wie bereits für das *apc-bal* Operon wurden auch hier keine substratspezifisch induzierten Primer-Extension-Signale ermittelt. Die Primer-Extension-Produkte gleicher Größe wurden sowohl für Ethylbenzol-gezogene Kulturen als auch für alle anderen getesteten Kulturen detektiert, welche unter denitrifizierenden Bedingungen mit Acetophenon, Benzoat oder Toluol angezogen wurden (Abb. 11A+B).



### Abb. 11 Primer-Extension- und RNA-Sekundärstrukturanalyse der 5'-UTR des *ebdA* Gens

(A+B) Primer-Extension-Analyse zur Identifikation der potentiellen TSP und Analyse der putativen Promotorregionen des *ebd-ped* Operons. Die eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus *A. aromaticum* Stamm EbN1 Kulturen präpariert, welche zuvor unter denitrifizierenden Bedingungen mit Substraten Benzoat (Benz), Acetophenon (AcP), Ethylbenzol (EtB) oder Toluol (Tol) angezogen wurden. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne die Zugabe von RNA (K). Die cDNA Synthese erfolgte unter Zugabe des Primers *ebdA\_ext*, welcher 31 bp downstream vom putativen Startcodon des *ebdA* Gens bindet. Die entsprechenden Reaktionsprodukte wurden neben der DNA-Sequenzierungsreaktion mit dem identischen Primer in einem Sequenziergel aufgetrennt. Die erhaltene Sequenzleiter wurde zur besseren Darstellung mit Hilfe des Programmes e-Seq™ zusätzlich grün hervorgeben. Die erhaltene Sequenz ist dargestellt und die ermittelten TSP rot hervorgehoben (+1). (C) Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der 5'-upstream Region des *ebdA* Gens. Der ermittelte Transkriptionsstart (+1) ist mit einem Pfeil markiert und liegt 98 bzw. nur 9 Basenpaare upstream des vorausgesagten Translationsstarts. Die potentiellen -35 und -10 Regionen werden durch 22 bp bzw. 16 bp getrennt und sind ebenfalls hervorgehoben. Die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) sowie das Translationsstartcodon des *ebdA* Gens sind zusätzlich markiert. (D) Die MFE-Sekundärstruktur des mRNA-Transkripts, beginnend mit dem ermittelten TSP1 98 bp upstream des vorhergesagtem ATG des *ebdA* Gens, wurde mit Hilfe des *RNAfold WebServers* dargestellt und eine minimale freie Energie von  $-26,0 \text{ kcal mol}^{-1}$  vorhergesagt.

Die vorhergesagte MFE-Sekundärstruktur des mRNA-Transkripts, beginnend mit dem ermittelten TSP1 (-98) bis zum zwölften Nukleotid des *ebdA* Gens, ergab eine MFE von  $-26,0 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Abb. 11C). Ausgehend von der vorhergesagten MFE-Sekundärstruktur kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem ermittelten TSP2 (-9) nur um ein verkürztes Primer-Extension-Produkt des tatsächlichen mRNA-Transkriptes handelt. Während der Präparation der Gesamt-RNA könnte eine endonukleolytische Spaltung genau an dieser einzelsträngigen Position der mRNA erfolgt sein.

Betrachtet man das *ebd-ped* Operon (Abb. 7; Rabus *et al.*, 2002), wird angenommen, dass der Startpunkt des mRNA-Transkriptes bereits vor dem Gen *cIA68*, über dessen Funktion noch nichts bekannt ist, liegt. Aus diesem Grund wurden weitere Primer-Extension-Analysen mit den Oligonukleotiden *cIA68\_ext3* und *cIA68\_ext4* (Tabelle 1) durchgeführt. Bis zum Ende dieser Dissertation konnte unter den getesteten Bedingungen jedoch kein TSP ermittelt werden, der stromaufwärts des putativen Gens *cIA48* liegt (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigten erste Transkriptomanalysen eine deutliche Ko-Transkription von *cIA68* mit dem *ebd-ped* Operon in Ethylbenzol-kultivierten Zellen (L. Clermont und J. Heider, persönliche Kommunikation).

Weiterhin wurden bereits fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidprimer erstellt und die benötigten Plasmide konstruiert (siehe Anhang Tabelle 3 und 4), welche für die Analyse der 5'-UTRs der beiden Operons des anaeroben Toluolmetabolismus in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 (*bss* und *bbs* Operon; siehe Einleitung S.12 Abb. 4; Heider *et al.*, 2016a) nötig sind. Da bereits Vorarbeiten in *A. aromaticum* Stamm EbN1 (Kube *et al.*, 2004; RT-PCR Experimente) sowie den orthologen Operons von *T. aromatica* Stamm K172 (Leuthner *et al.*, 2000; Hermuth *et al.*, 2002) und *Azoarcus* sp. Stamm T (Achong *et al.*, 2001) vorhanden sind, können die erhaltenen Daten zusätzlich auf Ähnlichkeiten mit den bereits charakterisierten Promotorregionen analysiert werden.

## Diskussion

Der Modellorganismus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 besitzt die ungewöhnliche Fähigkeit, sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen, eine Vielzahl aromatischer und nicht-aromatischer Verbindungen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verstoffwechseln (Rabus und Widdel, 1995; Rabus und Heider, 1998; Rabus *et al.*, 2005; 2014). Besondere Bedeutung tragen dabei die distinkten und hoch spezifischen anaeroben Stoffwechselwege, die nur in Anwesenheit der jeweiligen Substrate, nicht aber durch chemisch analoge Verbindungen induziert werden (Übersichtsartikel: Boll *et al.*, 2002; Heider *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2016).

Die Schwerpunkte der vorliegenden Dissertation lagen in der weiteren Aufklärung der spezifischen Unterscheidung der sehr ähnlichen Substrate Acetophenon, Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol sowie die Beteiligung der Zweikomponentensysteme (TCS) an der Regulation der Induktion der jeweiligen Abbauwege in *A. aromaticum*. Die im Rahmen dieses Projektes gewonnenen Ergebnisse wurden im Hauptteil dieser Arbeit, der sich aus den zwei Publikationen und zwei Manuskripten zusammensetzt, vorgestellt und diskutiert. Das folgende Kapitel bildet den schließenden Rahmen dieser Dissertation. Die wichtigsten Erkenntnisse und daraus resultierende Fragestellungen werden im Kontext zu postulierten Hypothesen sowie neu veröffentlichten Publikationen (anderer Arbeitsgruppen) erläutert und diskutiert.

### **1. Die distinkten und hoch spezifischen Abbauwege der anaeroben Ethylbenzol- und *p*-Ethylphenolmetabolismen**

Im Gegensatz zu den aeroben Aromaten-abbauenden Bakterien, wurde bereits postuliert, dass die Spezifität der Diskriminierung der vielen unterschiedlichen Substrate im Falle des anaeroben Abbaus deutlich stärker ausgeprägt zu sein scheint (Kühner *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2011; Rabus *et al.*, 2014). *A. aromaticum* Stamm EbN1 ist vermutlich das bis heute am besten charakterisierte denitrifizierende Bakterium, das sowohl Ethylbenzol als auch *p*-Ethylphenol unter anaeroben Bedingungen verstoffwechselt (Rabus und Widdel, 1995; Wöhlbrand *et al.*, 2008). Trotz der starken chemischen Ähnlichkeit dieser aromatischen Verbindungen und der bekannten Kreuzreaktionen einiger katabolischer Enzyme (Kniemeyer und Heider 2001a; 2001b; Knack *et al.*, 2012), werden die zwei Substrate-Paare Ethylbenzol/Acetophenon und *p*-Ethylphenol/*p*-Hydroxyacetophenon über vollständig getrennte Wege metabolisiert (Wöhlbrand *et al.*, 2008; Rabus *et al.*, 2014).

Im Rahmen der Publikation Muhr *et al.* (2015) wurde der anhand proteomischer Analysen postulierte anaerobe Abbauweg von *p*-Ethylphenol bestätigt und einige Lücken geschlossen. Die Initialreaktion wird durch eine *p*-Ethylphenol-Methylhydroxylase (EpMH) katalysiert, welche einen Häm *c* Kofaktor trägt und sich deutlich vom Molybdän-Enzym EbDH unterscheidet, das den anaeroben Abbau von Ethylbenzol einleitet (Kloer *et al.*, 2006; Heider *et al.*, 2016b). Die EpMH hydroxyliert ausschließlich *p*-Ethylphenol und das phenolische Analog 5'-Hydroxyindan. Dagegen wurde keine bzw. nur sehr geringe Aktivität mit Ethylbenzol oder Indan als Substraten nachgewiesen. Die Notwendigkeit einer *p*-Hydroxygruppe der Substrate steht in Einklang mit dem vorhergesagten Reaktionsmechanismus dieser Hydroxylase, bei denen die Reaktion über Chinonmethid- oder -ethid-Intermediate abläuft (Heider und Fuchs, 1997b). Analog zur orthologen EpMH aus *Pseudomonas putida* JD1 postulieren wir, dass die Hydroxylierung von *p*-Ethylphenol zum (*R*)-Isomer des 1-(4-Hydroxyphenyl)ethanols katalysiert wird (Reeve *et al.*, 1990), wenn auch die Enantiospezifität der EpMH aus *A. aromaticum* noch experimentell bewiesen werden muss. Im Gegensatz dazu oxidiert die *p*-Kresol-Methylhydroxylase in einer doppelten Hydroxylierung das initiale Substrat direkt zum 4-Hydroxybenzaldehyd (McIntire *et al.*, 1985; Rudolphi *et al.*, 1991; Carmona *et al.*, 2009).

Die aufgestellte These der Konvertierung zum Alkohol und nicht weiter zum Keton wird gestützt durch die Ko-Induktion von zwei Genen, die im putativen *p*-Ethylphenol-induzierten Operon liegen und für eine (*R*)- und eine (*S*)-spezifische Alkoholdehydrogenase (ADH) kodieren (*chnA* und *ebA309*; Wöhlbrand *et al.*, 2008; Muhr *et al.*, 2015). Die Genprodukte von *chnA* und *ebA309* zeigen Aminosäuresequenzähnlichkeiten von 33 bzw. 36% gegenüber dem (*S*)-spezifischen Isoenzym des zweiten Schritts im anaeroben Ethylbenzolabbau, der (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase (Ped; Kniemeyer und Heider, 2001b; Rabus *et al.*, 2002; Höffken *et al.*, 2006; Wöhlbrand *et al.*, 2008). Sowohl für die EbDH als auch die Ped wurde bereits eine (*S*)-Enantiospezifität nachgewiesen (Kniemeyer und Heider, 2001a; 2001b; Kloer *et al.*, 2006; Höffken *et al.*, 2006). In Gegenwart von *p*-Ethylphenol kultivierte Zellen zeigten Substrat-induzierte Aktivitäten sowohl einer (*R*)- als auch einer (*S*)-spezifischen ADH, welche den rekombinanten, gereinigten Genprodukten von *chnA* und *ebA309* zugeordnet werden konnten. Das ChnA Isoenzym zeigte ausschließlich Aktivität mit (*R*)-1-Phenylethanol, wohingegen das gereinigte Genprodukt von *ebA309* nur (*S*)-1-Phenylethanol umsetzte. Beide Enzyme waren mit dem jeweiligen anderen 1-Phenylethanol-Enantiomer inaktiv. Bestätigt und erweitert wurden diese Erkenntnisse durch die kurz darauf veröffentlichte Studie von Büsing *et al.* (2015a; ChnA wurde in dieser Studie umbenannt in Hped [*1*-(4-hydroxyphenyl)ethanol dehydrogenase]; aus Gründen der Lesbarkeit wird es innerhalb dieser Arbeit aber konsistent als

ChnA bezeichnet). Durch Deletion der Gene *chnA/ebA309*, enzymatische Analysen mit überproduziertem ChnA in *E. coli* Extrakten sowie der Reinigung und Kristallisierung des rekombinanten ChnA, wurde dieses Genprodukt als alleinige (*R*)-spezifische 1-(4-Hydroxyphenyl)ethanol-Dehydrogenase im anaeroben *p*-Ethylphenolabbauweg postuliert. Die Daten zeigten, dass ChnA *p*-Hydroxyacetophenon und Acetophenon (*R*)-spezifisch hydriert, wohingegen für Ped eine (*S*)-spezifische Enantioselektivität bekannt ist (Kniemeyer and Heider, 2001b; Höffken *et al.*, 2006; Büsing *et al.*, 2015a). Dies bestätigt die postulierte Hydroxylierung von *p*-Ethylphenol zum (*R*)-Isomer des 1-(4-Hydroxyphenyl)ethanols. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum zwei Enzyme unterschiedlicher Enantiospezifität vorhanden und im *p*-Ethylphenolmetabolismus induziert zu sein scheinen. Eine mögliche Erklärung läge in der notwendigen Detoxifizierung von überschüssigen, zytoplasmatischen Ketonzwischenprodukten (*p*-Hydroxyacetophenon oder Acetophenon) durch eine zusätzliche, isomere ADH zu (*R*)- oder (*S*)-1-Phenylethanol (Champion *et al.*, 1999; Kniemeyer und Heider 2001b; Höffken *et al.*, 2006; Dudzik *et al.*, 2014). EbA309 könnte ebenso eine andere, noch unbekannt Funktion im weiteren Abbauweg einnehmen.

Zu den identifizierten Enzymen gehörte auch eine neuartige Biotin-abhängige Carboxylase (XccABC; Wöhlbrand *et al.*, 2008), die sich von anderen katabolischen Carboxylasen in *A. aromaticum* wie der Acetophenon-Carboxylase (Apc; Jobst *et al.*, 2010), der Aceton-Carboxylase (Schühle und Heider, 2012) oder der Phenylphosphat-Carboxylase (Schmeling und Fuchs, 2009) unterscheidet. Eine eindeutige, *p*-Ethylphenol-spezifische Produktion der Biotin-enthaltenden Untereinheit (XccB) der putativen *p*-Hydroxyacetophenon-Carboxylase wurde nachgewiesen. Jedoch war die Aktivität einer *p*-Hydroxyacetophenon-abhängigen Carboxylierung nicht mit dem Standard-Enzymtest für die Apc messbar, was darauf schließen lässt, dass eventuell noch unbekannt Supplemente im Reaktionsansatz fehlten oder *p*-Hydroxyacetophenon nicht das korrekte Substrat ist. Weiterhin zeigten die Ergebnisse eine hohe Spezifität der Schlüsselenzyme der peripheren Ethylbenzol- und *p*-Ethylphenol-Stoffwechselwege (*upper pathways*) bis zum Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenabbaus (Übersichtsartikel: Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011). Die Anwesenheit der korrekten Enzyme korrelierte dabei mit dem jeweiligen Abbauweg. Vor allem die EbDH, welche den initialen Schritt des Ethylbenzolmetabolismus katalysiert, und die Apc waren ausschließlich in Ethylbenzol- (EbDH) bzw. Ethylbenzol- und Acetophenon-abbauenden Zellen (Apc) stark induziert. Die erhaltenen Ergebnisse standen in Einklang mit den vorherigen proteomischen und biochemischen Studien und zeigten die strikt substratabhängige und sequenzielle Regulation dieser Enzyme (Rabus und Heider, 1998; Kniemeyer und Heider, 2001a; Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2014).

## 2. Die substratspezifische Genexpression des katabolen *apc-bal* Operons

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurde bereits gezeigt, dass die katabolen Gene des Acetophenonmetabolismus (*apc-bal* Operon) nur in Zellen induziert sind, die ausschließlich in Gegenwart von Acetophenon oder Ethylbenzol kultiviert werden. In allen vorherigen Regulationsstudien fehlten jedoch genetische Untersuchungen.

Zur Ermittlung und Quantifizierung der Induktion der Genexpression wurden verschiedene Reportergenkonstrukte erstellt. Erste Versuche zur Bestimmung der transkriptionellen bzw. translationellen Regulation des putativen Acetophenon-induzierten *apc-bal* Operons mit dem Reportergen *lacZ* ergaben sowohl heterolog in *E. coli* als auch in *A. aromaticum* keine verlässlichen und ausschließlich sehr geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Level (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden fluoreszierende Reporterstämme von *A. aromaticum* auf der Basis des mCherry-Proteins konstruiert (Muhr *et al.*, 2016). Der *apcA-mCherry* Reporterstamm enthält eine chromosomal integrierte Genfusion des ersten Gens des *apc-bal* Operons mit dem Gen, welches für das fluoreszierende mCherry-Protein kodiert. Das Fusionskonstrukt wurde in das Chromosom von *A. aromaticum* stromaufwärts vom unveränderten *apc-bal* Operon integriert, um zum einen potentielle Effekte durch Mehrfach-Kopien zu vermeiden und zum anderen die physiologischen Eigenschaften des Wirtsstammes möglichst nicht zu verändern.

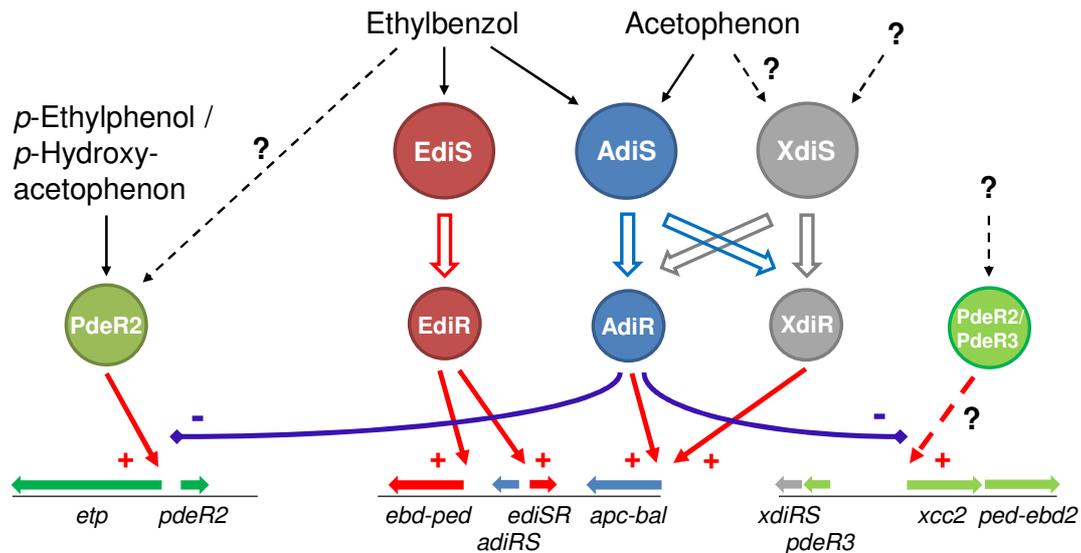
Die erhaltenen Daten zeigen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen eine Korrelation zwischen der Expression des Fusionsgens und der Synthese der Apc, die durch das induzierte *apc-bal* Operon kodiert wird (Rabus *et al.*, 2002; Kühner *et al.*, 2005; Muhr *et al.*, 2015). Weiterhin bestätigten die Ergebnisse, dass die Induktion des *apc-bal* Operons sowohl unter anaeroben als auch aeroben Wachstumsbedingungen stark Acetophenon-spezifisch reguliert wird und somit die Apc auch unter aeroben Bedingungen die Carboxylierungsreaktion katalysiert. Ebenso war die Transkription des mCherry-Fusionsgens spezifisch gegenüber Acetophenon und dessen direkten Vorläufersubstraten (*S*)- und (*R*)-1-Phenylethanol. Eine Induktion durch Zugabe der 1-Phenylethanol-Enantiomere war auch unter aeroben Bedingungen zu erwarten, da das Genom von *A. aromaticum* 32 Gene enthält, die für Alkoholdehydrogenasen (ADH) der SDR-Proteinfamilie kodieren (Rabus *et al.*, 2005). Für einige dieser ADHs ist bereits bekannt, dass sie die Interkonvertierung von Acetophenon und den 1-Phenylethanol-Enantiomeren katalysieren (Kniemeyer und Heider, 2001b; Höffken *et al.*, 2006; Büsing *et al.*, 2015a). Im Gegensatz dazu zeigten andere chemisch analoge Verbindungen keine oder nur deutlich schwächere Signale. Interessanterweise wurden schwache, aber signifikante Fluoreszenzsignale in Zellen ermittelt, die den Substraten Ethylbenzol, Propiophenon oder den Isomeren der Fluoroacetophenone ausgesetzt waren. Die

genannten Ketonverbindungen werden durch die gereinigte Apc carboxyliert, aber dienen *A. aromaticum* nicht als Wachstumssubstrate (Jobst *et al.*, 2010; K. Schühle und J. Heider, unpublizierte Daten). Das Ausbleiben der Induktion durch die Substrate Toluol, Styrol oder Phenylacetaldehyd im Vergleich zu der schwach induzierenden Wirkung von Ethylbenzol untermauert einmal mehr die Bedeutung der richtigen Größe und Ausrichtung der Seitenkette einer induzierenden Verbindung sowie die strikt substratabhängige Regulation dieser Enzyme (Rabus und Heider, 1998; Champion *et al.*, 1999; Kühner *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2014).

Um die Regulation der Transkription der Gene während des Abbaus verschiedener Substrate weiter aufzuklären, wurden erste Transkriptomanalysen durchgeführt (L. Clermont und J. Heider, persönliche Kommunikation). Unter denitrifizierenden Bedingungen zeigten nur die Ethylbenzol-kultivierten Zellen im Vergleich mit Acetophenon- und Benzoat-kultivierten Zellen die zu erwartende Induktion des katabolischen *ebd-ped* Operons. Zusätzlich bestätigte eine erhöhte Induktion der Gene des Acetophenon-abhängigen *apc-bal* Operons in Zellen, die auf Ethylbenzol oder Acetophenon kultiviert wurden, die postulierte sequenzielle Regulation dieser Enzyme (Kühner *et al.*, 2005).

### **3. Die Rolle der Zweikomponentensysteme AdiRS und XdiRS im komplexen Regulationsnetzwerk der Ethylbenzol- und *p*-Ethylphenolstoffwechsel**

Die bisherigen Ergebnisse belegen die sequenzielle Regulation der Enzyme des Ethylbenzol- bzw. Acetophenonstoffwechsels und die substratspezifische Induktion der entsprechenden katabolen Gene. Unklar ist jedoch, ob und inwieweit das TCS AdiRS darin involviert ist. Nach den derzeitigen Vorstellungen regulieren die Genprodukte des im Ethylbenzol-Gencluster lokalisierten *adiRS* Operons die Acetophenon-abhängige Transkription des katabolen *apc-bal* Operons (*adiRS* = *acetophenone-degradation inducing regulator/sensor*; Rabus *et al.*, 2002; 2014). Die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Daten, in Kombination mit den von L. Clermont durchgeführten Transkriptomanalysen, liefern jedoch neue Erkenntnisse. Der Einfluss des AdiRS-Systems ist weitreichender als bisher angenommen und womöglich ist ein zusätzliches TCS XdiRS an der transkriptionellen Regulation der katabolischen Acetophenon-Gene beteiligt. Das in Abb. 12 postulierte Modell zeigt die potentiellen Funktionen von AdiRS und XdiRS im komplexen Regulationsnetzwerk des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol (J. Heider, persönliche Kommunikation), dessen Herleitung im Folgenden näher erläutert wird.



**Abb. 12 Modell des Regulationsnetzwerks im anaeroben Ethylbenzol- und p-Ethylphenolabbau**

Schematische Darstellung des postulierten regulatorischen Netzwerks, der metabolischen Operons und der verschiedenen regulatorischen Enzyme, die womöglich an der substratspezifischen Induktion des Ethylbenzol- (*ebd*) und Acetophenonmetabolismus (*apc*) sowie des p-Ethylphenolmetabolismus (*etp*) beteiligt sind. Rote Pfeile (+) markieren eine prognostizierte Induktion der Genexpression in Anwesenheit des entsprechenden Substrates. Blaue Pfeile (-) markieren die Repression durch das AdiRS System, wenn Ethylbenzol oder Acetophenon vorliegen. Die potentielle Rolle des paralogen Regulationssystems XdiRS in der Komplementierung der *adiRS* Deletion ist angedeutet.

Die postulierte Funktion des putativen TCS AdiRS (Rabus *et al.*, 2002; 2014), sollte mittels genetischer Manipulation untersucht werden. Im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme führte eine Deletion bzw. Disruption der Gene, die für das TCS AdiRS kodieren, nicht zum Verlust der Fähigkeit des Wachstums mit Acetophenon oder Ethylbenzol. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm wurden für die Deletionsmutante neben leicht verringerten Wachstumsraten auch verringerte spezifische Aktivitäten der Apc ermittelt, wenn diese anaerob mit Ethylbenzol oder Acetophenon kultiviert wurden. Der Phänotyp der *adiRS* Deletionsmutante konnte *in trans* nur teilweise komplementiert werden. Die Ergebnisse bestätigten zum einen die postulierte Aktivatorfunktion von AdiRS, aber zeigten auch die wahrscheinliche Beteiligung eines zweiten, unabhängigen TCS in der Acetophenon-abhängigen Induktion des *apc-bal* Operons auf (Abb. 12; siehe Anhang Abb. 13 Phylogenetischer Stammbaum des Response-Regulators AdiR aus *A. aromaticum*). Das Genom von *A. aromaticum* enthält zwei Gene, die für ein bisher nicht charakterisiertes TCS kodieren, dessen Proteine XdiR und XdiS hohe Aminosäuresequenzähnlichkeiten zu den Proteinen des AdiRS-Systems aufweisen (vollständiges Alignment siehe Ergebniskapitel 3 S.71 Fig. 5). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten von 58,3% für die Response-Regulatoren und 48,7% für die C-terminalen Histidin-Kinase-Domänen der Sensorproteine kann angenommen werden, dass hier eine regulatorische Redundanz vorliegt und dieses TCS das AdiRS-System in der Deletionsmutante teilweise komplementieren könnte.

Zusätzliche Indizien lieferte die Integration des bereits beschriebenen Reportergenkonstruktes *apcA-mCherry* in das Genom der Deletionsmutante. Zur Fluoreszenzentwicklung dieses Reporterstammes waren längere Inkubationszeiten gegenüber dem Reporterstamm mit dem *AdiRS*-System erforderlich. Neben dieser vermeintlich zeitverzögerten Induktion, zeigten Analysen mit dem Reporterstamm  $\Delta*adiRS*$ -CHY ausschließlich eine verringerte und stark variierende Expression des Acetophenon-abhängigen mCherry-Reporters. Diese Ergebnisse korrespondierten mit den ermittelten Enzymaktivitäten, da die Kulturen zur Anreicherung der Enzyme länger mit den entsprechenden Kohlenstoffquellen kultiviert und inkubiert wurden, um eine ausreichende Zellmasse zu erhalten. Aus den Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass die Komplementation, wahrscheinlich durch das *XdiRS*-System, weniger effizient gegenüber dem natürlichen TCS ist. Dies würde wiederum in Einklang stehen mit den vorhandenen Aminosäuresequenzunterschieden der *AdiRS* und *XdiRS* Proteine.

Weitere Gründe, warum *XdiRS* als redundantes TCS in unser Verständnis zum komplexen Regulationsnetzwerk mit einbezogen werden sollte, lieferten die Transkriptomanalysen des Wildtyp-Stammes (L. Clermont und J. Heider, persönliche Kommunikation) sowie die Biotin-Blots der *adiRS* Deletionsmutante. Die Gene *adiRS* und *xdiRS* waren konstitutiv auf einem geringen Niveau exprimiert, wenn EbN1 mit Ethylbenzol kultiviert wurde. Dagegen waren die Gene *ediRS* stark induziert in Ethylbenzol-gezogenen Zellen und nicht nachweisbar, wenn EbN1 mit Acetophenon oder Benzoat kultiviert wurde. Weiterhin zeigten die Analysen Ethylbenzol-kultivierter Wildtyp-Zellen eine geringe Induktion der Gene des *etp* Operons sowie einiger Gene der paralogen *xcc2* und *ped-ebd2* Operons, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zu den *xdiRS* und *pdeR3* Genen liegen (Abb. 12, ausführliche Darstellung im Ergebniskapitel 3 Fig. 1; Rabus *et al.*, 2005; Wöhlbrand *et al.*, 2008; 2009). Zusammen mit der erhöhten Synthese der paralogen Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteine XccB und XccB2 in Ethylbenzol-gezogenen Kulturen der *adiRS* Deletionsmutante, deutet dies eine mögliche Doppelfunktion des *AdiRS*-Systems an. Neben der Acetophenon-spezifischen Induktion des *apc-bal* Operons, reprimiert das TCS womöglich auch Gene des *etp* Operons bzw. des paralogen Genclusters in Ethylbenzol-abbauenden Zellen (Abb. 12). Diese Effekte waren vermutlich zu schwach, um mittels Proteomanalyse detektiert werden zu können (Kühner *et al.*, 2005; Wöhlbrand *et al.*, 2007; 2008; 2009; Rabus *et al.*, 2014), aber zeigen eine mögliche Kreuzreaktion der Regulationssysteme der Ethylbenzol-, Acetophenon- und *p*-Ethylphenol-metabolismen auf. In diesem Zusammenhang ist auch bemerkenswert, dass für das gereinigte Sensorprotein *AdiS* bereits eine spezifische Bindung von ATP, Acetophenon, aber auch Ethylbenzol nachgewiesen wurde (Bachelorarbeit T. Kraushaar, 2010). Ein weiterer Beleg für mögliche Kreuzreaktionen war die Anwesenheit von geringen Mengen an immunreaktiven

Apc-Untereinheiten in *p*-Ethylphenol-abbauenden Zellen, die eine geringe Induktion des *apc-bal* Operons im *p*-Ethylphenolmetabolismus andeuten (Muhr *et al.*, 2015).

Aufgrund der hohen chemischen Ähnlichkeit von Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol bietet der beobachtete Phänotyp der *adiRS* Deletionsmutante aber auch Raum für Spekulationen, dass der Ethylbenzolabbau zumindest teilweise über den postulierten *p*-Ethylphenolabbauweg erfolgen könnte (Abb. 12; Wöhlbrand *et al.*, 2008; Muhr *et al.*, 2015). Das Indiz hierfür war die Induktion des Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteins XccB, als Teil der putativen *p*-Hydroxyacetophenon-Carboxylase des *p*-Ethylphenolmetabolismus, in Ethylbenzol-kultivierten Zellen des Deletionsstammes. Umgekehrt ist bekannt, dass die Umsetzung von *p*-Ethylphenol mit sehr hohen Aktivitäten von den initialen Enzymen des anaeroben Ethylbenzolabbauwegs katalysiert wird (Kniemeyer und Heider, 2001a; 2001b; Knack *et al.*, 2012).

#### 4. Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Arbeit, in Kombination mit den ersten Transkriptomanalysen des Wildtyp-Stammes EbN1 (L. Clermont und J. Heider, persönliche Kommunikation) und den *in vitro* Analysen von AdiS (Bachelorarbeit T. Kraushaar, 2010), ermöglichen neue Einblicke in das komplexe Regulationsnetzwerk des Ethylbenzol- und *p*-Ethylphenolmetabolismus im Modellorganismus *A. aromaticum* Stamm EbN1. Redundante regulatorische Systeme sind in Bakterien weit verbreitet. Das bekannteste Beispiel ist das TCS NarXL und NarQP, welches die Induktion der Nitrat-Atmung in *E. coli* reguliert (Noriega *et al.*, 2010). Ein anderes außergewöhnliches, nicht-redundantes Regulationssystem ist das publizierte „Vier-Komponentensystem“ RedCDEF in *Myxococcus xanthus* (Jagadeesan *et al.*, 2009). In dieser Studie wird ein komplexer Regulationsmechanismus postuliert, welcher eine membran-gebundene Histidinkinase, ein Histidin-Kinase-ähnliches Protein und zwei Response-Regulatoren einschließt. Gegebenenfalls lässt sich hieraus eine ähnliche Phosphorylierungskaskade für die TCS EdiRS-AdiRS, EdiRS-XdiRS oder AdiRS-XdiRS ableiten.

Da das in dieser Dissertation vorgeschlagene Regulationswerk und im speziellen die Funktionen der bisher noch nicht charakterisierten regulatorischen Proteine XdiRS oder PdeR3 überwiegend auf Hypothesen basieren, ergeben sich hieraus ein Menge experimenteller Ansätze. Zur Identifizierung der tatsächlich involvierten, regulatorischen Proteine und deren Zusammenwirken sollten in erster Linie weitere Einzel-, Doppel- bzw. Mehrfach-Deletionsmutanten der wahrscheinlichsten regulatorischen Gene konstruiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch erwogen werden, schnellere und vermutlich effektivere Systeme zur Entfernung bzw. zum Einfügen von Genen zu testen, wie z. B. das Flp-FRT-System

(Schweizer, 2003), das Cre-Lox-System (Marx und Lidstrom, 2002) oder das CRISPR-Cas-System (Charpentier und Doudna, 2013), um die genetische Zugänglichkeit von *A. aromaticum* zu verbessern.

Neben den Deletionspaaren *adiRS-ediRS* bzw. *adiRS-xdiRS* sollte auch das Gen *pdeR2*, das für einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen XylR-Typ Transkriptionsregulator kodiert (Rabus *et al.*, 2005; Wöhlbrand *et al.*, 2008), eine wichtige Rolle einnehmen. Neueste Erkenntnisse zu einer *pdeR2*-Disruptionsmutante (L. Clermont, persönliche Kommunikation) sowie einer publizierten Deletionsmutante (Büsing *et al.*, 2015; in dieser Studie in EtpR umbenannt) zeigten, dass PdeR2 an der Expression der Gene des anaeroben *p*-Ethylphenol- bzw. *p*-Hydroxyacetophenonmetabolismus beteiligt ist. Im weiteren Verlauf sollten Veränderungen des globalen Transkriptionsmusters durch die deletierten Regulationssysteme, beginnend mit der vorhandenen *adiRS* Deletionsmutante, mit Hilfe von RNA-Seq-Analysen ermittelt werden.

*Last but not least* sollten die Proteine der TCS AdiRS, XdiRS und EdiRS gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden mit Hilfe einer modifizierten Methode zur Löslichkeitserhöhung nach Park *et al.* (2008), welche bereits bei der Reinigung der Sensor kinase AdiS angewendet wurde (Bachelorarbeit T. Kraushaar, 2010), die drei Response-Regulatoren AdiR, EdiR und auch TdiR in geringen Mengen synthetisiert und gereinigt (siehe Anhang Abb. 14). Da es jedoch nicht gelungen ist, spezifische DNA-Bindungen an den vorausgesagten 5'-UTR der entsprechenden katabolen Operons nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit nicht weiter auf dieses Thema eingegangen. Nichtsdestotrotz bietet dieses Feld und insbesondere der direkte Vergleich der paralogen Proteine der AdiRS und XdiRS Systeme großes Potential um zum Verständnis dieses regulatorischen Netzwerkes beizutragen. Zur Untersuchung der Proteine und der möglichen Interaktionen dieser sollten Substrat- bzw. Autophosphorylierungen sowie Phosphat-Transfer-Experimente durchgeführt werden. Des Weiteren wären v. a. Mutagenesen oder der Austausch einzelner Domänen (*Domain swapping*) der Regulator- und Sensorproteine untereinander sehr interessant, um z. B. das Substratspektrum bzw. -spezifitäten zu modifizieren. Die Kombination dieser Erkenntnisse mit den gewonnenen Erfahrungen des konstruierten Acetophenon-Bioreporters könnte eine Grundlage für die Entwicklung spezifischer Biosensoren zur Erfassung aromatischer Verbindungen darstellen (Mahr und Frunzke, 2013; 2016; Frunzke 2016). Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Biosensoren würden von der toxikologischen Umweltüberwachung bis hin zur Erdölsuche reichen und könnten im Licht der Rohstoffknappheit und zunehmender Umweltverschmutzung von unschätzbarem Wert sein.

## Literaturverzeichnis

- Achong GR, Rodriguez AM, Spormann AM (2001) Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J Bacteriol* 183:6763-6770 doi: 10.1128/JB.183.23.6763-6770.2001
- Aiba H, Adhya S, de Crombrughe B (1981) Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 256:11905-11910
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410 doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alvarez AF, Barba-Ostria C, Silva-Jiménez H, Georgellis D (2016) Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life. *Environ Microbiol* [Epub ahead of print] doi: 10.1111/1462-2920.13397
- Anders HJ, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W, Fuchs G (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonas strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 45:327-333
- Ball HA, Johnson HA, Reinhard M, Spormann AM (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J Bacteriol* 178:5755-5761
- Barragán MJL, Blázquez B, Zamarro MT, Mancheño JM, García JL *et al.* (2005) BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J Biol Chem* 280:10683-10694 doi: 10.1074/jbc.M412259200
- Barrios H, Valderrama B, Morett E (1999) Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 27:4305-4313 doi: 10.1093/nar/27.22.4305
- Beller HR, Spormann AM (1998) Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *J Bacteriol* 180:5454-5457
- Beller HR, Spormann AM (1999) Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiol Lett* 178:147-153 doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13771.x
- Bernhardt R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 124:128-145 doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.026
- Biegert T, Fuchs G, Heider J (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem* 238:661-668
- Boll M, Fuchs G, Heider J (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol* 6:604-611 doi: 10.1016/S1367-5931(02)00375-7
- Boll M, Heider J (2010) Anaerobic Degradation of Hydrocarbons: Mechanisms of C–H-Bond Activation in the Absence of Oxygen, in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed Timmis KN (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg) 1011-1024
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 doi: 10.1006/abio.1976.9999

- Büsing I, Höffken HW, Breuer M, Wöhlbrand L, Hauer B, Rabus R (2015a) Molecular genetic and crystal structural analysis of 1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol dehydrogenase from '*Aromatoleum aromaticum*' EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* 25:327–339 doi: 10.1159/000439113
- Büsing I, Kant M, Dörries M, Wöhlbrand L, Rabus R (2015b) The predicted  $\sigma^{54}$ -dependent regulator EtpR is essential for expression of genes for anaerobic *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone degradation in "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1. *BMC Microbiol* 15:251 doi: 10.1186/s12866-015-0571-9
- Carmona M, Zamarro MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF *et al.* (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:71-133 doi: 10.1128/MMBR.00021-08
- Champion KM, Zengler K, Rabus R (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:157-164
- Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134:1141-1156
- Charpentier E, Doudna JA (2013) Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature* 495:50-51 doi: 10.1038/495050a
- Cheung J, Hendrickson WA (2010) Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol* 13:116-123 doi: 10.1016/j.mib.2010.01.016
- Clugston M, Flemming R (2000) *Advanced Chemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Coschigano PW, Young LY (1997) Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl Environ Microbiol* 63:652-660
- Cripps RE (1975) The microbial metabolism of acetophenone. Metabolism of acetophenone and some chloroacetophenones by an *Arthrobacter* species. *Biochem J* 152:233-241 doi: 10.1042/bj1520233
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16:10881-10890 doi: 10.1093/nar/16.22.10881
- Decker K (1959) *Die aktivierte Essigsäure. Das Coenzym A und seine Acylderivate im Stoffwechsel der Zelle*. Enke Verlag, Stuttgart
- Dehio C, Meyer M (1997) Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:538-540
- Dudzik A, Snoch W, Borowiecki P, Opalinska-Piskorz J, Witko M *et al.* (2014) Asymmetric reduction of ketones and  $\beta$ -keto esters by (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase from denitrifying bacterium *Aromatoleum aromaticum*. *Appl Microbiol Biotechnol* doi: 10.1007/s00253-014-6309-z
- Durante-Rodríguez G, Zamarro MT, García JL, Díaz E, Carmona M (2008) New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB. *Microbiology* 154:306-316 doi: 10.1099/mic.0.2007/011361-0
- Ebenau-Jehle C, Thomas M, Scharf G, Kockelkorn D, Knapp B *et al.* (2012) Anaerobic metabolism of indoleacetate. *J Bacteriol* 194:2894-2903 doi: 10.1128/JB.00250-12

- Ehrenreich P, Behrends A, Harder J, Widdel F (2000) Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 173:58-64 doi 10.1007/s002030050008
- Fedorov AY, Volchenko E, Krest'yaninov VY, Korzhenevich V (1993) Biodegradation of acetophenone by soil bacteria. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 29:218-222
- Filipovic D, Paulsen MD, Loida PJ, Sligar SG, Ornstein RL (1992) Ethylbenzene hydroxylation by cytochrome P450cam. *Biochem Biophys Res Commun* 189:488-495 doi: 10.1016/0006-291X(92)91584-D
- Frunzke J (2016) Biosensoren: Die Sensorik der Zelle für die Biotechnologie nutzen. *BIOspektrum* 3:247-250 doi: 10.1007/s12268-016-0680-5
- Fuchs G (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Fuchs G, Boll M, Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 9:803-816 doi: 10.1038/nrmicro2652
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurell JGR (1997) Immunoblotting and immunodetection. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al.* (eds) *Current protocols in molecular biology*, New York: Wiley, pp 10.8.1–10.8.21
- Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63:133-154 doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR *et al.* (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, in *The Proteomics Protocols Handbook*, ed Walker JM (Totowa, N.J. USA: Humana Press Inc) 571-607
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL (2008) The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res* 36(Web Server issue):W70-W74 doi:10.1093/nar/gkn188
- Grundmann O, Behrends A, Rabus R, Amann J, Halder T, Heider J, Widdel F (2008) Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of *n*-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environ Microbiol* 10:376-385 doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01458.x
- Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, Jenner PM, Jones WI *et al.* (1967) Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol* 5:141-157
- Hage A, Schoemaker HE, Wever R, Zennaro E, Heipieper HJ (2001) Determination of the toxicity of several aromatic carbonylic compounds and their reduced derivatives on *Phanerochaete chrysosporium* using a *Pseudomonas putida* test system. *Biotechnol Bioeng* 73:69-73
- Harwood CS, Burchhardt G, Herrmann H, Fuchs G (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22:439-458 doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00380.x
- Havel J, Reineke W (1993) Microbial degradation of chlorinated acetophenones. *Appl Environ Microbiol* 59:2706-2712
- Heider J (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 11:188-194 doi: 10.1016/j.cbpa.2007.02.027
- Heider J (2008) Anaerober Kohlenwasserstoff-Abbau: Es geht auch ohne Sauerstoff. *BIOspektrum* 1:28-31
- Heider J, Boll M, Breese K, Breinig S, Ebenau-Jehle C *et al.* (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol* 170:120-131

- Heider J, Fuchs G (1997a) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* 243:577-596 doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00577.x
- Heider J, Fuchs G (1997b) Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe* 3:1-22 doi: 10.1006/anae.1997.0073
- Heider J, Schühle K, Frey J, Schink B (2016c) Activation of acetone and other simple ketones in anaerobic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26:152-164 doi: 10.1159/000441500
- Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 22:459-473 doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00381.x
- Heider J, Szaleniec M, Martins BM, Seyhan D, Buckel W, Golding BT (2016a) Structure and function of benzylsuccinate synthase and related fumarate-adding glycy radical enzymes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26:29-44 doi: 10.1159/000441656
- Heider J, Szaleniec M, Sünwoldt K, Boll M (2016b) Ethylbenzene dehydrogenase and related molybdenum enzymes involved in oxygen-independent alkyl chain hydroxylation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26:45-62 doi: 10.1159/000441357
- Henry JT, Crosson S (2011) Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol* 65:261-286 doi: 10.1146/annurev-micro-121809-151631
- Hermuth K, Leuthner B, Heider J (2002) Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Arch Microbiol* 177:132-138 doi: 10.1007/s00203-001-0375-1
- Höffken HW, Duong M, Friedrich T, Breuer M, Hauer B *et al.* (2006) Crystal structure and enzyme kinetics of the (*S*)-specific 1-phenylethanol dehydrogenase of the denitrifying bacterium strain EbN1. *Biochemistry* 45:82-93 doi: 10.1021/bi051596b
- Hufnagel P, Rabus R (2006) Mass spectrometric identification of proteins in complex post-genomic projects. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11:53-81 doi: 10.1159/000092819
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28 doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P
- Jagadeesan S, Mann P, Schink CW, Higgs PI (2009) A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* 284:21435-21445 doi: 10.1074/jbc.M109.033415
- Jobst B, Schühle K, Linne U, Heider J (2010) ATP-dependent carboxylation of acetophenone by a novel type of carboxylase. *J Bacteriol* 192:1387-1394 doi: 10.1128/JB.01423-09
- Johnson HA, Pelletier DA, Spormann AM (2001) Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol* 183:4536-4542 doi: 10.1128/JB.183.15.4536-4542.2001
- Johnson HA, Spormann AM (1999) *In vitro* studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *J Bacteriol* 181:5662-5668
- Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ (1994) 4-Ethylphenol metabolism by *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 60:1978-1983
- Jung A, Eisheuer S, Cserti E, Leicht O, Strobel W *et al.* (2014) Molecular toolbox for genetic manipulation of the stalked budding bacterium *Hyphomonas neptunium*. *Appl Environ Microbiol* 81:736-744 doi: 10.1128/AEM.03104-14
- Kamerbeek NM, Olsthoorn AJJ, Fraaije MW, Janssen DB (2003) Substrate specificity and enantioselectivity of 4-hydroxyacetophenone monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 69:419-426 doi: 10.1128/AEM.69.1.419-426.2003

- Kamps A, Achebach S., Fedzke I, Unden G, Götz F (2004) Staphylococcal NreB: an O<sub>2</sub>-sensing histidine protein kinase with an O<sub>2</sub>-labile iron-sulfur cluster of the FNR type. *Mol Microbiol* 52:713-723 doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04024.x
- Kloer DP, Hagel C, Heider J, Schulz GE (2006) Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure* 14:1377-1388 doi: 10.1016/j.str.2006.07.001
- Knack D, Hagel C, Szaleniec M, Dudzik A, Salwinski A, Heider J (2012) Substrate and inhibitor spectrum of ethylbenzene dehydrogenase: perspectives on application potential and catalytic mechanism. *Appl Environ Microbiol* 78:6475-6482 doi: 10.1128/AEM.01551-12
- Kniemeyer O, Fischer T, Wilkes H, Glöckner F, Widdel F (2003) Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 69:760-768 doi: 10.1128/AEM.69.2.760-768.2003
- Kniemeyer O, Heider J (2001a) Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J Biol Chem* 276:21381-21386 doi: 10.1074/jbc.M101679200
- Kniemeyer O, Heider J (2001b) (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch Microbiol* 176:129-135 doi: 10.1007/s002030100303
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD *et al.* (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202-1211
- Kraushaar T (2010) *Die Sensorkinase AdiS des anaeroben Acetophenonabbaus bei Aromatoleum aromaticum Stamm EbN1*. Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg
- Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni M-E, Ramos JL (2010) Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annu Rev Microbiol* 64:539-559 doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134054
- Kube M, Heider J, Amann J, Hufnagel P, Kühner S *et al.* (2004) Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 181:182-194 doi: 10.1007/s00203-003-0627-3
- Kühner S, Wöhlbrand L, Fritz I, Wruck W, Hultschig C *et al.* (2005) Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *J Bacteriol* 187:1493-1503 doi: 10.1128/JB.187.4.1493-1503.2005
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee Y-W, Jin S, Sim W-S, Nester EW (1995) Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12245-12249
- Leuthner B (1999) *Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Toluol in dem denitrifizierenden Bakterium Thauera aromatica*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Leuthner B, Heider J (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiol Lett* 166:35-41 doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13180.x

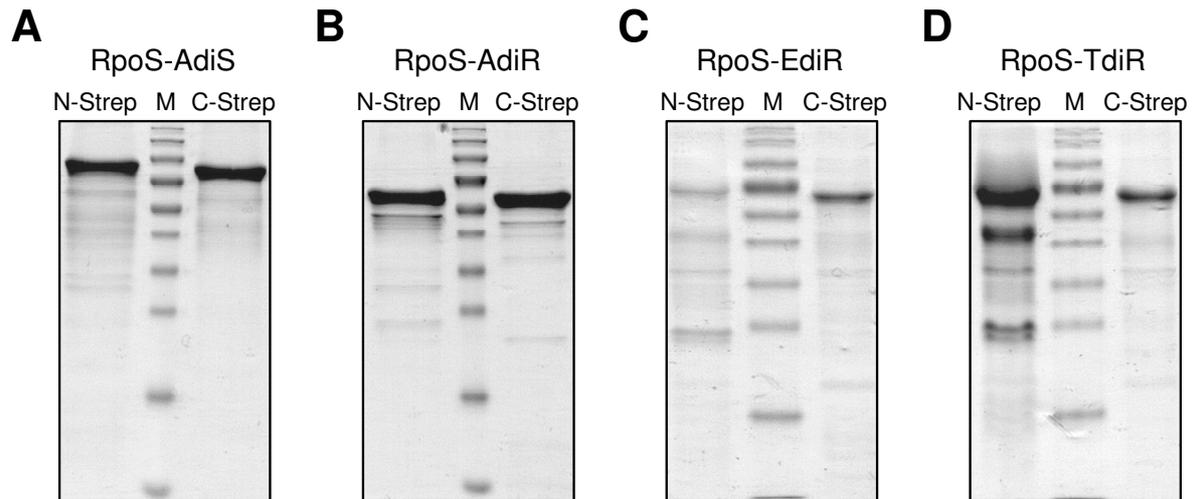
- Leuthner B, Heider J (2000) Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J Bacteriol* 182: 272–277 doi: 10.1128/JB.182.2.272-277.2000
- Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, Hörth P, Haehnel W *et al.* (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glyceryl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* 28:615–628 doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00826.x
- Leutwein C, Heider J (1999) Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (*R*)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology* 145:3265–3271 doi: 10.1099/00221287-145-11-3265
- Lovley DR (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *J Ind Microbiol Biot* 18:75–81 doi: 10.1038/sj.jim.2900246
- Mahr R, Frunzke J (2013) Biosensoren: Transkriptionsregulatoren im Dienste der Biotechnologie. *BIOspektrum* 19:739–741 doi: 10.1007/s12268-013-0385-y
- Mahr R, Frunzke J (2016) Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:79–90 doi: 10.1007/s00253-015-7090-3
- Marx CJ, Lidstrom ME (2002) Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques* 33:1062–1067
- McIntire W, Hopper DJ, Craig JC, Everhart ET, Webster RV *et al.* (1984) Stereochemistry of 1-(4'-hydroxyphenyl)ethanol produced by hydroxylation of 4-ethylphenol by *p*-cresol methylhydroxylase. *Biochem J* 224:617–621
- McIntire W, Hopper DJ, Singer TP (1985) *p*-Cresol methylhydroxylase. Assay and general properties. *Biochem J* 228:325–335 doi: 10.1042/bj2280325
- Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS *et al.* (2007) Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4:555–557 doi: 10.1038/nmeth1062
- Muhr E, Leicht O, González Sierra S, Thanbichler M, Heider J (2016) A fluorescent bioreporter for acetophenone and 1-phenylethanol derived from a specifically induced catabolic operon. *Front Microbiol* 6:1561. doi: 10.3389/fmicb.2015.01561
- Muhr E, Schühle K, Clermont L, Sünwoldt K, Kleinsorge D *et al.* (2015) Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in '*Aromatoleum aromaticum*': differentiation and differential induction. *Arch Microbiol* doi: 10.1007/s00203-015-1142-z
- Nies J (2015) *Die Beteiligung von BssF am Aufbau mikrokompartmentartiger Strukturen im anaeroben Toluolstoffwechsel denitrifizierender Proteobakterien und Mutagenese der Ethylbenzol Dehydrogenase aus Aromatoleum aromaticum EbN1*. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg
- Noriega CE, Lin H-Y, Chen L-L, Williams SB, Stewart V (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 75:394–412 doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06987.x
- Olajos EJ, Salem H (2001) Riot control agents: pharmacology, toxicology, biochemistry and chemistry. *J Appl Toxicol* 21:355–391 doi: 10.1002/jat.767
- Park J-S, Han K-Y, Lee J-H, Song J-A, Ahn K-Y *et al.* (2008) Solubility enhancement of aggregation-prone heterologous proteins by fusion expression using stress-responsive *Escherichia coli* protein, RpoS. *BMC Biotechnol* 8:15 doi: 10.1186/1472-6750-8-15

- Pérez-Martín J, Lorenzo VD (1995) The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9392-9396 doi: 10.1073/pnas.92.20.9392
- Piatkevich KD, Verkhusha VV (2011) Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods Cell Biol* 102:431-461 doi: 10.1016/b978-0-12-374912-3.00017-1
- Rabus R (2005) Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:580-587 doi: 10.1007/s00253-005-0030-x
- Rabus R, Boll M, Heider J, Meckenstock RU, Buckel W *et al.* (2016) Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26:5-28 doi: 10.1159/000443997
- Rabus R, Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 170:377-384 doi: 10.1007/s002030050656
- Rabus R, Kube M, Beck A, Widdel F, Reinhardt R (2002) Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 178:506-516 doi: 10.1007/s00203-002-0487-2
- Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K *et al.* (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 183:27-36 doi: 10.1007/s00203-004-0742-9
- Rabus R, Trautwein K, Wöhlbrand L (2014) Towards habitat-oriented systems biology of "Aromatoleum aromaticum" EbN1: chemical sensing, catabolic network modulation and growth control in anaerobic aromatic compound degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:3371-3388 doi: 10.1007/s00253-013-5466-9
- Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163:96-103 doi: 10.1007/BF00381782
- Rabus R, Widdel F (1996) Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl Environ Microbiol* 62:1238-1241
- Reeve CD, Carver MA, Hopper DJ (1989) The purification and characterization of 4-ethylphenol methylenhydroxylase, a flavocytochrome from *Pseudomonas putida* JD1. *Biochem J* 263:431-437
- Reeve CD, Carver MA, Hopper DJ (1990) Stereochemical aspects of the oxidation of 4-ethylphenol by the bacterial enzyme 4-ethylphenol methylenhydroxylase. *Biochem J* 269:815-819 doi: 10.1042/bj2690815
- Robinson JW (1991) *Practical Handbook of Spectroscopy*. Boca Raton, Florida: CRC Press
- Rudolphi A, Tschsch A, Fuchs G (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 155:238-248 doi: 10.1007/BF00252207
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19:

- selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73
- Schmeling S, Fuchs G (2009) Anaerobic metabolism of phenol in proteobacteria and further studies of phenylphosphate carboxylase. *Arch Microbiol* 191:869-878 doi: 10.1007/s00203-009-0519-2
- Schühle K, Gescher J, Feil U, Paul M, Jahn M *et al.* (2003) Benzoate-Coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways. *J Bacteriol* 185:4920-4929 doi: 10.1128/JB.185.16.4920-4929.2003
- Schühle K, Heider J (2012) Acetone and butanone metabolism of the denitrifying bacterium “*Aromatoleum aromaticum*” demonstrates novel biochemical properties of an ATP-dependent aliphatic ketone carboxylase. *J Bacteriol* 194:131-141 doi: 10.1128/JB.05895-11
- Schweizer HP (2003) Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* Flp-FRT system in bacterial genetics. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5:67-77 doi: 10.1159/000069976
- Selmer T, Pierik AJ, Heider J (2005) New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. *Biol Chem* 386:981-988 doi: 10.1515/BC.2005.114
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22:1567-1572 doi: 10.1038/nbt1037
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2:905-909 doi: 10.1038/nmeth819
- Smith DR (1993) S1 nuclease protection mapping. *Methods Mol Biol* 18:363-372 doi: 10.1385/0-89603-245-0:363
- Song B, Häggblom MM, Zhou J, Tiedje JM, Palleroni NJ (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 49:1129-1140
- Spormann AM, Widdel F (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11:85-105 doi: 10.1023/A:1011122631799
- Stern JR (1956) Optical properties of acetoacetyl-S-coenzyme A and its metal chelates. *J Biol Chem* 221:33-44
- Szaleniec M, Hagel C, Menke M, Nowak P, Witko M, Heider J (2007) Kinetics and mechanism of oxygen-independent hydrocarbon hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase. *Biochemistry* 46:7637-7646 doi: 10.1021/bi700633c
- Szaleniec M, Jobst B, Heider J (2003) Ethylbenzene dehydrogenase: oxidation of hydrocarbons without oxygen. *Ann Pol Chem Soc* 2:240-245
- Taylor RG, Walker DC, McInnes RR (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21:1677-1678 doi: 10.1093/nar/21.7.1677
- Telford WG, Hawley T, Subach F, Verkhusha V, Hawley RG (2012) Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods* 57:318-330 doi: 10.1016/j.ymeth.2012.01.003
- Thanbichler M, Iniesta AA, Shapiro L (2007) A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* 35:e137 doi: 10.1093/nar/gkm818

- Thomas PE, Ryan D, Levin W (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome *P*-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 75:168-176 doi: 10.1016/0003-2697(76)90067-1
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
- Trautwein K, Wilkes H, Rabus R (2012) Proteogenomic evidence for  $\beta$ -oxidation of plant-derived 3-phenylpropanoids in "Aromatoleum aromaticum" EbN1. *Proteomics* 12:1402-1413 doi: 10.1002/pmic.201100279
- Uden G, Nilkens S, Singenstreu M (2013) Bacterial sensor kinases using Fe–S cluster binding PAS or GAF domains for O<sub>2</sub> sensing. *Dalton Transactions* 42:3082-3087 doi: 10.1039/c2dt32089d
- USEPA (1999) *Integrated Risk Information System (IRIS) on Acetophenone*. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington D.C.: U.S. Environmental Protection Agency
- Velázquez F, Parro V, de Lorenzo (2005) Inferring the genetic network of *m*-xylene metabolism through expression profiling of the *xyl* genes of *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Microbiol* 57:1557-1569 doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04787.x
- Wang Z, Song Q, Yu M, Wang Y, Xiong B *et al.* (2014) Characterization of a stereospecific acetoin(diacetyl) reductase from *Rhodococcus erythropolis* WZ010 and its application for the synthesis of (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:641-650 doi: 10.1007/s00253-013-4870-5
- Wöhlbrand L, Kallerhoff B, Lange D, Hufnagel P, Thiermann J *et al.* (2007) Functional proteomic view of metabolic regulation in "Aromatoleum aromaticum" strain EbN1. *Proteomics* 7:2222-2239 doi: 10.1002/pmic.200600987
- Wöhlbrand L, Rabus R (2009) Development of a genetic system for the denitrifying bacterium 'Aromatoleum aromaticum' strain EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17:41-52 doi: 10.1159/000159194
- Wöhlbrand L, Wilkes H, Halder T, Rabus R (2008) Anaerobic degradation of *p*-ethylphenol by "Aromatoleum aromaticum" strain EbN1: pathway, regulation, and involved proteins. *J Bacteriol* 190:5699-5709 doi: 10.1128/JB.00409-08
- Yang Z-H, Zeng R, Chang X, Li X-K, Wang G-H (2008) Toxicity of aromatic ketone to yeast cell and improvement of the asymmetric reduction of aromatic ketone catalyzed by yeast cell with the introduction of resin adsorption. *Food Technol Biotechnol* 46:322-327
- Yu H, Peng Z, Zhan Y, Wang J, Yan Y *et al.* (2011) Novel regulator MphX represses activation of phenol hydroxylase genes caused by a XylR/DmpR-type regulator MphR in *Acinetobacter calcoaceticus*. *PLOS ONE* 6:e17350 doi: 10.1371/journal.pone.0017350
- Ziegler K, Braun K, Böckler A, Fuchs G (1987) Studies on the anaerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch Microbiol* 149:62-69 doi: 10.1007/BF00423138
- Zhang Y, Frohman, MA (1997) Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain full-length cDNAs. *Methods Mol Biol* 69:61-87
- Zhulin IB, Taylor BL, Dixon R (1997) PAS domain S-boxes in *Archaea*, *Bacteria* and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* 22:331-333 doi: 10.1016/S0968-0004(97)01110-9





### Abb. 14 Übersicht der gereinigten RpoS-Fusionsproteine

Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele (13% (w/v)) nach Auftrennung der aus *E. coli* BL21(DE3)GroESL gereinigten RpoS-Fusionsproteine mit N- bzw. C-terminalem Strep-tagII. (M) Proteinstandard mit den Molekularmassen: 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 und 10 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™). (A) <sup>Strep</sup>RpoS-AdiS 85,9 kDa und RpoS-AdiS<sup>Strep</sup> 85,5 kDa. (B) <sup>Strep</sup>RpoS-AdiR 62,7 kDa und RpoS-AdiR<sup>Strep</sup> 62,1 kDa. (C) <sup>Strep</sup>RpoS-EdiR 63,5 kDa und RpoS-EdiR<sup>Strep</sup> 63,0 kDa. (D) <sup>Strep</sup>RpoS-TdiR 64,2 kDa und RpoS-TdiR<sup>Strep</sup> 63,7 kDa. Die Proteinmassen wurden mittels ProtParam des SIB ExpASY Bioinformatics Resources Portals anhand der Aminosäuresequenz inklusive Strep-tagII bestimmt (<http://web.expasy.org/protparam>).

### Tabelle 3 Übersicht der zusätzlichen Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pSeq5' <i>bssD</i>	Derivat von pEntry-IBA20; trägt 604 bp Fragment der 5' upstream Region des <i>bssD</i> Gens (-465 bis +139 nt des <i>bssD</i> Gens), Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSeq5' <i>bssCA</i>	Derivat von pEntry-IBA20; trägt 694 bp Fragment der 5' upstream Region der <i>bssCA</i> Gene (-503 nt des <i>bssC</i> Gens bis +191 nt des <i>bssA</i> Gens), Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSeq5' <i>bssBE</i>	Derivat von pEntry-IBA20; trägt 761 bp Fragment der 5' upstream Region der <i>bssBE</i> Gene (-612 nt des <i>bssB</i> Gens bis +149 nt des <i>bssE</i> Gens), Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSeq5' <i>bbs</i>	Derivat von pEntry-IBA20; trägt 690 bp Fragment der 5' upstream Region des <i>bssD</i> Gens (-515 bis +175 nt des <i>bbsA</i> Gens), Km <sup>R</sup>	diese Arbeit

**Tabelle 4 Übersicht der zusätzlichen Oligonukleotide (Primer)** abgeleitet von der Genomsequenz von *A. aromaticum* Stamm EbN1 (integrierte Restriktions-Schnittstellen sind unterstrichen)

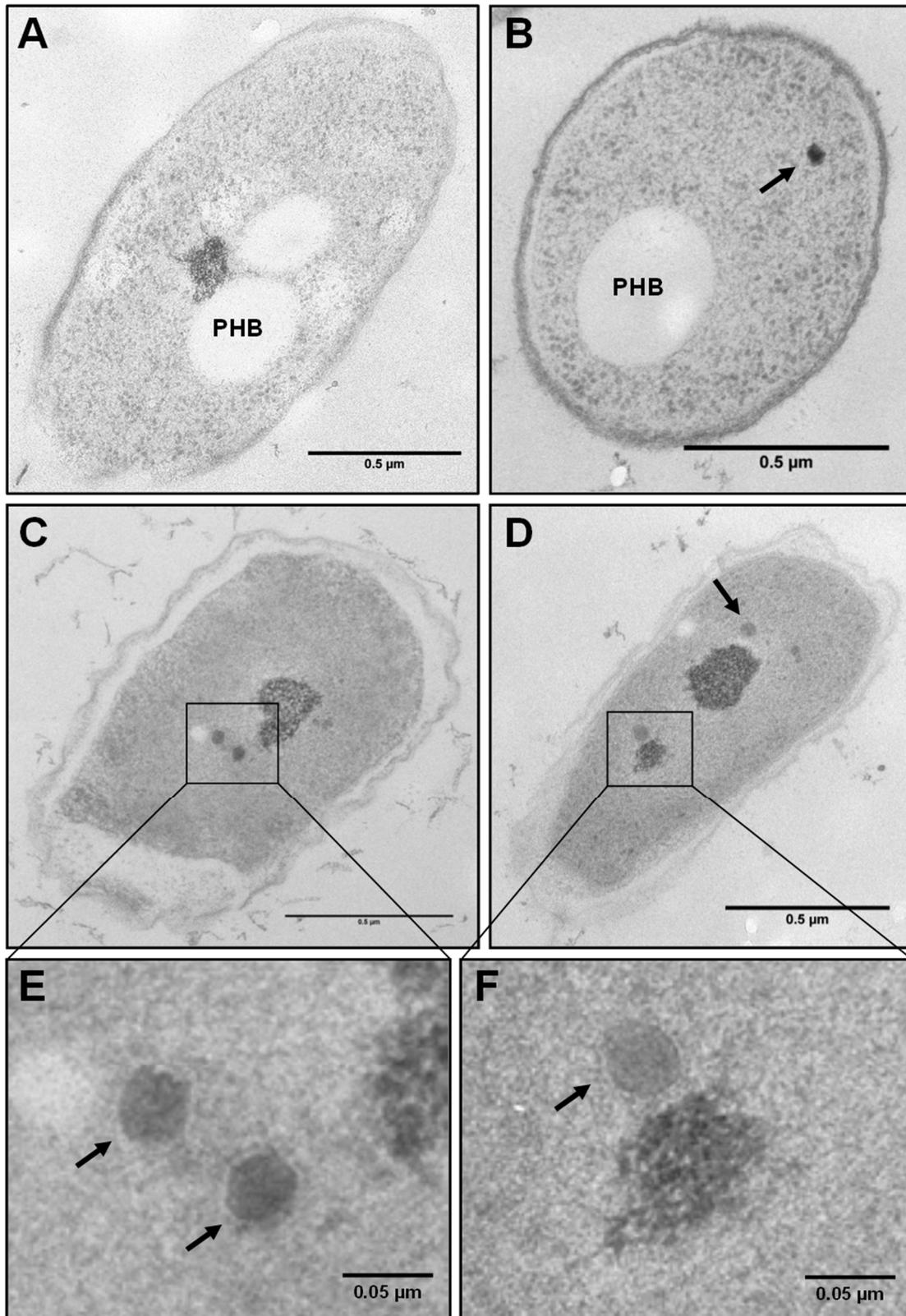
Primer	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
<i>cDNA Synthese und Sequenzierung</i>		
bssD_ext1	GTGACACCAT <u>GGACAGTGCA</u> G	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>bss</i> Operons (+91 nt vom putativen Startcodon des <i>bssD</i> Gens)
bssA_ext1	GCAGTTCGTC <u>AGCCGGGATA</u> TCG	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>bss</i> Operons (+72 nt vom putativen Startcodon des <i>bssA</i> Gens)
bssE_ext1	GCTCAGGGTC <u>TCGGTATTCA</u> G	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>bss</i> Operons (+61 nt vom putativen Startcodon des <i>bssE</i> Gens)
bbsA_ext1	GGTATCCCTT <u>GAGATAGGGC</u> G	5'-Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff DY-781, Primer-Extension-Analyse des <i>bbs</i> Operons (+95 nt vom putativen Startcodon des <i>bbsA</i> Gens)
<i>Plasmidkonstruktion</i>		
tdiS_+116bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> ATGCGGTTGC GCAAATG	<i>LguI</i> -Restriktions-Schnittstelle, Amplifizierung des 604 bp Fragments für pSeq5' <i>bssD</i>
bssD_+139bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> <u>CCCTGTCGCG</u> CGTCCTGG	
bssD_+728bp _for_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> ATGTCTGACTA TCTCGGC	<i>LguI</i> -Restriktions-Schnittstelle, Amplifizierung des 694 bp Fragments für pSeq5' <i>bssCA</i>
bssA_+191bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> <u>CCCTTCTCGC</u> AGAATTCG	
bssA_+2416bp _for_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> ATGAAAGCTG CGCAGCG	<i>LguI</i> -Restriktions-Schnittstelle, Amplifizierung des 761 bp Fragments für pSeq5' <i>bssBE</i>
bssE_+149bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> <u>CCCTGCTTGC</u> CGACGACC	
bbsA_+175bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> <u>CCCAGCAGCT</u> CGGGCACG	<i>LguI</i> -Restriktions-Schnittstelle, Amplifizierung des 690 bp Fragments für pSeq5' <i>bbs</i>
istA_-112bp _rev_LguI	<u>AAGCTCTTCA</u> ATGACCGCCC ATTCCGAC	

## Übersicht über die Experimente zur Entdeckung möglicher neuer Zellkompartimente in *A. aromaticum* Stamm EbN1

Ein Nebenprojekt während der Promotion, und damit nicht Teil der eigentlichen Dissertation, waren die Experimente die zur Entdeckung möglicher neuer Mikrokompartimentartiger Strukturen in *A. aromaticum* Stamm EbN1 und *T. aromatica* Stamm K172 führten. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse kurz dargestellt.

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen der Stämme EbN1 und K172, die in Kooperation mit Dr. Thomas Heimerl (AG Prof. Dr. Maier, Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg) aufgenommen wurden, zeigten elektronendichte und symmetrische Strukturen im Zytoplasma (siehe Einleitungskapitel Abb. 2 und Abb. 15). Diese teils ikosaedrischen Strukturen wiesen einen Durchmesser von ca. 30 bis 50 nm und scheinbar eine dünne Proteinhülle auf und waren hauptsächlich in den Zellen vorhanden, die in Gegenwart von Toluol kultiviert wurden. Allerdings waren die Strukturen auch in einigen Zellen nachweisbar, die Benzoat als einzige Kohlenstoffquelle nutzten (Abb. 15). Keine Strukturen konnten hingegen in Acetophenon-, Ethylbenzol-, *p*-Ethylphenol- oder Phenol-abbauenden Zellen von *A. aromaticum* ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

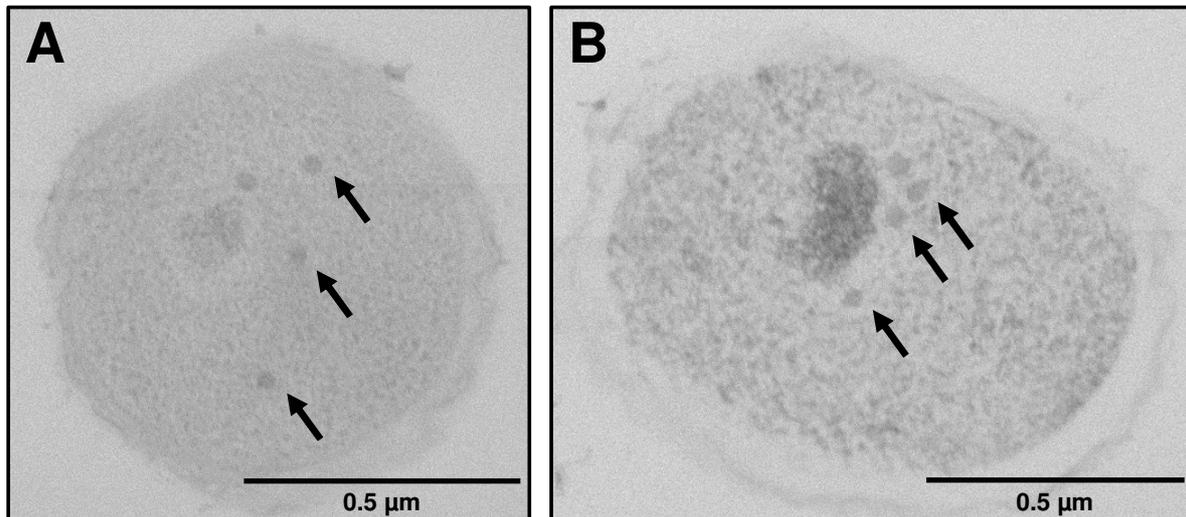
Davon ausgehend, dass die Strukturen vornehmlich in Zellen auftraten, die das toxische Substrat Toluol verwerteten, lassen sich zwei mögliche Hypothesen ableiten. Zum einen könnte überschüssiges Toluol in dieses Mikrokompartiment transportiert werden, um die Zelle vor toxischen Effekten zu schützen bzw. das Substrat zwischen zu speichern. Zum anderen könnten diese Strukturen das sauerstoffsensitive Glycyl-Radikalenzym Benzylsuccinat-Synthase (BSS) enthalten, welches Toluol zu Benzylsuccinat umsetzt und damit für die Zelle unschädlich macht. Das Enzym wäre durch den Einschluss in das potentielle Mikrokompartiment zusätzlich vor molekularem Sauerstoff geschützt. Ausgehend von dieser Annahme kam nur ein Genprodukt des Toluol-induzierten Operons als potentielles Hüllprotein in Frage (siehe Einleitungskapitel Abb. 4). Das Gen *bssF* kodiert für ein ca. 64 kDa großes Protein, das zwei von-Willebrand-Faktor-A-Domänen besitzt und mit großer Ähnlichkeit in den Stämmen EbN1 und K172 vorkommt. Es wurde gezeigt, dass das gereinigte BssF<sub>K172</sub> *in vitro* durch Polymerisierung Kompartiment-artige Strukturen ausbildet (ausführliche Darstellung aller Ergebnisse in der Masterarbeit von J. Nies [2015, AG Prof. Dr. J. Heider, Philipps-Universität Marburg]). Es konnte bisher jedoch kein Zusammenhang zwischen BssF und den *in vivo* ermittelten Strukturen gezeigt werden.



**Abb. 15 TEM Aufnahmen von *A. aromaticum* Stamm EbN1**

TEM Aufnahmen Uranylacetat-gefärbter Dünnschnitte von EbN1 in Kooperation mit Dr. Thomas Heimerl (AG Prof. Dr. Maier, Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg). Die Anzucht der Kulturen erfolgte unter denitrifizierenden Bedingungen mit Benzoat (A+B) oder Toluol (C-F). Die bisher unbekannt Strukturen, die eine gewisse Symmetrie und Hülle aufwiesen, und vorwiegend in Toluolgezogenen Zellen auftraten, sind durch Pfeile markiert und vergrößert dargestellt (E+F).

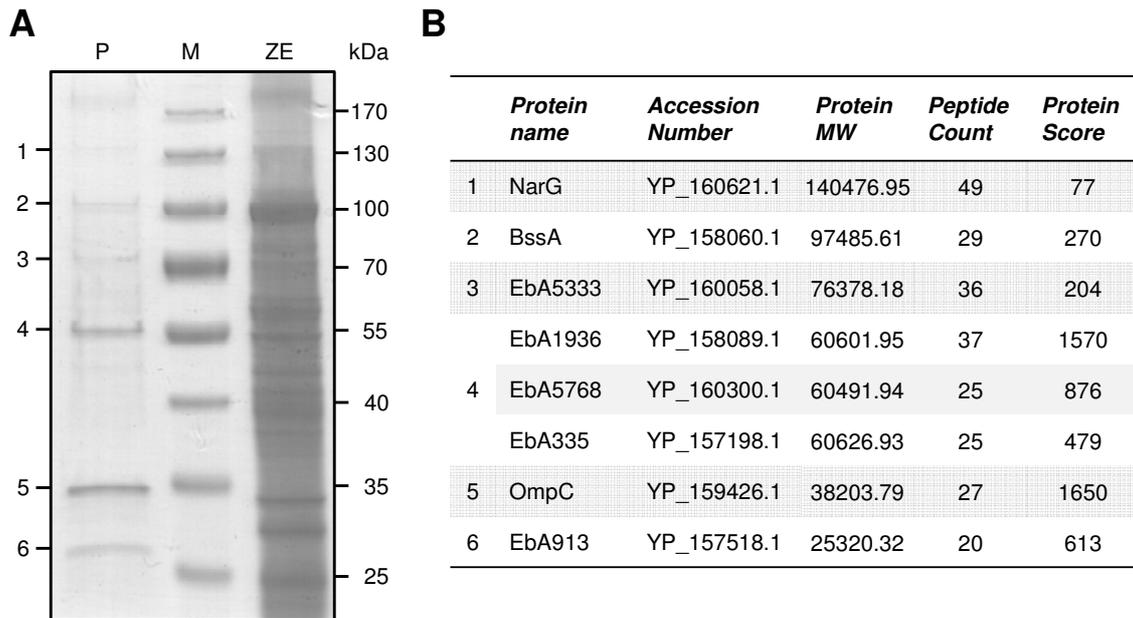
Weiterführende Experimente widerlegten sogar die These, dass BssF Teil der Hülle dieser potentiellen Mikrokompartimente ist, da Toluol-gezogene Zellen eines *bssF* Deletionsstammes weiterhin diese Strukturen aufwiesen (Abb. 16). Bestätigt wurde dies durch Immun-Elektronenmikroskopie, da keine spezifische Bindung der potentiellen Zellkompartimente durch den Anti-BssF<sub>K172</sub>-Antikörper erfolgte (T. Heimerl, persönliche Kommunikation).



**Abb. 16 TEM Aufnahmen von *A. aromaticum* Stamm EbN1-SR7  $\Delta bssF$**

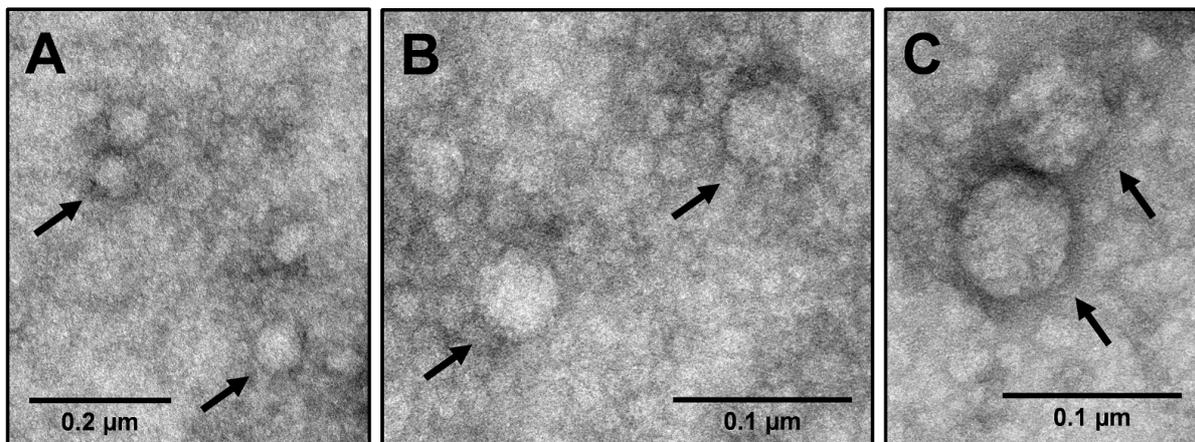
TEM Aufnahmen Uranylacetat-gefärbter Dünnschnitte von Zellen des *bssF* Deletionsstammes. Die Anzucht der Kulturen erfolgte unter denitrifizierenden Bedingungen mit Toluol (A+B). Die potentiellen Mikrokompartimente sind durch Pfeile markiert.

Um die Zusammensetzung der potentiellen Mikrokompartimente zu untersuchen, wurden erste Versuche zur Isolierung dieser Objekte aus EbN1 mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde ein abgewandeltes Protokoll zur Isolierung von Carboxysomen angewandt [Holthuijzen *et al.* (1986) doi:10.1007/BF00409891]. Das aerob isolierte Pellet wurde durch Massenspektrometrie (Jörg Kahnt, MPI Marburg) näher analysiert (Abb. 17). Interessanterweise wurden neben der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS, auch Proteine der postulierten Lösungsmittel-Stressantwort nachgewiesen [Wöhlbrand *et al.* (2008) doi:10.1128/JB.00409-08]. Den höchsten Proteinidentifizierungs-Score hatte das Genprodukt von *ebA1936*, das im postulierten Toluol-Stressoperon lokalisiert ist. EM Aufnahmen von negativ-kontrastierten Proben des Pellets brachten keinen Erfolg. Des Weiteren wurde eine anaerobe Isolierung mit Hilfe eines abgewandelten Protokolls nach Roberts *et al.* (2011) durchgeführt [doi:10.1128/JB.06444-11]. Die Negativkontrastierung von Proben der oberen Schichten der Dichtegradientenzentrifugation zeigte einige symmetrische Strukturen, die eine ähnliche Größe wie die *in vivo* detektierten Mikrokompartimente aufwiesen (Abb. 18). Bis zum Ende der Promotion konnten diese Strukturen jedoch keinen Proteinen zugeordnet werden.



**Abb. 17 Massenspektrometrische Analyse des Pellets der Dichtegradientenzentrifugation**

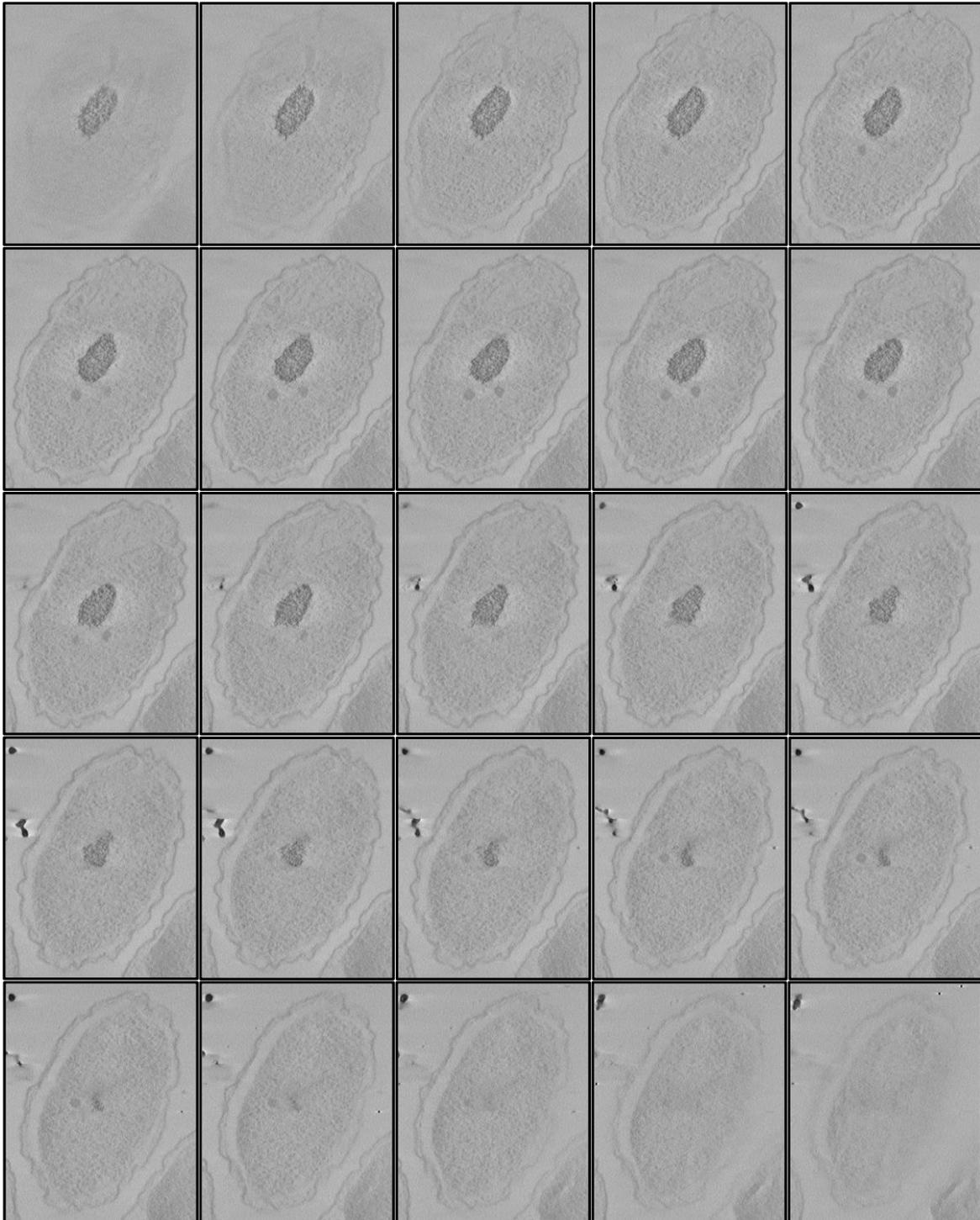
(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel (10% (w/v)) nach Auftrennung des aerob isolierten Pellets (P) und des zellfreien Extrakts (ZE) nach bzw. vor der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. (M) Proteinstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™). (B) Übersicht der mittels MS-Analyse ermittelten Proteine im isolierten Pellet.



**Abb. 18 Negativkontrastierung verschiedener Dichtegradientenzentrifugations-Schichten**

EM Aufnahmen von negativ-kontrastierten Proben (Uranylacetat) aus verschiedenen Schichten der Dichtegradientenzentrifugation (A-C). Die isolierten Strukturen sind durch Pfeile markiert.

Um den morphologischen Aufbau der potentiellen Mikrokompartimente genauer zu analysieren, könnte die Kryoelektronentomographie angewandt werden [Murphy GE, Jensen GJ (2007) Electron Cryotomography. *Biotechniques* 43:413-421]. Hierbei werden EM Einzelaufnahmen verschiedener Ebenen der Zelle sog. Kippserien von zumeist 200 nm-Schnitten in eine 3D-Struktur umgerechnet. Als erste Versuche in diese Richtung wurden durch Dr. Thomas Heimerl testweise Kippserien von Zellen Toluol-gezogener EbN1 Kulturen aufgenommen (Abb. 19 zeigt ausgewählte TEM Aufnahmen einer Kippserie).



**Abb. 19 Kippserie von TEM Einzelaufnahmen einer EbN1 Zelle, die in Gegenwart von Toluol kultiviert wurde**

Ausgewählte TEM Einzelaufnahmen einer Kippserie eines Uranylacetat-gefärbtes 200 nm-Dünnschnittes einer *A. aromaticum* Stamm EbN1 Zellen, die unter denitrifizierenden Bedingungen mit Toluol kultiviert wurde. Die Durchführung erfolgte durch Dr. Thomas Heimerl.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater **PROF. DR. JOHANN HEIDER** für die Überlassung des interessanten, aber auch anspruchsvollen Themas sowie die Möglichkeit der Anfertigung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Besonders danke ich ihm für die stete Diskussionsbereitschaft, für alle Freiheiten und das Vertrauen in meine Arbeit sowie die zahlreichen Ideen und immer neuen Vorschläge zur Problemlösung!

Herrn **PROF. DR. MARTIN THANBICHLER** danke ich für die Kooperationsbereitschaft und die Hilfe bei allen Fragen rund um das Thema des Bioreporters. Außerdem bin ich ihm für die Nutzung seiner Geräte und Materialien sowie die Übernahme des Zweitgutachtens sehr dankbar.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei **DR. KAROLA SCHÜHLE** und **DR. TAMARA HOFFMANN** bedanken, die bei meinen Fragen und Problemen zu jeglichen Laborgeräten und -materialien immer ansprechbar waren.

Ebenfalls möchte ich **DR. THOMAS HEIMERL** für die Durchführung und Hilfe bei der Auswertung der Elektronenmikroskopie danken. **PROF. DR. UWE MAIER** gilt mein Dank für die Nutzung seiner Geräte und Materialien. An dieser Stelle möchte ich auch meinen Dank an **JÖRG KAHNT** und **SILVIA GONZÁLEZ SIERRA** für die Durchführung der Massenspektrometrie bzw. der Durchflusszytometrie aussprechen.

**OLLI**, dir danke ich für die super Zusammenarbeit, die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und die Hilfe bei der Auswertung dieser.

My special gratitude goes to **NIL** for all the fruitful scientific discussions and every hint in protein biochemical-related questions. I especially want to thank him for his willingness to help and proof reading of the English parts of this thesis. I hope we will meet again and that I can enjoy your Indian cooking once more.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem meinen Freunden und Kollegen **DENIZ, LINA, GEORG, KATHI, BASTI, DANIEL, NILS** und **MARCO** für die tolle Zeit im und außerhalb des Labors. Weiterhin möchte ich **IRIS** und **ANDREA** sowie meinem Masterstudenten **JONAS** für die tolle Zusammenarbeit und die praktische Hilfe an meinem Projekt danken. Hervorheben möchte ich außerdem **GABI**, die mich fast 3 Jahre als Bank- und Labornachbarn „ausgehalten“ hat. Natürlich danke ich auch allen nicht genannten, aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Studenten der Mibi-AGs Heider, Buckel und Bremer für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor, während den gemeinsamen wissenschaftlichen Konferenzen sowie bei allen Grill- und Fußballerevents während meiner Zeit in Marburg.

Nochmals danken möchte ich **LINA, GEORG** und **KAROLA**, die sich durch Teile meiner Arbeit „gequält“ und mir bei der Korrektur dieser sehr geholfen haben! Ich hoffe, ihr nehmt es mir nicht krumm, wenn ich dann stellenweise doch meine Meinung beibehalten habe.

Ein sehr großes Dankeschön geht an meinen guten Freund **MARIO**, der seit meiner Laborzeit in Halle immer Rat wusste und mir auch durch Kontrolllesen dieser Arbeit sehr geholfen hat.

**MEINER FAMILIE** möchte ich für die ständige Unterstützung über meine gesamte Ausbildungszeit hinweg danken und dafür, dass ihr bei allen Entscheidungen hinter mir gestanden habt.

Last but definitely not least, danke ich **HENRIETTE** für einfach alles!!! Wieder einmal hat du sehr viel zurückgesteckt und auf dich genommen, um mich, wie bereits während der Bachelor und Master Arbeiten, Tag und Nacht zu unterstützen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vor- und Zunahme: Enrico Muhr  
 Geburtsdatum: 23. Oktober 1985  
 Geburtsort: Nordhausen  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

10/2012 – 12/2015 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ Promotionsstudent** in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johann Heider/Microbial Biochemistry an der Philipps-Universität Marburg zum Thema „Regulation des anaeroben Abbaus aromatischer Kohlenwasserstoffe in *Aromatoleum aromaticum* EbN1“

10/2010 – 08/2012 **Master of Science Biologie** 12. Juli 2012, Masterarbeit zum Thema „Entwicklung eines *in vitro* Reifungssystems für die [NiFe]-Hydrogenase-2 in *E. coli*“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Gary Sawers/ General Microbiology an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

04/2008 – 09/2010 **Bachelor of Science Biologie** 17. September 2010, Bachelorarbeit zum Thema „Charakterisierung der periplasmatischen Domäne von FetM aus *E. coli* F11“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dietrich H. Nies/ Molecular Microbiology an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2004 – 03/2008 Studium Diplom-Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/1996 – 06/2004 Allgemeine Hochschulreife 22. Juni 2004 am Friedrich Schiller Gymnasium in Bleicherode

08/1992 – 07/1996 Grundschule, Wolframshausen

---

## Publikationsliste

### 2016

**Muhr E**, Leicht O, González Sierra S, Thanbichler M, Heider J. A fluorescent bioreporter for acetophenone and 1-phenylethanol derived from a specifically induced catabolic operon. *Front Microbiol* 6:1561 doi: 10.3389/fmicb.2015.01561

### 2015

**Muhr E**, Schühle K, Clermont L, Sünwoldt K, Kleinsorge D, Seyhan D, Kahnt J, Schall I, Cordero PR, Schmitt G, Heider J. Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in ‘*Aromatoleum aromaticum*’: differentiation and differential induction. *Arch Microbiol* 197(9):1051-1062 doi: 10.1007/s00203-015-1142-z

Thomas C, **Muhr E**, Sawers RG. Coordination of synthesis and assembly of a modular membrane-associated [NiFe]-hydrogenase is determined by cleavage of the C-terminal peptide. *J Bac* 197(18):2989-2998 doi: 10.1128/JB.00437-15

### 2012

Soboh B, Stripp ST, **Muhr E**, Granich C, Braussemann M, Herzberg M, Herberle J, Sawers RG. [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN<sup>-</sup> ligands. *FEBS Lett* 586(21):3882-3887 doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.019

Soboh B, Kuhns M, Braussemann M, Waclawek M, **Muhr E**, Pierik AJ, Sawers RG. Evidence for an oxygen-sensitive iron-sulfur cluster in an immature large subunit species of *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase 2. *Biochem Biophys Res Commun* 424(1):158-163 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.096

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Regulation des anaeroben Abbaus aromatischer Kohlenwasserstoffe in *Aromatoleum aromaticum* EbN1“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, den 16. Juli 2016

---

Enrico Muhr