

**Untersuchung der Integration des MtrABC-Komplexes in die äußere
Membran bei *Shewanella oneidensis* MR-1**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

DISSERTATION

von

Simon Stephan

aus

Freiburg im Breisgau

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2015

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt habe und nur die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Teile, die wörtlich oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet.

Ort, Datum

Simon Stephan

Publikationen und Konferenzbeiträge:

Stephan S., Marin L., Gescher J.: The correct folding of the β -barrel protein MtrB from *Shewanella oneidensis* depends on the interaction with the c-type cytochrome MtrA in the periplasm. (in process)

Simon Stephan, Velia Schall, Johannes Gescher 2015

A new route for the transport of β -barrel proteins through the periplasm in *Shewanella oneidensis* MR-1. Mündliche Präsentation auf der VAAM 2015

Simon Stephan, Johannes Gescher 2014

Integration and folding of the β -barrel protein MtrB in *Shewanella oneidensis* MR-1. Poster auf der VAAM 2014

Simon Stephan, Marcus Schicklberger, Johannes Gescher 2012

Genomic plasticity responsible for dissimilatory iron reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. Poster auf der VAAM 2012

Akürzungsverzeichnis:

<i>S. oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
DIR	dissimilatorische Eisenreduktion
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DATD	N,N'-Diallyltartardiamid
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
RT	Raumtemperatur
Δ	Deletion
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
T2SS	Typ-2-Sekretions System
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
X	beliebige Aminosäure
A	Alanin
P	Prolin
A	Alanin
G	Glycin

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	1
II.	Einleitung	3
1	Energiegewinnung	3
2	Anaerobe Atmung	3
3	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	5
3.1	Dissimilatorische Eisenreduktion bei <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	6
3.2	Periplasmatische Protein für die Eisenreduktion	10
3.3	Der MtrABC-Komplex	12
4	Einbau von OMPs in die äußere Membran	15
5	Ziel dieser Arbeit	17
III.	Material und Methoden	19
1	Chemikalien und Enzyme	19
6	Verwendete Stämme und Medien	19
7	Kultivierung und Anzucht der Stämme	22
8	Molekularbiologische Methoden	24
8.1	Isolierung chromosomaler DNA	24
8.2	Isolierung von Plasmiden	25
8.3	Primer	25
8.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
8.5	Agarose-Gelelektrophorese	29
8.6	Isothermale in vitro Ligation	30
8.7	Transformation der elektrisch kompetenten Zellen	31
8.8	Herstellung markerloser <i>S. oneidensis</i> Deletionsmutanten	33
8.9	Sequenzierung	35

8.10	Herstellung der Punktmutationen	35
9	Bestimmung der Fe(III)-Reduktion	37
10	Protein-biochemische Methoden	37
10.1	Fraktionierung der Zelle in ihre einzelnen Bestandteile	37
10.2	Proteinbestimmung	39
10.3	Acetonfällung.....	40
10.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
10.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit N,N'-Diallyl-tartardiamid.....	43
10.6	Häm-Färbung	44
10.7	Coomassie-Färbung	45
10.8	Western-blot.....	46
10.9	Affinitätschromatographie	49
10.10	Gelfiltration.....	51
10.11	In vivo crosslinking Versuche.....	52
11	Reduktion der Hämgruppen	53
12	MtrAB Dynamik Versuch.....	54
13	Analyse der Aminosäuresequenz in Lipoproteinen	54
IV.	Ergebnisse	55
1	Dynamik von MtrA zwischen Periplasma und äußerer Membran.....	55
2	Wachstumskurven von MtrA und MtrB Mutationen.....	58
2.1	Wachstumskurven der Punktmutationen von MtrA.....	59
2.2	Einfluss von definierten Bereichen bei MtrB auf die Reduktion von Eisen	60
3	Detektion von MtrB auf dem Blot unter verschiedenen Bedingungen	64
3.1	Stabilität von MtrB in verschiedenen <i>surA</i> , <i>skp</i> , <i>degP</i> und <i>mtrA</i> Mutanten.....	64
3.2	Lokalisation von MtrB in einem $\Delta degP \Delta skp \Delta mtrA$ Stamm.....	66
3.3	In vitro Proteinexpression	68

4	Analyse von MtrC Punktmutationen.....	71
5	Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenzen der Lipoproteine	75
V.	Diskussion	84
1	Die Dynamik von MtrA bei der Bindung an MtrB in der äußeren Membran	84
2	Einfluss von MtrA auf den Einbau und die Stabilität von MtrB	86
2.1	Einfluss von SurA, Skp, DegP und MtrA auf die Stabilität von MtrB	87
2.2	Einfluss von MtrA bei einer in vitro Proteinexpression von MtrB	89
2.3	Untersuchung der Punktmutationen	91
2.3.1	Untersuchung von MtrB mit His-, strep- und V5-Tag	91
2.3.2	Einfluss der Punktmutationen in MtrA und MtrB auf die Eisenreduktion .	93
3	MtrB, ein ungewöhnliches β -barrel Protein	94
4	Einfluss der Punktmutationen in MtrC.....	96
5	Untersuchung unterschiedlicher Lipoproteine in verschiedenen Organismen.....	98
6	Ausblick	100
VI.	Literaturverzeichnis	102
	Danksagung.....	112
	Manuskript.....	113

I. Zusammenfassung

Die dissimilatorische Eisenreduktion (DIR) ist eine der ursprünglichsten Formen der anaeroben Atmung bei Mikroorganismen. Bei neutralem pH-Wert liegen viele Eisenformen in unlöslichem Zustand vor. Besonders bei Gram-negativen Organismen wurde für die Reduktion von unlöslichen Elektronenakzeptoren ein spezieller Mechanismus etabliert. Für den Transport der Elektronen vom Cytoplasma hin zur Oberfläche der Zelle muss die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran überwunden werden, um den Elektronenakzeptor an der Oberfläche zu reduzieren. Der Modellorganismus *Shewanella oneidensis* MR-1 hat hierfür den Mtr-Weg etabliert. Bei diesem Weg werden die Elektronen von CymA in das Periplasma geleitet und von dort über Stc und FccA auf den Mtr-Komplex übertragen. Der Mtr-Komplex besteht aus dem periplasmatischen *c*-Typ Cytochrom MtrA, dem β -barrel Protein MtrB, welches die äußere Membran durchspannt und der terminalen Reduktase MtrC an der Oberfläche der Zelle.

Ziel dieser Arbeit war es ein besseres Verständnis über den Einbau der Proteine und die Abhängigkeit untereinander bei der Integration in die äußere Membran zu erhalten. Es wurde die statische Bindung von MtrA an MtrB in der äußeren Membran gezeigt. Das MtrA, welches an MtrB gebunden ist, bleibt permanent, sowohl in oxidiertem als auch in reduziertem Zustand, an MtrB gebunden und erhält die Elektronen für die Weitergabe an MtrC von den *c*-Typ Cytochromen im Periplasma. Für die Integration von β -barrel Proteinen ist bei Gram-negativen Organismen der SurA Weg oder der Skp/DegP Weg zuständig. Die beiden Chaperone SurA und Skp sind für die Faltung und das Geleit der β -barrel Proteine durch das Periplasma verantwortlich. Die Hauptaufgabe der Protease DegP ist es falsch gefaltene β -barrel Proteine oder Aggregate abzubauen. Durch Analysen verschiedener Deletionen in *surA*, *skp* und *DegP* konnte festgestellt werden, dass ohne MtrA das β -barrel Protein MtrB in ungefaltetem Zustand in der Zelle vorliegt und daher von DegP Abgebaut wird. Wenn zusätzlich zu MtrA auch DegP fehlt konnte der ungefaltete Zustand von MtrB bei Western-Blot Analysen festgestellt werden. Durch den eigenständigen Einbau von MtrB bei einer *in vitro* Proteinexpression lässt sich vermuten, dass MtrB nicht über ein Chaperon SurA oder Skp durch das Periplasma gelangt und durch den Bam-Komplex in die äußere Membran integriert wird, sondern dass MtrB sich wie ein Autotransporter verhält. Dabei würde MtrA

die Funktion der „passenger domain“ übernehmen, im Periplasma direkt mit MtrB interagieren und diese Bindung nicht mehr aufgeben.

Die terminale Reduktase MtrC wird durch das Typ-2-Sekretions System nach außen transportiert. Die Bindedomäne für das Typ-2-Sekretions System ist unbekannt. Es konnte aber bei MtrC eine hoch konservierte Sequenz gefunden werden, welche direkt an den Lipidanker anschließt. Bei der Untersuchung von Lipoproteinen aus verschiedenen Gram-negativen Organismen konnte festgestellt werden, dass dieses CGGSD Motiv in leicht abweichender Form bei Organismen, welche zu DIR fähig sind häufiger vorkommt. Bei Organismen, welche nicht zu DIR fähig sind kommt ein CXD Motiv nur in sehr seltenen Fällen in ähnlicher Zusammensetzung vor. Bei *S. oneidensis* scheint die Lokalisation der Proteine mit diesem Motiv auf der Zelloberfläche die Gemeinsamkeit darzustellen. Da aber im allgemeinen von vielen Proteinen, welche mit dieser Sequenz gefunden wurden, die Funktion und Lokalisation unbekannt ist, müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um eine genauere Aussage über die Funktion der Sequenz zu treffen.

II. Einleitung

1 Energiegewinnung

Die meisten eukaryotischen Organismen und viele Prokaryoten nutzen die aerobe Atmung zur Energiegewinnung, wobei Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient. Die Energie wird in der Zelle in Form von ATP gespeichert. Die Fähigkeit von Mikroorganismen Gärung oder anaerobe Atmung zur Energiegewinnung zu nutzen, versetzt sie in die Lage alle Arten von Lebensräumen zu erobern. Da bei der Gärung keine Elektronen auf einen externen terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden, wird die Energie nur durch Substratstufenphosphorylierung gewonnen. Die Gärung ist daher ineffizienter als die meisten Formen der Atmung. Bei der Atmung wird eine anorganische oder organische Verbindung oxidiert und die Elektronen auf einen geeigneten Elektronenakzeptor übertragen. Die dabei freiwerdende Energie kann über einen Protonengradient (oxidative Phosphorylierung) und/oder ebenfalls durch Substratstufenphosphorylierung in ATP gespeichert werden, dadurch ist die ATP-Ausbeute effektiver als bei der Gärung (Fuchs, 2014).

2 Anaerobe Atmung

Viele Mikroorganismen sind in der Lage anstelle von Sauerstoff auch andere Elektronenakzeptoren wie Sulfat, TMAO (Trimethylaminoxid), DMSO (Dimethylsulfoxid), Fumarat aber auch Metalloxide zu nutzen, um nur wenige Möglichkeiten zu nennen (Burns & DiChristina, 2009; Galnick *et al.*, 2006; Myers & Nealson, 1988). Durch das geringere Redoxpotential der alternativen Elektronenakzeptoren gegenüber Sauerstoff steht den anaerob atmenden Organismen zwar eine geringere Energieausbeute zur Verfügung, es ermöglicht ihnen aber viele Lebensräume an denen kein Sauerstoff vorhanden ist zu besiedeln.

Tabelle 1: Redoxpotentiale verschiedener Elektronenakzeptoren bei pH 7.

Elektronenakzeptor	E_0'	Referenz
O ₂ /H ₂ O	+810 mV	(Thauer <i>et al.</i> , 1977)
Nitrat/Nitrit	+430 mV	(Thauer <i>et al.</i> , 1977)
DMSO/DMS	+160 mV	(Styrvold & Strom, 1984)
TMAO/TMA	+130 mV	(Styrvold & Strom, 1984)
Fumarat/Succinat	+33 mV	(Thauer <i>et al.</i> , 1977)
H ₂ SO ₄ /H ₂ S	-22 mV	(Majzlan, 2013)

Eine besondere Form der anaeroben Atmung ist die dissimilatorische Metalreduktion (DMR), bei der Metalloxide wie Fe³⁺ oder Mn⁴⁺ als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden. Diese Metalloxide sind bei neutralem pH-Wert unlöslich und müssen daher außerhalb der Zelle reduziert werden. Eisenreduzierende Bakterien, wie *Shewanella oneidensis* oder *Geobacter metallireducens*, haben hierfür besondere Mechanismen etabliert (Lovley *et al.*, 2004).

In der Biotechnologie können Mikroorganismen, welche die dissimilatorische Metallreduktion (DMR = **d**issimilatory **m**etal **r**eduction) beherrschen, für die Bioremediation von Böden, welche durch organische oder metallische Stoffe kontaminiert sind, genutzt werden (Braunschweig *et al.*, 2013; Lovley, 1995; Lovley & Coates, 1997). Hierbei wird die Eigenschaft von Schwermetallen wie Uran oder Molybdän in reduziertem Zustand unlöslich zu sein zunutze gemacht, um den Eintritt in das Grundwasser zu verhindern oder mit Schwermetall belastetes Wasser wieder zu reinigen (Scherer *et al.*, 2000). Es kann aber auch für die Gewinnung von Energie in Form einer mikrobiellen Brennstoffzelle verwendet werden. Hierbei wird das unlösliche Eisenoxid durch eine Anode als Elektronenakzeptor ausgetauscht, wodurch der Vorgang der Reduktion des Elektronenakzeptors durch die Organismen in Form von Strom genutzt wird (Bond *et al.*, 2002; Logan *et al.*, 2006). Die Beseitigung von organischem Abfall ist ein weiterer Punkt, bei dem die dissimilatorische Metallreduktion angewandt wird (Chaudhuri & Lovley, 2003; Holmes *et al.*, 2004). Ein Beispiel hierfür wäre die Dechlorierung von Kohlenstofftetrachlorid durch nano-magnetit,

welches durch mikrobielle Reduktion entsteht (McCormick *et al.*, 2002). Für die biotechnologische Nutzung ist aber ein detailliertes Verständnis des gesamten Vorganges der dissimilatorischen Metallreduktion notwendig.

3 *Shewanella oneidensis* MR-1

Shewanella oneidensis MR-1 ist ein Gram-negatives γ -Proteobakterium. Es wurde erstmals 1988 aus dem Lake Oneida isoliert und charakterisiert (Myers & Nealson, 1988). *S. oneidensis* ist nicht zur Fermentation befähigt, was es durch eine Vielzahl an Elektronenakzeptoren kompensieren kann. Unter anaeroben Bedingungen ist *S. oneidensis* in der Lage 20 verschiedene Elektronenakzeptoren zu nutzen. Dazu gehören unter anderem lösliche Verbindungen wie DMSO, TMAO, Fumarat, Nitrat, aber auch lösliche und unlösliche Metalle wie Fe(III), Mn(IV), As(V), U(VI) (Burns & DiChristina, 2009; Gralnick *et al.*, 2006; Myers & Nealson, 1988). Als Elektronendonator kann *S. oneidensis* unter anaeroben Bedingungen ausschließlich Laktat, N-Acetylglukosamin und H₂ nutzen (Yang *et al.*, 2006). Bei der anaeroben Atmung von *S. oneidensis* wird die Energie jedoch nicht wie bei einer aeroben Atmung im Zitronensäurezyklus und über die ATP-Synthase gewonnen, sondern hauptsächlich über Substratstufenphosphorylierung bei der Umwandlung von Acetylphosphat zu Acetat, welches nicht weiter oxidiert, sondern wieder in die Umgebung sekretiert wird. Bei der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat entstehen Elektronen, welche direkt in den Menaquinonpool in der inneren Membran abgegeben werden und von da aus nach außen in das Periplasma gelangen (Abbildung 1) (Brutinel & Gralnick, 2012; Flynn *et al.*, 2012; Hunt *et al.*, 2010).

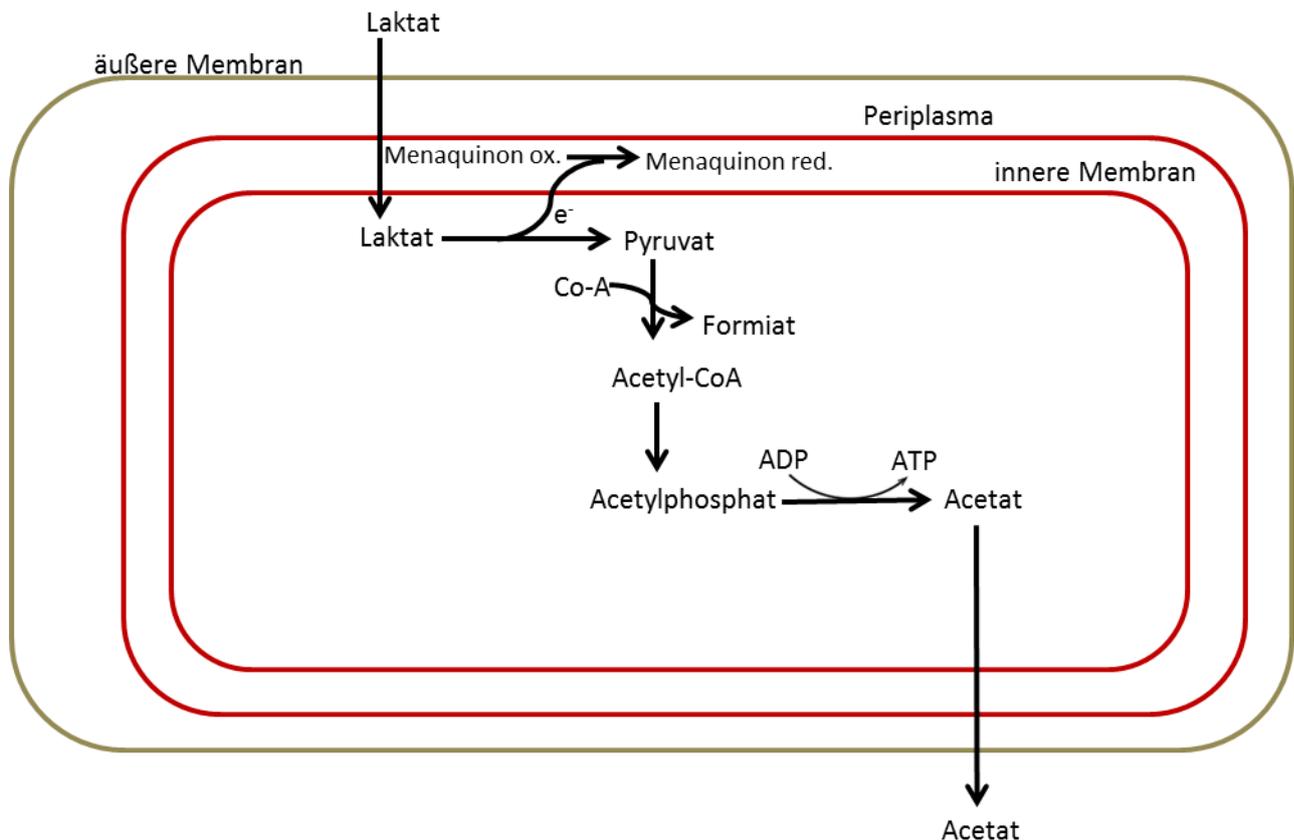


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Energiegewinnung von *S. oneidensis* unter anaeroben Bedingungen mit Laktat als Elektronendonator (Flynn *et al.*, 2012).

Von dort werden sie weiter verteilt, oder durch terminale Reduktasen direkt auf den entsprechenden Elektronenakzeptor übertragen. Bei der dissimilatorischen Eisenreduktion (DIR = **d**issimilatory **i**ron **r**eduction) müssen die Elektronen vom Cytoplasma aus mehrere Barrieren überwinden, um außerhalb der Zelle zu den unlöslichen Elektronenakzeptoren zu gelangen.

3.1 Dissimilatorische Eisenreduktion bei *Shewanella oneidensis* MR-1

Eisen ist eines der häufigsten Metalle in der Erdkruste (Press, 2008; Richter *et al.*, 2012). Es ist aufgrund der Häufigkeit von Eisen nicht verwunderlich, dass die dissimilatorische Eisenreduktion eine der ursprünglichsten Formen von mikrobieller Atmung darstellt (Vargas *et al.*, 1998).

Aufgrund der unterschiedlichen Formen in denen Eisenverbindungen in der Natur vorliegen, hat Eisen ein sehr breites Spektrum an Redoxpotentialen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Das Redoxpotential verschiedener Eisenformen (Straub *et al.*, 2001).

Eisenform	E_0' [mV]
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$	+430
Fe(III) NTA/Fe(II) NTA	+385
Fe(III) citrat/Fe(II) citrat	+372
Fe(III) EDTA/Fe(II) EDTA	+96
Ferrihydrit/ Fe^{2+}	-100 bis +100
$\alpha\text{-FeOOH}$ (Goethit)/ Fe^{2+}	-274
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Hämatit)/ Fe^{2+}	-287
Fe_3O_4 (Magnetit)/ Fe^{2+}	-314

Viele Eisenspezies sind bei neutralem pH-Wert unlöslich und müssen daher an der Oberfläche der Zelle reduziert werden (Straub *et al.*, 2001). Um den Kontakt zu dem Elektronenakzeptor herzustellen bedient sich *S. oneidensis* vier verschiedener Möglichkeiten (Abbildung 2).

Direkter Kontakt: Bei einem direkten Kontakt kann eine *S. oneidensis* Zelle mithilfe des MtrABC-Komplexes (siehe Abschnitt II. 3.3) mit dem unlöslichen Elektronenakzeptor interagieren und die Elektronen direkt auf Eisen übertragen (Lies *et al.*, 2005).

Nanowires: Nanowires sind extrazelluläre Filamente, welche durch eine Ausstülpung der äußeren Membran entstehen und unlösliche Elektronenakzeptoren erreichen können, die unter normalen Bedingungen für die Zelle nicht zugänglich sind. In die Membran der Nanowires ist der MtrABC-Komplex, auf den im Folgenden noch genauer eingegangen wird, integriert und es besteht Kontakt zum Periplasma (El-Naggar *et al.*, 2010; Pirbadian *et al.*, 2014).

Chelatoren: Chelatoren sind Komplexbildner die es ermöglichen den unlöslichen Elektronenakzeptor in Lösung zu bringen und ihn somit durch Diffusion zu der Zelle zu transportieren. Nach der Reduktion der Eisenspezies kann lösliches Fe(II) in Lösung gelangen und der Chelator kann erneut eingesetzt werden (Jones *et al.*, 2010; Pitts *et al.*, 2003).

Elektronenshuttle: Bei einem Elektronenshuttle handelt es sich um eine Substanz, welche von der Zelle in reduziertem Zustand, sekretiert werden kann. Nachdem das Shuttle durch Diffusion den Elektronenakzeptor erreicht, kann es in oxidiertem Zustand wieder zur Zelle zurück gelangen und dort erneut reduziert werden. Häufig als Shuttle eingesetzte Stoffe sind Flavine (Coursolle & Gralnick, 2010; Kotloski & Gralnick, 2013; Marsili *et al.*, 2008).

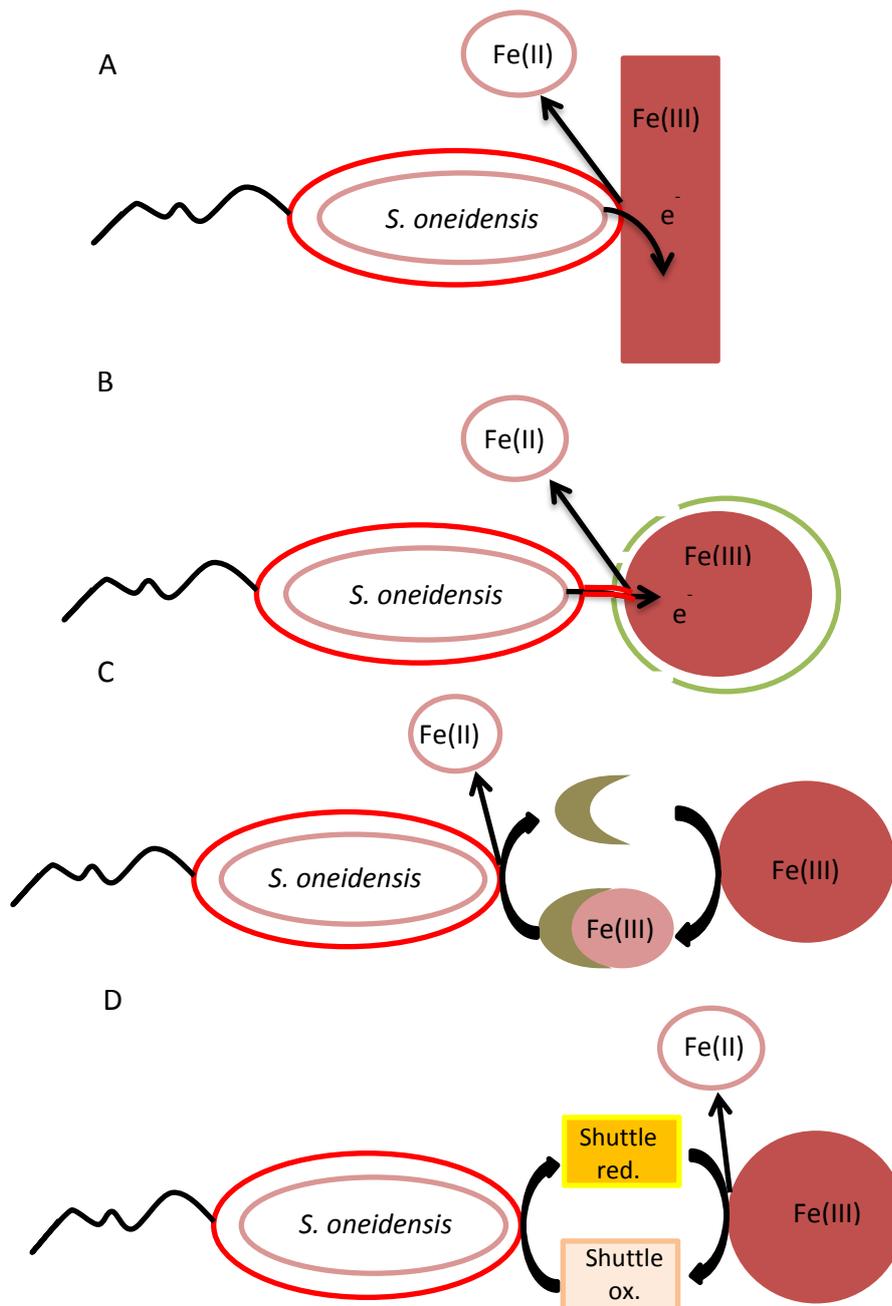


Abbildung 2: Möglichkeiten zur Übertragung der Elektronen auf eine unlösliche Eisenspezies. A stellt die Übertragung durch direkten Kontakt dar. B verdeutlicht die Übertragung durch Nanowires, falls kein direkter Zugang durch Gestein oder ähnliches zu den Eisenoxiden besteht. C ist die Darstellung eines Chelators, welcher Fe(III) in Lösung bringt und zur Zelle transportiert. D zeigt die Übertragung mittels eines Shuttles, welches zwischen der Zelle und dem Elektronenakzeptor diffundiert. Eisen gelangt bei jeder Darstellung als Fe(II) in Lösung (Gralnick & Newman, 2007).

Bei allen vier beschriebenen Möglichkeiten findet die Reduktion an der Oberfläche der Zelle statt. Die Elektronen müssen dabei die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran überwinden, um den Weg zum terminalen Elektronenakzeptor zu finden.

3.2 Periplasmatische Protein für die Eisenreduktion

Am Elektronentransfer von der inneren Membran hin zur Oberfläche der Zelle sind mehrere Proteine, meist *c*-Typ Cytochrome, involviert. Cytochrome sind Proteine mit einem oder auch mehreren Häm Cofaktoren in denen ein Eisenatom genutzt wird, um Elektronen aufzunehmen und wieder abzugeben. Ohne die *ccm* (c-type cytochrome maturation) Gene, welche für die Maturation der *c*-Typ Cytochrome notwendig sind, ist *S. oneidensis* nicht mehr zur anaeroben Atmung befähigt (Bouhenni *et al.*, 2005; Dale *et al.*, 2007).

CymA: CymA ist ein 21 kDa tetrahäm Protein, welches in der inneren Membran verankert ist. Es nimmt die Elektronen aus dem Menaquinonpool der inneren Membran auf und gibt sie im Periplasma an Reduktasen (beispielsweise FccA = flavocytochrome c) oder andere Cytochrome (Stc = small teraheme cytochrome) für die Verteilung der Elektronen weiter (Murphy & Saltikov, 2007; Schwalb *et al.*, 2003). Eine *cymA* Deletionsmutante zeigt ein deutliches Defizit bei der Reduktion von Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen (Myers & Myers, 1997).

Periplasmatische Proteine: die zwei, für die dissimilatorische Eisenreduktion, wichtigsten Proteine im Periplasma sind FccA und Stc. Sie sind für die Verteilung der Elektronen im Periplasma zuständig (Sturm *et al.*, 2015). FccA ist ein 62 kDa Flavocytochrom. Es ist eine Fumaratreduktase und hat gleichzeitig die Funktion Elektronen durch das Periplasma zu transportieren (Leys *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2003). Die Elektronen können direkt von FccA auf MtrA und auch umgekehrt übertragen werden (Schuetz *et al.*, 2009). Stc ist ein 12 kDa tetrahäm *c*-Typ Cytochrom. FccA und Stc sind die häufigsten periplasmatischen *c*-Typ Cytochrome (Meyer *et al.*, 2004; Tsapin *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *fccA*- bzw. *stc*-Einzelmutanten keinen Phänotyp aufweisen, wenn aber beide Proteine nicht mehr exprimiert werden, ist das anaerobe Wachstum mit Eisen, DMSO, Nitrat und Nitrit gestört

(Sturm *et al.*, 2015). Dies zeigt, dass die Elektronen nicht direkt von der inneren Membran zur äußeren Membran übertragen werden können, wie es öfters die Hypothese war (Ross *et al.*, 2011), sondern sie müssen von periplasmatischen Proteinen zu der äußeren Membran übertragen werden.

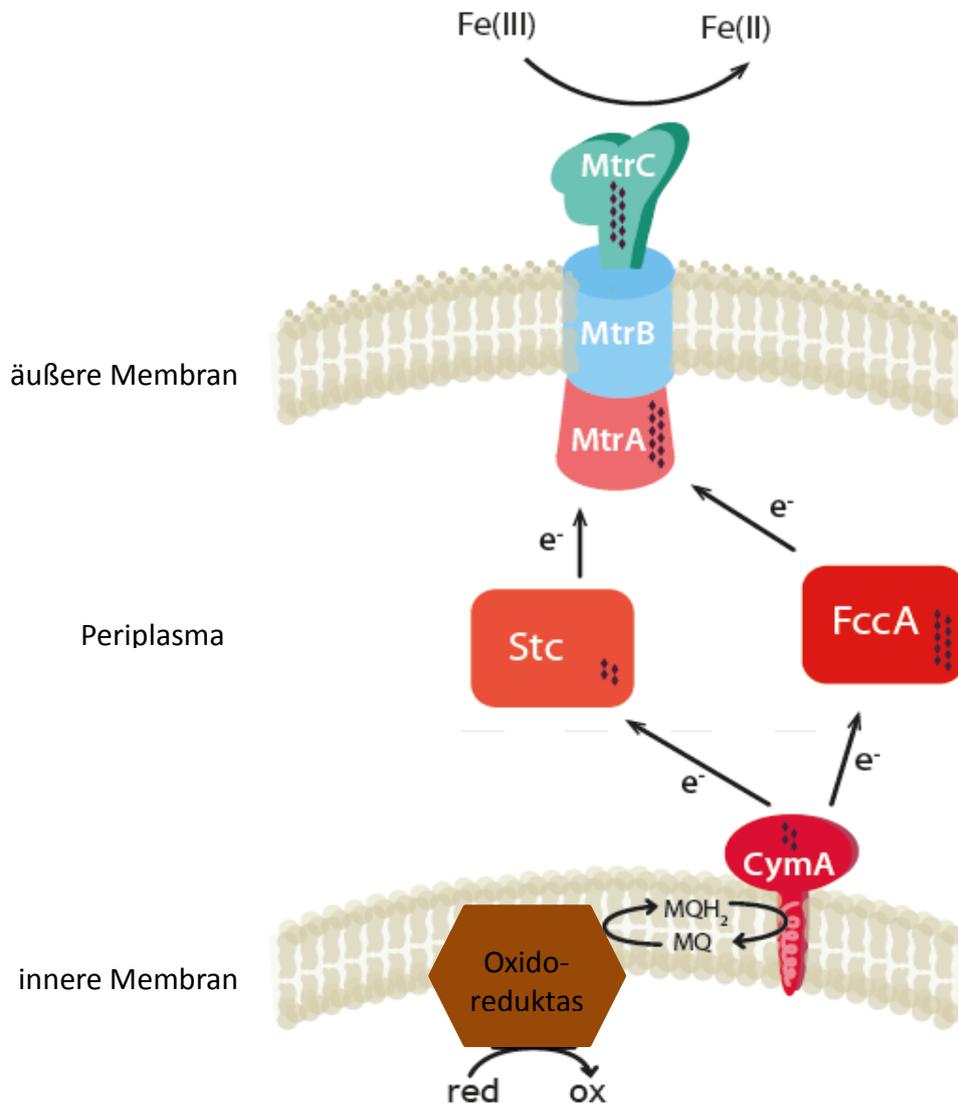


Abbildung 3: Darstellung des Elektronentransports von der Oxidoreduktase bis auf den terminalen Elektronenakzeptor. CymA überträgt die Elektronen aus dem Menaquinonpool in das Periplasma, wo sie von Stc und FccA auf MtrA übertragen werden. Der MtrABC-Komplex transportiert die Elektronen durch die äußere Membran und kann Fe(III) zu Fe(II) reduzieren. Die Rauten in den Proteinen symbolisieren die Anzahl der Häm-Gruppen in dem jeweiligen Protein.

3.3 Der MtrABC-Komplex

Die äußere Membran ist die letzte Hürde beim Transport der Elektronen auf die Oberfläche der Zelle. Diese wird durch einen Proteinkomplex überwunden, welcher vom Periplasma ausgehend die äußere Membran durchspannt und schließlich die Elektronen auf den unlöslichen Elektronenakzeptor übertragen kann. Der MtrABC-Komplex (metal reducing protein ABC Komplex) besteht aus dem im Periplasma lokalisierten *c*-Typ Cytochrom MtrA, dem äußeren Membranprotein (OMP = outer membrane protein) MtrB und dem *c*-Typ Cytochrom MtrC, welches als terminale Reduktase auf der Oberfläche der Zelle lokalisiert ist. Die drei Proteine MtrA, MtrB und MtrC formen einen sehr stabilen Komplex mit einer 1:1:1 Stöchiometrie. Das *c*-Typ Cytochrom OmcA interagiert mit MtrC und dient ebenfalls als terminale Reduktase. Im Genom von *S. oneidensis* ist der Komplex in der Reihenfolge *mtrC-mtrA-mtrB* unter einem Promotor lokalisiert. Das *omcA* Gen ist unter einem eigenen Promotor lokalisiert und wird daher unabhängig exprimiert (Abbildung 4) (Beliaev *et al.*, 2001).

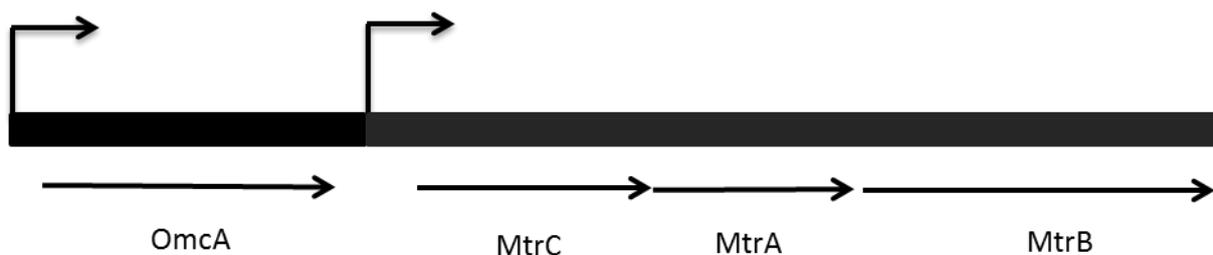


Abbildung 4: Gencluster des MtrABC Komplexes und dem äußeren Membrancytochrom OmcA.

OmcA: OmcA (outer membrane cytochrome A) ist ein 79 kDa großes decahäm *c*-Typ Cytochrom, welches in der äußeren Membran mit der Orientierung nach außen verankert ist. Es ist eine terminale Reduktase für die Reduktion von Fe(III) und Mn(IV) Spezies. Eine Deletion des *omcA* Gens zeigt einen deutlichen Effekt in der Reduktion von Mangan, jedoch nur schwach in der Reduktion von Eisen (Bucking *et al.*, 2010; Coursolle & Gralnick, 2012). Es

konnte nachgewiesen werden, dass OmcA eine hohe Affinität für die Bindung an Hämatit besitzt (Shi *et al.*, 2009).

MtrC: MtrC (metal reducing protein C) ist ein 71 kDa großes decahäm c-Typ Cytochrom und die terminale Reduktase bei der dissimilatorischen Eisenatmung. Durch Versuche mit Zellen bei denen *mtrC* deletiert wurde konnte gezeigt werden, dass MtrC hauptverantwortlich für die Reduktion von Eisen, aber nicht von Mangan ist (Myers & Myers, 2002b). Durch die Kristallisation von MtrF, einem Protein welches homolog zu MtrC ist, konnte viel über die Funktion der einzelnen Bereiche innerhalb des Proteins herausgefunden werden (Abbildung 5). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Hämgruppe fünf für die Reduktion durch direkten Kontakt nötig ist. An den Seiten des Moleküls befinden sich zwei Flavin-Bindemotive (Hämgruppe zwei und sieben), hierrüber können Flavine als Shuttle für die Reduktion genutzt werden (Clarke *et al.*, 2011). Es konnte festgestellt werden, dass eine *S. oneidensis* Zelle ohne äußere Membrancytochrome nicht mehr in der Lage ist Riboflavin zu reduzieren (Richter *et al.*, 2012). MtrC ist über einen Lipidanker in der Membran verankert, welcher sich N-terminal direkt hinter der Sekretionssequenz befindet. Das Motiv für einen Lipidanker besteht aus 4 Aminosäuren mit der Consensus Sequenz [LVI][ASTVI][GAS][C] (Inouye *et al.*, 1977). Die Sekretionssequenz wird im Cytoplasma erkannt und das Protein kann durch die innere Membran mithilfe des Sec-Systems ins Periplasma geleitet werden. Anschließend wird die Sekretionssequenz im Periplasma abgetrennt (Sugai & Wu, 1992). Im Periplasma wird MtrC von den Proteinen für die Maturation erkannt, die Hämgruppen können eingebaut und das Protein vollständig gefalten werden. Für die Sekretion nach außen und die korrekte Orientierung ist das Typ-II-Sekretionssystem zuständig (Richter *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2008). Wie die Erkennung von MtrC durch das Typ-II-Sekretionssystem verläuft und wie der genaue Mechanismus zur Einlagerung in die äußere Membran ist, konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

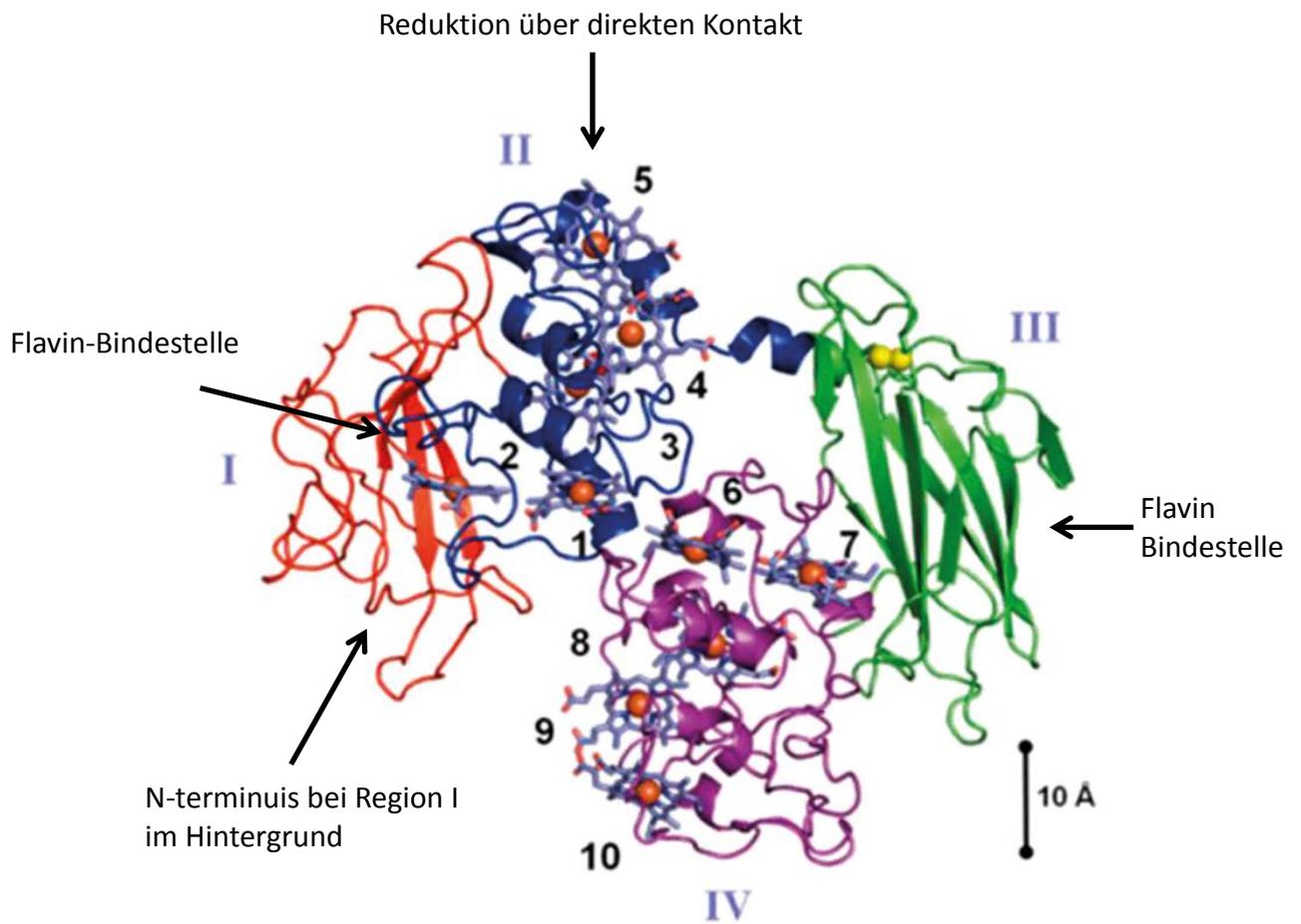


Abbildung 5: Die Kristallstruktur von MtrF mit Beschriftung der Funktion einzelner Bereiche. Zur Orientierung sind die 10 Hämgruppen durchnummeriert. Die Hämgruppe 5 ist für die Reduktion durch den direkten Kontakt verantwortlich. Die Hämgruppen 2 und 7 sind für die Reduktion von löslichen Huminsäuren verantwortlich, welche als Shuttle dienen können wie z. B. Flavine. Die Elektronen können von 8 auf 6 und von 1 auf 3 übertragen werden und somit das Flavin-Bindemotiv umgehen. Der N-Terminus, an welchem der Lipidanker lokalisiert wäre, ist in der Kristallstruktur nicht enthalten. Der Bereich IV ist in der Pore von MtrB lokalisiert und nimmt die Elektronen aus dem Periplasma auf. Die beiden gelben Punkte in Region drei stellen zwei Cysteine dar, welche nicht mit einem Häm Kofaktor binden (Clarke *et al.*, 2011).

MtrA: MtrA (metal reducing protein A) ist ein 32 kDa im Periplasma lokalisiertes decahäm *c*-Typ Cytochrom (Beliaev *et al.*, 2001; Pitts *et al.*, 2003). MtrA kann durch die Bindung an MtrB auch in der äußeren Membran nachgewiesen werden (White *et al.*, 2013). Es ist möglich, dass MtrA Elektronen von CymA aufnimmt und auf MtrC überträgt (Beliaev *et al.*, 2001), da aber in einer $\Delta stc\Delta fccA$ Mutante festgestellt werden konnte, dass die Eisenreduktion drastisch abnimmt, werden die Elektronen *in vivo* von CymA nicht direkt auf MtrA, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist, übertragen (Sturm *et al.*, 2015). Eine

Elektronenübertragung zwischen FccA und MtrA konnte in beide Richtungen gezeigt werden (Schuetz *et al.*, 2009). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass MtrA oxidiert wird wenn die Zelle Eisenchelate in das Periplasma aufnehmen kann (Pitts 2003). Weiterhin spielt MtrA eine wichtige Rolle bei der Integration von MtrB (metal reducing protein B) in die äußere Membran (Schicklberger *et al.*, 2011).

MtrB: MtrB ist ein 76 kDa β -barrel Protein, welches die äußere Membran durchspannt und die Elektronenübertragung durch die äußere Membran auf die terminalen Reduktasen unterstützt (Beliaev & Saffarini, 1998; Shi *et al.*, 2012). Es ist notwendig für die korrekte Lokalisation von MtrC und OmcA (Myers & Myers, 2002b). MtrB benötigt MtrA für den Schutz vor dem Abbau durch die periplasmatische Protease DegP. In einer $\Delta mtrA$ Mutante kann MtrB nicht mehr nachgewiesen werden, obwohl es exprimiert wird. Die Expression von MtrB ohne MtrA kann in einer $\Delta degP \Delta mtrA$ Doppelmutante bestätigt werden (Schicklberger *et al.*, 2011). Dieses Verhalten ist für ein OMP ungewöhnlich, da für β -barrel Proteine bisher ein einheitlicher Mechanismus für die Integration in die äußere Membran angenommen wurde.

4 Einbau von OMPs in die äußere Membran

Der Transport von OMPs durch das Periplasma, ihre Faltung und Integrierung in die äußere Membran ist bei *E. coli* bereits gut erforscht. Die äußeren Membranproteine werden, wie in Abschnitt II. 3.3 für MtrC beschrieben, nach der Expression im Cytoplasma an der Sekretionssequenz erkannt und über das Sec-System in ungefaltetem Zustand in das Periplasma transportiert. Um eine Aggregation zu verhindern muss das OMP direkt mit einem Chaperon im Periplasma interagieren. Für das Geleit der OMPs durch das Periplasma und deren Faltung sind drei Proteine verantwortlich. Die zwei Chaperone SurA (survival protein A) und Skp (seventeen kilodalton protein) und die Protease DegP, die in sehr seltenen Fällen auch die Funktion eines Chaperon ausübt. Das DegP als Chaperon fungieren kann, konnte für Mals nachgewiesen werden (Spiess *et al.*, 1999). Der Transport von OMPs durch das Periplasma wird in zwei Wege eingeteilt, den SurA Weg und den Skp/DegP Weg

(Abbildung 6) (Sklar *et al.*, 2007). Sobald beide Wege ausgeschaltet sind, hat das OMP keine Möglichkeit mehr korrekt in die äußere Membran eingebaut zu werden und bildet Aggregate, welche zu einer Stressreaktion der Zelle führen. Die Expression von DegP ist durch den σ^E -Faktor reguliert, welcher durch eine Stressreaktion der Zelle hervorgerufen wird. Eine Doppelmutante in beiden Wegen, also eine $\Delta surA\Delta degP$ oder eine $\Delta surA\Delta skp$ sind letal für die Zelle (Rizzitello *et al.*, 2001). Die Doppelmutante $\Delta degP\Delta skp$ ist hingegen nicht letal (Sklar *et al.*, 2007).

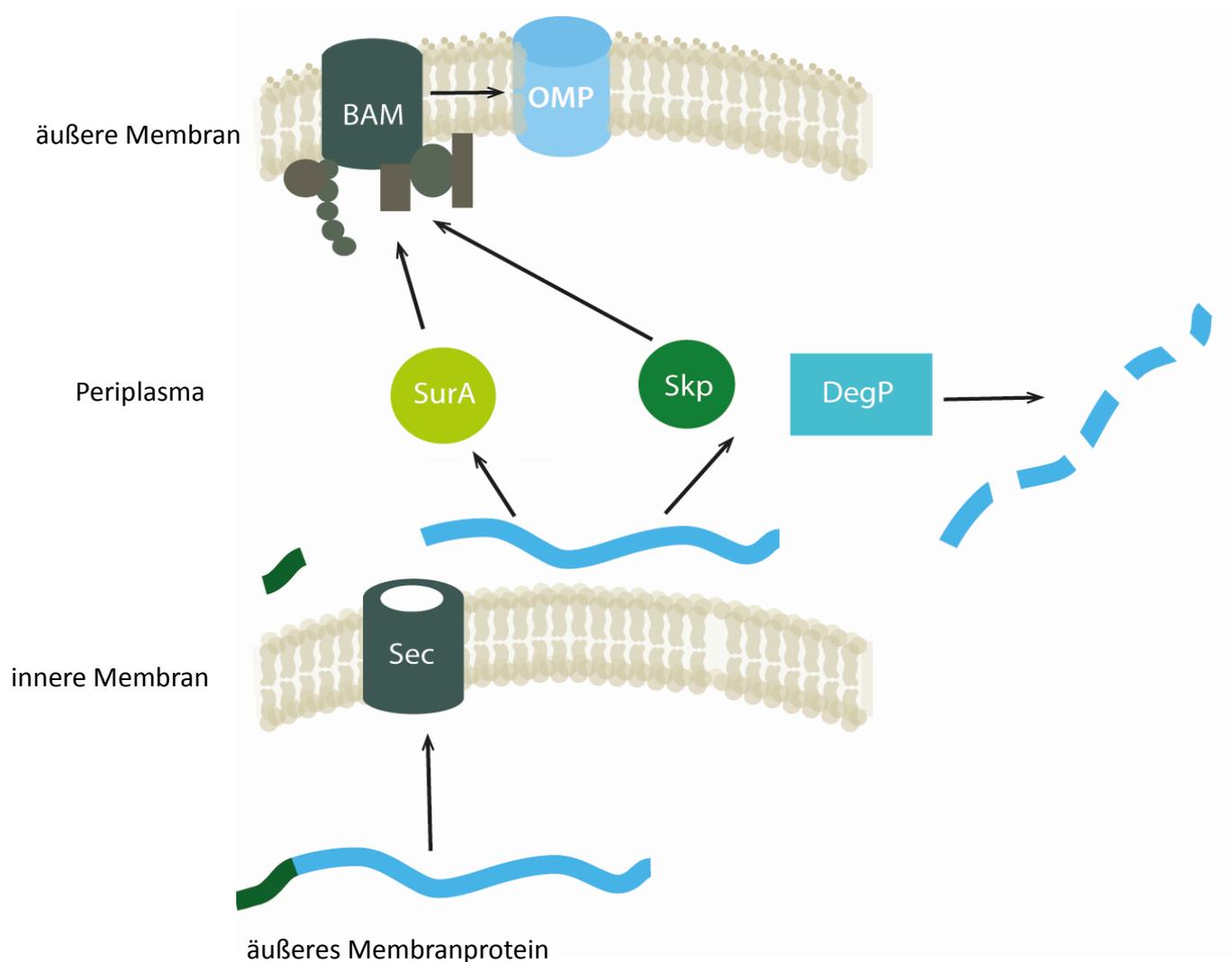


Abbildung 6: Darstellung der Integration von OMPs in die äußere Membran. Das OMP wird durch das Sec-System vom Cytoplasma in das Periplasma transportiert. Dort interagiert es mit den Chaperonen SurA oder Skp, um eine Aggregation oder falsche Faltung zu verhindern oder wird von DegP degradiert. Der Bam-Komplex ist für den Transport der OMPs aus dem Periplasma und die Integration in die äußere Membran notwendig.

SurA ist ein 47 kDa Protein und das vorrangige periplasmatische Chaperon, um OMPs in Lösung zu halten und korrekt zu falten. Skp ist nur 17 kDa groß. Die Form von Skp ähnelt einer Qualle, bestehend aus einem Kopf und drei Tentakeln (Walton & Sousa, 2004). Eine hohe Beweglichkeit der Tentakel erlaubt es Skp auch OMPs zwischen 18 und 89 kDa bei der Faltung zu unterstützen (Qu *et al.*, 2007). Die Eigenschaften und Funktionen der Chaperone, insbesondere von SurA, wurde Mitte der 1990er Jahre entdeckt und untersucht (Missiakas *et al.*, 1996; Rouviere & Gross, 1996). Die Funktion von Skp war lange Zeit unklar aufgrund der geringen phänotypischen Relevanz einer Δskp Mutante (Chen & Henning, 1996). Damit OMPs richtig durch das Periplasma zur äußeren Membran transportiert werden, benötigen sie ein Signal für die korrekte Lokalisation des Proteins in der äußeren Membran. Dieses Signal ist eine aromatische Aminosäure am C-Terminus des Proteins. Das Signal besteht meistens aus einem Phenylalanin als letzte Aminosäure, es kann sich aber auch um eine der anderen aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan oder Histidin handeln (de Cock *et al.*, 1997). Nachdem das OMP durch das Periplasma geleitet wurde, benötigt es für die Integration in die äußere Membran einen hoch konservierten Proteinkomplex. Für diesen Vorgang ist der Bam-Komplex (**B**eta-barrel **a**ssembly **m**achine) zuständig. Er besteht aus fünf Proteinen. Dem BamA, welches ein β -barrel Protein ist und den vier Lipoproteinen BamBCDE. BamA enthält eine periplasmatische Domäne, welche fünf POTRA (**p**olypeptide **t**ranslocation **a**ssociated) Domänen enthält (Kim *et al.*, 2007). Der gesamte Vorgang der Interaktion des Bam-Komplexes mit den OMPs, dem Chaperon und dem Einbau in die äußere Membran ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Äußere Membranproteine sind zwar auch in der Lage sich ohne den Bam-Komplex in die äußere Membran zu integrieren, aber der Vorgang ist aufgrund der Ineffizienz in vivo nicht von Bedeutung (Hagan *et al.*, 2010).

5 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einbau der einzelnen Komponenten des MtrABC-Komplexes und die Interaktion zwischen den einzelnen Proteinen untersucht werden.

Der Schwerpunkt sollte dabei auf dem Einbau des β -barrel Proteins MtrB und dem Einfluss der Chaperone SurA und Skp auf die Faltung von MtrB liegen. Es sollte zudem untersucht werden, ob der Einfluss von MtrA nur den Schutz vor der Protease DegP beinhaltet (Schicklberger *et al.*, 2011) oder ob MtrA noch weitere Funktionen aufweisen kann. In diesem Zusammenhang sollte auch die Interaktion zwischen MtrA und MtrB genauer beleuchtet werden. Dazu gehörte auch die Untersuchung möglicher Interaktionspunkte zwischen MtrA und MtrB.

Des Weiteren sollte MtrC näher untersucht werden. Hierfür wurden spezielle konservierte Segmente in dem Protein erforscht und mit Lipoproteinen verschiedener eisenreduzierender und nicht eisenreduzierender Bakterien verglichen.

III. Material und Methoden

1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anderweitig angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Applichem (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle Enzyme wurden von New England Biolabs (Schwalbach), Fermentas (Thermo Scientific, Schwerte) oder Life Technologies (Darmstadt) bezogen.

6 Verwendete Stämme und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Nr.	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
JG7	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Wildtyp	(Myers & Neelson, 1988)
JG22	<i>E. coli</i> DH5 α Z1	<i>aci_q</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>Sp_R</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15	(Lutz & Bujard, 1997)
JG23	<i>E. coli</i> DH5 α Z1 pMQ150	JG22/ pMQ150	(Shanks <i>et al.</i> , 2006)
JG52	<i>S. oneidensis</i> Δ <i>mtrA</i>	JG7/ Δ <i>mtrA</i>	(Schuetz <i>et al.</i> , 2009)
JG55	<i>S. oneidensis</i> Δ <i>mtrB</i>	JG7/ Δ <i>mtrB</i>	(Schuetz <i>et al.</i> , 2009)
JG98	<i>E. coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ M15 <i>RP4-1360</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341</i> ::[<i>ermpir</i> (wt)]	(Saltikov & Newman, 2003)
S12	<i>E. coli</i> WM3064 pMQ150 Δ <i>skp</i>	JG98/ pMQ150 Δ <i>skp</i>	Diese Arbeit
S13	<i>E. coli</i> WM3064 pMQ150 Δ <i>surA</i>	JG98/ pMQ150 Δ <i>skp</i>	Diese Arbeit
S25	DH5 α pDHFR <i>mtrB</i> _{V5} (ohne sec seq)	JG22/ pDHFR <i>mtrB</i> _{V5} (fehlende Sekretionssequenz)	Diese Arbeit
JG132	<i>S. oneidensis</i> Δ OMC	JG7/ Δ <i>mtrD-F</i> Δ <i>omcA</i> Δ <i>mtrC</i> Δ SO1659 Δ SO2931	(Bücking <i>et al.</i> , 2010)
JG138	<i>S. oneidensis</i> Δ OMC pBAD <i>mtrC</i>	JG132/ pBAD202 <i>mtrC</i>	Diese Arbeit
JG192	<i>S. oneidensis</i> Δ OMC Δ <i>fccA</i>	JG7/ Δ <i>mtrD-F</i> Δ <i>omcA</i> Δ <i>mtrC</i> Δ SO1659 Δ SO2931 Δ <i>fccA</i>	(Bücking, 2011)
S11	<i>S. oneidensis</i> Δ <i>mtrA</i> Δ <i>degP</i> <i>mtrB</i> _{strep}	JG7/ Δ <i>mtrA</i> Δ <i>degP</i> <i>mtrB</i> _{strep}	(Schickelberger, 2010)
S22	<i>S. oneidensis</i> Δ <i>mtrA</i> pBAD <i>mtrA</i> Q332L,R333G	JG52/ pBAD202 _{onestrep} <i>mtrA</i> Q332L,R333G	Diese Arbeit
S26	<i>S. oneidensis</i> Δ <i>skp</i> <i>mtrB</i> _{strep}	JG7/ Δ <i>skp</i> <i>mtrB</i> _{strep}	Diese Arbeit

Nr.	Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
S27	<i>S. oneidensis</i> $\Delta degP\Delta mtrA \Delta skp mtrB_{strep}$	JG7/ $\Delta degP\Delta mtrA \Delta skp mtrB_{strep}$	Diese Arbeit
S28	<i>S. oneidensis</i> $\Delta surA mtrB_{strep}$	JG7/ $\Delta surA mtrB_{strep}$	Diese Arbeit
S35	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$ pBADmtrA P325A	JG52/ pBAD202 _{onestrep} mtrA P325A	Diese Arbeit
S37	<i>S. oneidensis</i> $\Delta OMC\Delta fccA$ pBADmtrC PM 5-9	JG192/ pBAD202mtrC (5 CGGSD 9→ 5 VVGAI 9)	Diese Arbeit
S38	<i>S. oneidensis</i> $\Delta OMC\Delta fccA$ pBADmtrC D9G	JG192/ pBAD202mtrC D9G	Diese Arbeit
S43	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$ pBADmtrA P325stopp	JG52/ pBAD202 _{onestrep} mtrA P325stopp	Diese Arbeit
S47	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA\Delta skp mtrB_{strep}$	JG7/ $\Delta mtrA\Delta skp mtrB_{strep}$	Diese Arbeit
S55	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrB$ pBADmtrB C45A	JG55/ pBAD202mtrBC45A	Diese Arbeit
S56	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrB$ pBADmtrB C42A	JG55/ pBAD202mtrBC42A	Diese Arbeit
S57	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrB$ pBADmtrB C42/45A	JG55/ pBAD202mtrBC42/45A	Diese Arbeit
S58	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$ pBADmtrA _{His}	JG52/ pBAD202mtrA _{His}	Diese Arbeit
S59	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrB$ pBADmtrB	JG55/ pBAD202mtrB	Diese Arbeit
S69	<i>S. oneidensis</i> ΔOMC pBADmtrC PM	JG132/ pBAD202mtrC (5 CGGSD 9→ 5 VVGAI 9)	Diese Arbeit
S77	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrB$ pBADmtrB PM(432-439)	JG55/ pBAD202mtrB (432DRETTDE439→ 432AVKPRMK439)	Diese Arbeit
S80	<i>S. oneidensis</i> ΔOMC pBADmtrC D9G	JG132/ pBAD202mtrC D9G	Diese Arbeit

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz
pMQ150	<i>nptII</i> , R6K-ori, <i>ura3</i> , <i>sacB</i>	(Shanks <i>et al.</i> , 2006)
pMQ150_surA	<i>nptII</i> , R6K-ori, <i>ura3</i> , <i>sacB</i> Δ <i>surA</i>	Diese Arbeit
pMQ150_skp	<i>nptII</i> , R6K-ori, <i>ura3</i> , <i>sacB</i> Δ <i>skp</i>	Diese Arbeit
pDHFR	<i>bla</i> , T7-Promotor	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
pDHFR mtrB (ohne sec seq)	<i>bla</i> , T7-Promotor mit <i>mtrB</i> ohne Sekretionssequenz	Diese Arbeit
pBAD202	Kan ^R , P _{Ara}	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pBAD_mtrA _{His}	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrA</i> _{His}	Diese Arbeit
pBADonestrep_mtrA	Kan ^R , P _{Ara} <i>onestrep</i> <i>mtrA</i>	(Schütz, 2009)
pBAD_mtrB	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrB</i>	Diese Arbeit
pBADmtrB C45A	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrB</i> C45A	Diese Arbeit
pBADmtrB C42A	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrB</i> C42A	Diese Arbeit
pBADmtrB C42/45A	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrB</i> C42/45A	Diese Arbeit
pBADmtrC	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrC</i>	Diese Arbeit
pBADmtrC D9G	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrC</i> D9G	Diese Arbeit
pBADmtrC PM5-9	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrC</i> (5 CGGSD 9→5 VVGAI 9)	Diese Arbeit
pBADonestrep_mtrA P325A	Kan ^R , P _{Ara} <i>onestrep</i> <i>mtrA</i> P325A	Diese Arbeit
pBADonestrep_mtrA P325stopp	Kan ^R , P _{Ara} <i>onestrep</i> <i>mtrA</i> P325stopp	Diese Arbeit
pBADonestrep_mtrA Q332L,R333G	Kan ^R , P _{Ara} <i>onestrep</i> <i>mtrA</i> Q332L,R333G	Diese Arbeit
pBADmtrB _{V5}	Kan ^R , P _{Ara} <i>mtrB</i> _{V5}	Diese Arbeit

7 Kultivierung und Anzucht der Stämme

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte aerob immer in LB-Medium (

Tabelle 5). Die *S. oneidensis* Stämme bei 30°C, *E. coli* bei 37°C unter ständigem Schütteln (180 rpm) in einem Schüttelinkubator (Brunswick, Edison, USA). Um Platten herzustellen wurde das Medium mit 2 % Agar-Agar versetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung von LB-Medium in einem Liter.

Substanz	Menge für 1 L
NaCl	5 g
Trypton/Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
dH ₂ O	Add. 1000 ml

Für die anaerobe Anzucht wurde M4-Medium verwendet. Als Elektronenakzeptor wurde entweder Eisencitrat oder Fumarat verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung des M4-Mediums zur anaeroben Anzucht der Bakterien.

Substrat	Konzentration
Grundmedium	
K ₂ HPO ₄	1,27 mM
KH ₂ PO ₄	0,73 mM
HEPES	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	9 mM
Caseinhydrolysat	0,1 %
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Spurenelemente	
Na ₂ EDTA	67,2 µM
MnSO ₄	1,3 µM
FeCl ₂	5,4 µM
CoCl ₂	5 µM
ZnSO ₄	1 µM
CuSO ₄	0,2 µM
H ₃ BO ₃	56,6 µM
Na ₂ MoO ₄	3,9 µM
NiCl ₂	5 µM
Na ₂ SeO ₄	1,5 µM
Elektronendonator	
D,L-Lactat	50 mM
Verschiedene Elektronenakzeptoren	
Fumarat	100 mM
Eisencitrat	50 mM

Um zu gewährleisten, dass das Medium anaerob ist, wurde eine cyclische Begasung mit Stickstoff und anschließendem Vakuum ziehen (15-mal) durchgeführt. Dafür wurde die Flasche mit einem Gummistopfen verschlossen.

8 Molekularbiologische Methoden

8.1 Isolierung chromosomaler DNA

Als Template für die Amplifikation bestimmter Bereiche aus dem Genom von *S. oneidensis* wurde chromosomale DNA genutzt.

Tabelle 7: Für die Isolierung der chromosomalen DNA verwendete Lösungen.

Puffer	Substrat	Konzentration
Resuspensionspuffer (pH 8)	TRIS	10 mM
	EDTA	1 mM
	Sucrose	0,35 mM
Lyselösung (pH 8)	TRIS	50 mM
	NaCl	0,15 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	1 %
TE-Puffer (pH 8)	TRIS	10 mM
	EDTA	1 mM

Die Zellen (ca. 3 g) wurden in 25 ml Resuspensionspuffer gelöst und Lysozym zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Zu 25 ml von der Lyselösung wurden 12,5 ml Na₂ClO₄ (5 M), 2 ml β-Mercaptoethanol und 125 µl Proteinase K Lösung bei 50 °C gemischt. Die entstandene Lösung und die Zellsuspension werden gemischt und bei 5 °C inkubiert (1-3 h). Der Aufschluss der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach der Lyse der Zellen wurden 15 ml Phenol/Chlorophorm Mischung (1:1) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die Zellreste loszuwerden, wurde die Lösung zentrifugiert (10 min, 4 °C, 25000 g) und der Überstand in ein DNase freies GSA-Röhrchen überführt. Der Schritt wurde

wiederholt, aber bei 37 °C für 20 min geschwenkt. Die Lösung wurde erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand in einen Erlenmeyerkolben überführt. Nach Zugabe des 0,6-fachen Volumens an Isopropanol wurde die DNA in Form von Schlieren sichtbar und konnte mit einem Glashaken abgenommen und in einen neuen Erlenmeyerkolben gegeben werden. Die DNA wurde zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer gelöst und mit einer RNase eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 5 ml einer Chlorophorm/Isoamylalkohol Mischung (1:1) zugegeben und bei 9000 g, 4 °C und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem 10 % (v/v) einer 3 M Na-Acetat-Lösung versetzt und durch das doppelte Volumen von Ethanol wurde die DNA gefällt. Die DNA wurde erneut mit einem Glashaken abgenommen und in 1 ml TE-Puffer gelöst.

8.2 Isolierung von Plasmiden

Die Plasmide wurden mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Miniprep KIT der Firma Promega (Mannheim) isoliert. Das Volumen zur Elution des Plasmides wurde je nach benötigter Konzentration angepasst.

8.3 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Nr.	Sequenz 5' → 3'	Primernamen
1	TAGGGTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATAT GGCTGATGGTTATGGTCTAGC	mtrBV5 invitro for
2	TTAAAGGCCTCCTGCAGGTTAACCTTACTCGAGAATCCCGGGATCCTT ATTACGTAGAATCGAGACC	mtrBV5 invitro rev
3	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG_ATGGGTTGTTACCAGTGCTA	surA UP for überlapp
4	TGACCTTAGAACGTGCCAAGGATTTTGTGG_GCTAAATTGACCACTAAACG	surA UP rev Überlapp

5	CCACAAAATCCTTGGCACGT	surA DOWN for
Nr.	Sequenz 5' → 3'	Primername
6	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG_GGTACTATGACCTTAATGAG	surA DOWN rev Überlapp
7	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG_AGTGAACATTATGATAC AGG	skp UP for Überlapp
8	GAATATAACAAAGGTAACAAGGAGTCTATT_AGCCTTAAGCAAAGGCA AG	skp UP rev Überlapp
9	AATAGACTCCTTGTTACCTT	skp DOWN for
10	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG_TCCGTGGTAGTGAACCGT	skp DOWN rev Überlapp
11	ACAGACATAAATCTTAGGTGA	surA Primer for Test
12	AGTTCAGCTACCGTTATGTA	surA Primer rev Test
13	GACTCTATACCAATACGC	skp Primer for Test
14	AACGGTTATGGTCAATATAA	skp Primer rev Test
15	CTGGCGAAAGGGGGATGTG	pMQ150 Test for
16	CATTAGGCACCCCAGGCTTTAC	pMQ150 Test rev
17	CATGCCATGGCATGATGAAATTTAAACTCAATTTGAT	mtrB NcoI for
18	CCGGCGCGCCGTTTAAACTTAGAGTTTGTAACCTCATGC	mtrB PmeI rev
19	CAGGTTTCATGGTTCTAACCATTAATCTGGCAAG	MtrA P325Stopp for
20	GCTGTAATAGCTTGCCAGATTAATGGTTAGAAC	MtrA P325Stop rev
21	CTTGCCAGATGCATGGTTAGAACCATGAACCTG	mtrA P325A rev
22	GTTCTAACCATGCATCTGGCAAGCTATTACAG	mtrA P325A for
23	TTTGGGCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATAC CATGAAGAACTGCCTAAAAATG	MtrA His for
24	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTT	MtrA His rev

Nr.	Sequenz 5' → 3'	Primername
	TTAGTGATGGTGATGGTGATGGCGCTGTAATAGCTTGCCAG	
25	TCGCCCTTCTATTAGCCCAGTAATAGCTTGCCAGATGGATGGTTAG	mtrA Q332L, R333G rev
26	TGGCAAGCTATTACTGGGCTAATAGAAGGGCGAGCTCAAG	mtrA Q332L, R333G for
27	CCGCATGGAGCTGTAAAGGCGCCGTCGTTGAAAC	mtrB C45A for
28	GATGTGCCCGTTTCAACGACGCGCCTTTACAGC	mtrB C45A rev
29	GAAAAAGTGAAATTATCCGCATGGAGCGCTAAAGGCTGCGTCGTTG	mtrB C42A for
30	CCGTTTCAACGACGCAGCCTTTAGCGCTCCATGCGGATAATTTTAC	mtrB C42A rev
31	GAAATTATCCGCATGGAGCGCTAAAGGCGCCGTCGTTGAAAC	mtrB C42/45A for
32	CAACGACGGCGCCTTTAGCGCTCCATGCGGATAATTTCACTTTTTTC	mtrB C42/45A rev
33	TGCCGTTATTACCGATCGCTCCCACCACGCCGTTAAGGCCATTGTGAC	mtrC PM 5-9 rev
34	CCTTAACCGGCGTGGTGGGAGCGATCGGTAATAACGGCAATGATGGTA G	mtrC PM 5-9 for
35	GGCTGTGGTGAAGCGGTGGTAATAACGGC	MtrC D9G for
36	CATTGCCGTTATTACCACCGCTTCCACCACAG	MtrC D9G rev
37	TATCAAGCCGTGAAACCACGGATGAAGAATACCGTTTGGG	MtrB PM intern for
38	CCCAAACGGTATTCTTCATCCGTGGTTTACGGCTTGATA	MtrB PM intern rev
39	GATTAGCGGATCCTACCTGAC	pBAD Test for
40	CTCTCATCCGCCAAAACAGC	pBAD Test rev
41	TTTTGGGCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATA CCCATGGGCAACGCACAAAAATC	mtrC pBAD invitro for
42	TCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACC GTTTTTACATTTTCACTTTAGTGTG	mtrC pBAD invitro rev

8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für analytische Untersuchungen wurde der MangoMix® (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Hiermit konnte die Ligation von PCR-Produkten in einem Plasmid oder genetische Mutationen festgestellt werden. Der MangoMix® ist eine 2-fache Stocklösung mit einer Taq-Polymerase. Primer und Stocklösung wurden im Verhältnis 2:1 gemischt und entweder eine Kolonie oder Template zugegeben.

Für eine präparative PCR wurde die Phusion® High Fidelity Polymerase (NEB, Schwalbach) verwendet. Der Vorteil dieser Polymerase liegt in der proof reading Funktion, wodurch die Fehlerrate verringert wird. Die Zusammensetzung der Lösungen für die Reaktion im 50 µl Maßstab ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Zusammensetzung einer präparativen PCR-Reaktion.

Substanz	Menge
Primer for (2 µM)	12,5 µl
Primer rev (2 µM)	12,5 µl
Puffer (5fach)	10 µl
dH ₂ O	11,5 µl
DMSO	1,5 µl
dNTP-Mix	1 µl
iProof (2 U/µl)	1 µl
Template	1 µl

Die Annaeling Temperatur wurde für die verwendeten Primer angepasst. Eine Standardreaktion fand bei 55 °C statt und ist in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: PCR-Programm einer präparativen PCR-Reaktion.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	95 °C	2:30 min	Initiale Denaturierung
2	95 °C	30 s	Denaturierung
3	55 °C	30 s	Annaeling
4	72 °C	30 s/kb	Elongation
30 malige Wiederholung ab Schritt 2			
5	72 °C	5 min	Finale Elongation
6	4 °C	∞	Lagerung

8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Hierfür wurde 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (Tabelle 11) gelöst und mit 0,5 µg/ml Midori green (Nippon Genetics, Düren) für die Färbung der DNA bei 312 nm versetzt. Bei Verwendung des MangoMix® ist der Ladepuffer schon enthalten. Bei der iProof wurde ein 6x Ladepuffer verwendet (Tabelle 12). Als Größenmarker wurde ein 1 kb Marker oder ein 50 bp Marker (Thermo Scientific, Dreieich), abhängig von der Größe des PCR Produktes, genutzt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Substanz	Konzentration
TRIS (pH 8)	40 mM
Acetat	20 mM
EDTA	1 mM

Tabelle 12: Zusammensetzung des 6x-Ladepuffers.

Substanz	Menge (Gesamtvolumen 28,5 ml)
Xylene cyanol	0,05 g
Orange G	0,05 g
Glycerin	12 ml
TAE-Puffer (50x)	1,5 ml
dH ₂ O	15 ml

8.6 Isothermale in vitro Ligation

Die isothermale in vitro Ligation beruht auf einer Methode nach Gibson (Gibson *et al.*, 2009). Es werden PCR Produkte hergestellt, welche überlappende Bereiche zu einem bestimmten Bereich im Vektor enthalten, um sie anschließend zu ligieren. Die T5 Exonuklease bildet, von 5' nach 3' ausgehend, einzelsträngige DNA. Die homologen Bereiche der einzelsträngigen DNA können mithilfe der Taq-Ligase zu einem Doppelstrang ligiert werden. Die Phusion® Polymerase kann die entstandenen Lücken wieder schließen (Abbildung 7). Die Polymerase arbeitet schneller als die Exonuklease, wodurch ein kompletter doppelsträngiger Vektor hergestellt wird. Durch den Doppelstrang wird der Exonuklease ein freier 5' Angriffspunkt verwehrt. Es wurden immer 15 µl des Reaktionsmastermixes (Tabelle 14) und 5 µl der zu ligierenden Elemente eingesetzt. Die Reaktion läuft bei 55 °C für 1,5 Stunden ab.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionspuffers (5x) für die in vitro Ligation.

Substanz	Konzentration
TRIS (pH 7,5)	500 mM
MgCl ₂	50 mM
dNTPs	1 mM
DTT	50 mM
NAD	5 mM
PEG-8000	25 % (w/v)
dH ₂ O	250 µl

Tabelle 14: Der verwendete Reaktionsmastermix der in vitro Ligations.

Substanz	Menge
Reaktionspuffer (5x; Tabelle 13)	80 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	5 µl
Tag DNA-Ligase (40 U/µl)	40 µl
T5 Exonuklease (0,1 U/µl)	16 µl
dH ₂ O	239 µl

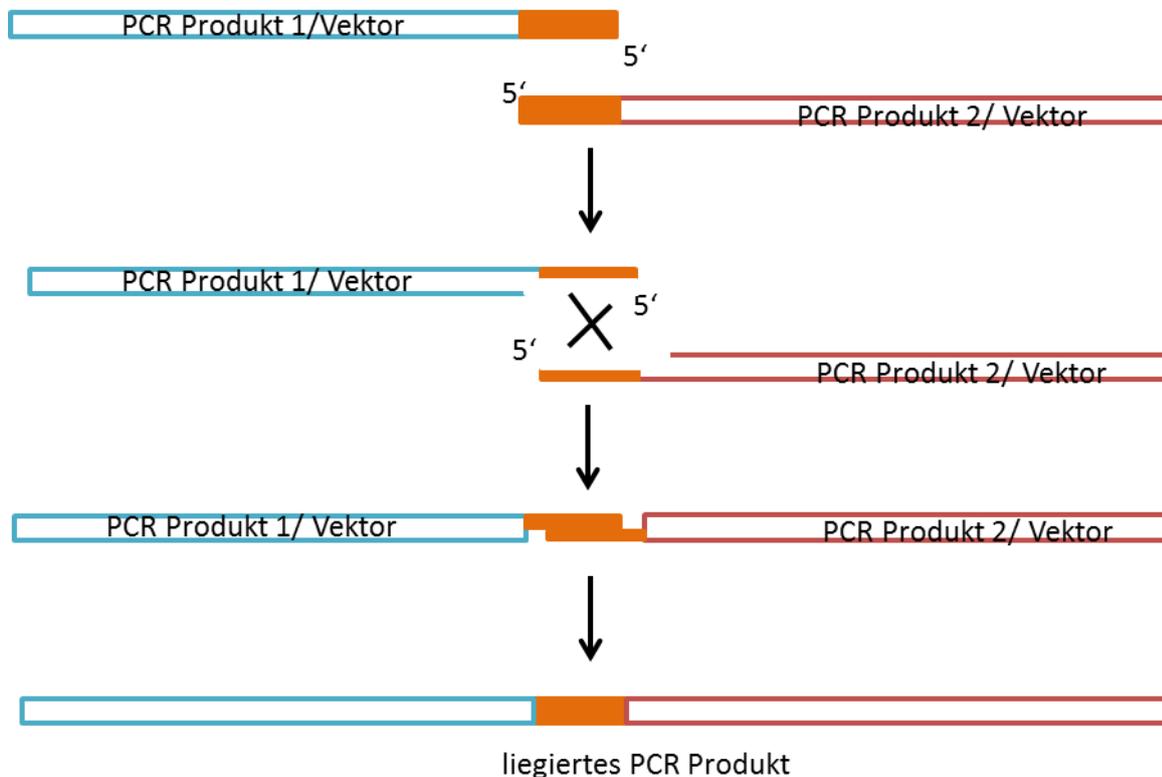


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise der isothermalen in vitro Ligationsfunktion. Mit orange ist die homologe Überlappung gekennzeichnet. In rot und blau sind Vektor bzw. ein PCR Produkt gekennzeichnet.

8.7 Transformation der elektrisch kompetenten Zellen

Das gewünschte Plasmid wurde über eine elektrische Transformation in die gewünschten *E. coli* oder *S. oneidensis* Zellen eingebracht. Für die Elektroporation mussten die Zellen

vorbereitet werden. Sie wurden über Nacht in LB Medium (Tabelle 5) angezogen und anschließend 1 ml Vorkultur in 25 ml SOB-Medium (Tabelle 15) überführt. Nach ca. 3 h wurden die Zellen in der exponentiellen Phase für 20 min bei 4 °C gekühlt. Die Zellen wurden bei 5000 g für 10 min bei 4 °C in einer Eppendorf Zentrifuge pelletiert und in vorgekühltem und sterilem ddH₂O resuspendiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in einer entsprechenden Menge ddH₂O aufgenommen und auf Eis für die Weiterverarbeitung gelagert.

Tabelle 15: Zusammensetzung von einem Liter SOB-Medium.

Substanz	Menge (für 1 L)
Trypton	20 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g

Durch die kurzfristige Depolarisierung des Membranpotentials infolge eines elektrischen Impulses (1,8 kV, 5 ms) wird die Zelle dazu befähigt das gewünschte Plasmid aufzunehmen. Für diesen Vorgang wurden 120 µl der kompetenten Zellen mit 2 µl Plasmid in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) gemischt. Der elektrische Impuls wurde mit dem MicroPulser (Bio-Rad) über das Programm Ec1 hergestellt. Die Zellen wurden für die Regeneration direkt in SOC-Medium (Tabelle 16) überführt. *S. oneidensis* wurde für 12h bei 30 °C inkubiert. *E. coli* wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Selektion der gewünschten Stämme wurde das SOC-Medium auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Substanz	Konzentration
Glucose	20 mM
MgCl ₂	20 mM
gelöst in SOB-Medium	

8.8 Herstellung markerloser *S. oneidensis* Deletionsmutanten

Für den knock out bestimmter Gene wurde das pMQ150 Plasmid genutzt. Da dieses Plasmid für eine Transformation in *S. oneidensis* zu groß (leerer Vektor 8 kb) ist wurde es mittels Konjugation eingebracht. Es wurden zwei 500 bp große Fragmente, welche zu den Abschnitten vor und hinter dem entsprechenden Gen homolog sind, mit der in vitro Ligation (Abschnitt III. 8.6) in pMQ150 eingebracht. Das entstandene Konstrukt wurde in einen *E. coli* WM3064 Stamm über Elektroporation (Abschnitt III. 8.7) eingebracht. Der WM3064 Stamm ist ohne Diaminopimelinsäure (DAP) nicht zum Wachstum fähig. Der Stamm ist aber dazu in der Lage den R6K-ori (origin of replication) zu replizieren.

Für die Konjugation wurden die Übernachtskulturen des WM3064 Stammes, mit dem gewünschten pMQ150 Plasmid, und der gewünschte *S. oneidensis* Stamm mit LB-Medium gewaschen. Die gewaschenen Zellkulturen wurden gemischt und auf eine LB-Agar Platte mit enthaltenem DAP (0,3 mM) pipettiert. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert. Der entstandene Zellrasen wurde mit LB-Medium von der Platte gelöst und 1:5, 1:25 und 1:125 verdünnt. Von der Verdünnung wurden jeweils 100 µl auf einer LB Platte welche Kanamycin (25 µg/ml) enthielt ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zu dieser Platte wurde kein DAP zugegeben, damit der *E. coli* Stamm nicht mehr wachsen kann und nur noch der gewünschte *S. oneidensis* Stamm auf der Platte zu finden ist. *S. oneidensis* ist nicht fähig den R6K-Ori zu replizieren und muss daher das Plasmid über die homologen Bereiche in das Genom integrieren. Die Integration des Plasmides, welche als „first cross“ bezeichnet wird, wurde über „pick & patch“ getestet. Die Stämme werden zuerst auf einer Agarplatte mit Kanamycin und anschließend auf einer Platte mit 10 % Sucrose ausgestrichen. Aufgrund des *sacB* Gens, welches im pMQ150 Plasmid enthalten ist, wird das Wachstum mit Sucrose aufgrund der Bildung von Polymeren gehemmt. Die Zellen mit integriertem pMQ150 müssen daher mit Kanamycin fähig sein zu wachsen, auf den Platten mit Sucrose muss geringeres Wachstum zu erkennen sein. Die korrekte Integration wurde mit PCR getestet. Es wurde dafür ein pMQ150 Test Primer (Primer 15/16) und ein Primer,

welcher im Genom bindet verwendet. Die positiven Stämme wurden für den „second cross“ genutzt.

Die Stämme mit integriertem pMQ150 wurden über Nacht bei 30 °C in LB-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1:10 in frischem LB-Medium verdünnt und weitere 4 h inkubiert. Hiervon wurden 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen hergestellt, 50 µl auf LB Platten mit 10 % Sucrose ausplattiert und 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Deletion des pMQ150 wurde wieder über „pick & patch“ getestet. Hierfür wurden LB-Platten mit Kanamycin benutzt auf denen, ohne die im pMQ150 enthaltenen Resistenz, kein Wachstum mehr möglich ist und LB-Platten auf denen Wachstum mit oder ohne pMQ150 möglich ist. Die Zellen können beim entfernen des Vektors wieder wildtypischen genetischen Status erlangen oder das entsprechende Gen mit entfernen. Daher wurden die Stämme, welche nicht mehr fähig sind auf Kanamycin zu wachsen, durch PCR auf den Verlust des Genes getestet. Die dafür benötigten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Der Vorgang der Herstellung der makerlosen Mutanten ist in Abbildung 8 noch einmal schematisch dargestellt.

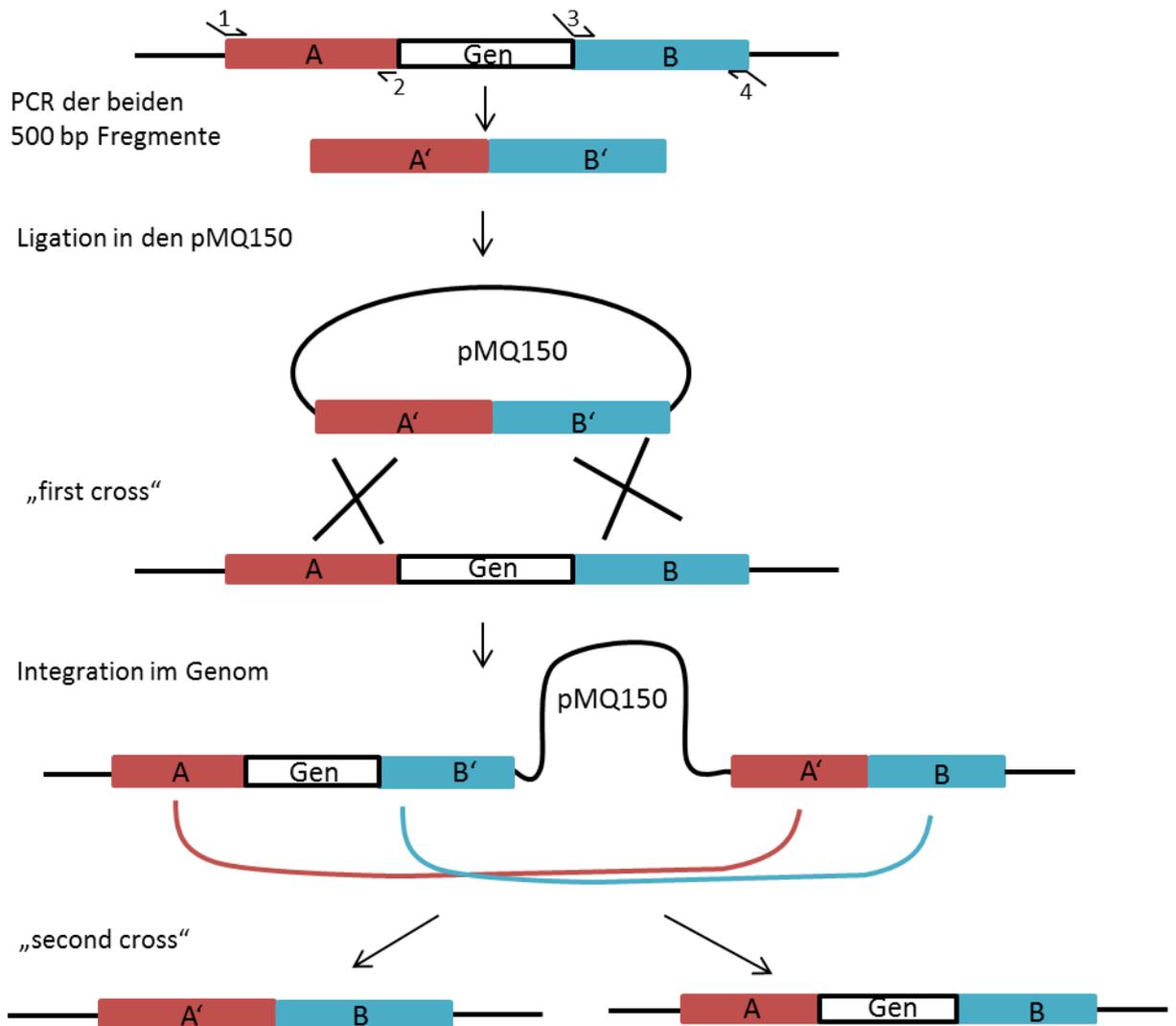


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Konjugation und Rekombination zur Herstellung markerloser Deletionen in *S. oneidensis*. Mit 1 bis 4 sind die jeweiligen Primer mit entsprechendem Überlapp gekennzeichnet.

8.9 Sequenzierung

Die DNA Sequenzen wurden anhand von Sequenzierungen auf ihre Basenabfolge hin analysiert. Dies wurde von der Firma Eurofines (Luxemburg) übernommen.

8.10 Herstellung der Punktmutationen

Die Punktmutationen in den Plasmiden wurden nach dem QuickChange® Protokoll der Firma Stratagene (La Jolla, USA) hergestellt. Die Primer wurden so abgeleitet, dass die Punktmutation im Primer enthalten ist und vor und hinter der Mutation 20 bis 25 bp

homolog zum Template enthalten sind. Die Primer sollten eine Gesamtlänge zwischen 30 und 50 bp haben. Das Pipettierschema für die Reaktion ist in Tabelle 17 aufgelistet. Das PCR Programm ist in

Tabelle 18 aufgelistet. Die Wiederholungen beziehen sich auf die Menge der Punktmutationen. Sollte nur eine Base ersetzt werden, wurden 12 Wiederholungen gewählt. Die Wiederholungen wurden je nach Menge der Mutationen angepasst. Das verwendete Template wurde mit dem DpnI Restriktionsenzym entfernt. Der Vorteil von DpnI ist, dass es nur methylierte DNA an der Basensequenz GATC schneidet. Das Template ist methyliert, da es aus einem Organismus über MiniPrep (Abschnitt III. 8.2) gereinigt wurde. Das entstandene PCR Produkt ist jedoch nicht methyliert und wird daher auch nicht abgebaut.

Tabelle 17: Pipettierschema für die Punktmutation eines Plasmids.

Substanz	Volumen
Reaktionspuffer (5X)	10 µl
dsDNA	1 µl (5-50 ng/µl)
Primer for (2 µM)	12,5 µl
Primer rev (2 µM)	12,5 µl
dNTP Mix	2 µl
dH ₂ O	11 µl
iProof Polymerase (2 U/µl)	1 µl

Tabelle 18: PCR-Programm zur Herstellung eines Plasmids mit gewünschter Punktmutation.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	1 min
2	95 °C	30 sec
3	55 °C	1 min
4	68 °C	1 min/kb Plasmid Länge
Wiederholung ab Schritt 2 für 12-18 mal		
5	68 °C	1,5 min/kb Plasmid Länge
6	4 °C	∞

Das entstandene Produkt wurde gereinigt und über Elektroporation transformiert. Die Mutation wurde über Sequenzierung des Plasmides kontrolliert.

9 Bestimmung der Fe(III)-Reduktion

Die Reduktion von Fe(III) wurde über die Bestimmung der Konzentration von Fe(II) gemessen. Der quantitative Nachweis ist über eine Farbreaktion möglich. Bei pH-Werten zwischen 4 und 9 bildet Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat) mit Fe(II) Ionen einen Komplex, wodurch es einen Farbumschlag von gelb zu blau gibt. Um die Oxidation von Fe(II) durch Luftsauerstoff zu verhindern wurde die Probe direkt nach der Entnahme 1:10 oder 1:100, abhängig von der Fe(II) Konzentration, in HCl (1 M) verdünnt. Da für die Reaktion von Fe(II) mit Ferrozin ein neutraler pH-Wert nötig ist wurde dieses in 50 % Ammoniumacetat Lösung gelöst (0,1 % (w/v)) (Ruebush *et al.*, 2006). Die Konzentration wurde photometrisch mit dem iMark (Bio-Rad) bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde Ammonium-Fe(II)-Sulfat verwendet. Für die Messung wurden 20 µl Probe mit 180 µl Ferrozinlösung gemischt.

10 Protein-biochemische Methoden

10.1 Fraktionierung der Zelle in ihre einzelnen Bestandteile

Je nach Bedarf wurde die Zelle in ihre einzelnen Bestandteile, bestehend aus Cytoplasma, innere Membran, Periplasma und äußere Membran aufgetrennt.

Periplasmapräparation: Die Präparation der periplasmatischen Fraktion wurde mithilfe von Polymyxin-B-Sulfat vorgenommen (Cerny & Teuber, 1971; Pitts *et al.*, 2003). Hierfür wurden 1,5 g Zellen in 1 ml Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4) aufgenommen und Polymyxin-B-Sulfat zugegeben (1 mg/ml). Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Das Polymyxin-B-Sulfat lagert sich dabei in die Membran ein und permeabilisiert diese. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befindet sich die Periplasmafraktion, das Pellet beinhaltet noch den Rest der Zelle.

Cytoplasmapräparation: Das Pellet aus der Periplasmapräparation wird weiter für die Cytoplasmapräparation verwendet. Es wird in ausreichend Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4) resuspendiert und 0,1 mg/ml DNaseI zugegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgt über eine French-Press (American Instruments Company, Maryland, USA). Auf die Zelle (40K cell) wird ein Druck von 1260 psi ausgeübt, was einen Druck von 40000 psi auf die Bakterienzelle bedeutet. Durch den schnellen Druckabfall beim Austritt der Zellen aus der French-Press verliert diese ihre Stabilität und platzt auf. Die nicht aufgeschlossenen Zellen werden bei 5000 g für 10 min und 4 °C ab zentrifugiert. Der Überstand besteht aus den Membranen und dem Cytoplasma. Das Cytoplasma wird von den Membranfragmenten durch Zentrifugation bei 208000 g, 1 h und 4 °C (L8-70M Ultracentrifuge, Beckman, Krefeld) getrennt. Der Überstand beinhaltet das Cytoplasma, das Pellet besteht aus den beiden Membranen, welche weiter verarbeitet wurden.

Trennung der inneren und äußeren Membran: Für die Trennung der Membranen vom Rest der Zelle wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Falls die innere und die äußere Membran benötigt wurden, wurde mit dem Pellet der Cytoplasmapräparation nach der Ultrazentrifuge weiter gearbeitet. Das Pellet wurde in Puffer (Tabelle 19) gelöst und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde es erneut zentrifugiert (208000 g, 1 h, 4 °C). Der Überstand ist die innere Membran, das Pellet die äußere Membran. Das Pellet wird in Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4) resuspendiert (Leisman *et al.*, 1995).

Tabelle 19: Zusammensetzung des Puffers für die Auftrennung der inneren und äußeren Membran.

Substanz	Konzentration
NaCl	100 mM
KCl	2 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
N-Lauroylsarcosin	0,5 % (w/v)
pH Wert wurde auf 7,5 eingestellt	

Falls nur die äußere Membran von Interesse war wurde nur diese vom Rest der Zelle getrennt. Es wurden die Zellen in Puffer (Tabelle 20) gelöst und über die French-Press wie oben beschrieben aufgetrennt. Nach der Ultrazentrifugation (208000 g, 1 h, 4 °C) befindet sich im Pellet die äußere Membran mit sehr geringem Anteil an innerer Membran. Der Überstand besteht aus Cytoplasma, Periplasma und innerer Membran (Hoyle & Beveridge, 1983; Myers & Myers, 2002a; Schnaitman, 1971).

Tabelle 20: Puffer für die Trennung der äußeren Membran vom Rest der Zelle.

Substanz	Konzentration
HEPES (pH 7,5)	50 mM
NaCl	200 mM
Triton X-100	2 % (w/v)

10.2 Proteinbestimmung

Methode nach Bradford: Bei dieser Proteinbestimmung wird Coomassie-Brilliant-Blue verwendet. Dieser Farbstoff bindet an die basischen Seitenketten der Aminosäuren und wird dadurch vom kationischen Zustand in den anionischen Zustand versetzt. Im kationischen Zustand hat Coomassie-Brilliant-blue eine Absorption bei 470 nm, welche sich im anionischen Zustand auf 595 nm verschiebt. Diese Verschiebung der Absorption kann photometrisch gemessen werden (Bradford, 1976). Als Referenz für die Eichgerade diente bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA) in einer Konzentration von 0 bis 100 µg/ml. Die Probe wurde 1:10 mit der Bradfordreagenz (Tabelle 21) gemischt und der Farbumschlag wurde bei 595 nm detektiert.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Bradfordreagenz.

Substanz	Menge (in 1 L)
Coomassie-Brilliant-blue G-250	100 mg
Phosphorsäure (≥85 %)	100 ml
Ethanol (96 %)	50 ml

dH ₂ O	Add. 1000 ml
-------------------	--------------

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist sehr störanfällig gegenüber Detergenzien, insbesondere Triton X-100. Daher wurde noch eine weitere Methode angewendet.

Roti®-Quant universal KIT (Roth, Karlsruhe): Die Methode dieses KITs beruht auf einer Biuret-Reaktion, gekoppelt mit einer Enancer-Reaktion zur Verstärkung des Signals. Bei der Biuret-Reaktion werden die im KIT enthaltenen Cu²⁺ Ionen zu Cu⁺ Ionen reduziert. Dabei sind hier die Peptidbindungen ausschlaggebend und nicht einzelne Aminosäuren wie bei der Bestimmung nach Bradford. Die Verstärkung des Signals erfolgt durch die spezifische Chelatierung der Cu⁺ Ionen durch PCA (2-(2-Pyridyl)-Chinolinsäure-4-Carbonsäure). Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers in einer 96-well Platte durchgeführt und bei 490 nm gemessen. Für die Eichgerade diente ebenfalls BSA.

10.3 Acetonfällung

Das maximale Volumen der SDS-PAGE waren 30 µl. Auf das Gel wurden, abhängig von der Art der Probe, zwischen 5 und 50 µg Protein geladen. In manchen Fällen wäre das Volumen der SDS-PAGE zu gering um diese Menge an Protein zu laden. Das Volumen wurde daher mit einer Acetonfällung angepasst. Der Nachteil einer Acetonfällung besteht in der vollständigen Denaturierung des Proteins.

Das gewünschte Volumen der Probe wurde für die Acetonfällung 1:1 mit kaltem Aceton (-20 °C) gemischt und kurz invertiert. Das Protein wurde durch Zentrifugation (16000 g, 12 min, 4 °C) pelletiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Probe wurde zum vollständigen Abdampfen von Aceton für eine Minute offen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Pellet wird in 15 µl Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4) aufgenommen und für die SDS-PAGE weiter verarbeitet.

10.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; SDS=sodium Dodecylsulfat) (Laemmli, 1970) wird angewandt, um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Denaturierung der Proteine erfolgt dabei durch Hitze und zusätzliche

Zugabe von Ladepuffer (Tabelle 22). Das β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken und verringert dadurch die Stabilität der Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine. Das SDS lagert sich an den Proteinen an und entfaltet die Proteine. Das SDS besitzt eine negative Ladung, überdeckt dadurch die Eigenladung der Proteine und führt zu einer symmetrischen Ladung in Abhängigkeit des Molekulargewichtes.

Tabelle 22: 6x Ladepuffer für die Bearbeitung der Proben vor der SDS-PAGE.

Substanz	Menge
Glycerin	8,2 g
TRIS-Lösung (2 M, pH 6,8)	1,5 ml
β -Mercaptoethanol	3 ml
Bromphenolblaulösung (0,5 % (w/v))	3 ml
SDS-Lösung (20 % (w/v))	6 ml

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein Trenngel (Tabelle 23), welches für die Auftrennung der Proteine zuständig ist von einem Sammelgel (Tabelle 23) überschichtet. Das Sammelgel ist für die Zusammenführung der Proteine und damit für die Schärfe der Bande nötig. Der pH-Wert im Sammelgel führt dazu, dass das Glycin im Laufpuffer (Tabelle 24) als Zwitterion vorliegt und daher langsamer durch das Gel läuft, wohingegen das Cl^- Ion als „leader Elektrolyt“ fungiert, dies führt zu einem Spannungsgradient. Durch die geringe Porengröße laufen die Proteine nur nach der Ladung und unabhängig von ihrer Größe ungefähr gleich schnell durch das Gel. An der Grenze zum Trenngel ändert sich der pH-Wert und das Glycin hat eine ausschließlich negative Ladung. Das Glycin ist deutlich kleiner als die Proteine und staut diese an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel auf und die Proteine werden zu einer Bande fokussiert (Isotachophorese). Im Trenngel fehlt nun der Spannungsgradient und die Porengröße nimmt ab, wodurch die Proteine nach der Größe aufgetrennt werden.

Die Herstellung der Gele und Auftrennung der Proteine wurde in einer Mini-Protean® tetra cell Apparatur (Bio-Rad) ausgeführt. Für die Herstellung der Gele wurden die Glasplatten mit Ethanol entfettet und in die Apparatur eingespannt. In der Lösung der Gele fungiert TEMED

als Katalysator und Ammoniumpersulfat (APS) startet die Polymerisation des Acrylamids, weswegen diese beiden Stoffe zuletzt zugegeben wurden. Die Lösung für das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine klare Trennlinie zu gewährleisten. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und 10 Minuten stehen gelassen, um durch Abdampfen des Isopropanols eine vollständige Entfernung zu garantieren. Anschließend wurde das Sammelgel zugegeben und direkt die Kämme eingesetzt. Durch die Größe der Kämme definiert, betrug die maximale Kapazität der Kammern 30 µl. Das Volumen der Probe wurde aber nur auf 20 µl angepasst.

Die Spannung während dem Lauf betrug zwischen 120 V für das Sammelgel und 150 V für das Trenngel. Die Proteine wurden 5 min bei entsprechender Temperatur und Ladepuffer denaturiert. Als Größenvergleich dienten 6 µl des PageRuler® prestained Protein ladder (Fermentas, St. Leon-Roth).

Tabelle 23: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

	Substanz	Menge (für ein Gel)
Sammelgel (4 %)	Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid: Bisacrylamid 37,5:1)	0,825 ml
	TRIS-Lösung (1 M, pH 6,8)	0,75 ml
	SDS-Lösung (10 % (w/v))	60 µl
	TEMED	7,5 µl
	APS-Lösung (0,1 % (w/v))	30 µl
Trenngel (12 %)	Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid: Bisacrylamid 37,5:1)	3 ml
	TRIS-Lösung (1,5 M, pH 8,8)	2,25 ml
	SDS-Lösung (10 % (w/v))	90 µl
	TEMED	9 µl
	APS-Lösung (0,1 % (w/v))	45 µl

Tabelle 24: Laufpuffer für die SDS-PAGE.

Substanz	Menge (für 1 L)
TRIS (pH 8,8)	3 g
SDS	1 g
Glycin	14,4 g

10.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit N,N'-Diallyl-tartardiamid

Bei dieser Gelelektrophorese wird das Bisacrylamid durch N,N'-Diallyl-tartardiamid (DATD) ersetzt. Die dadurch entstehende Quervernetzung des Acrylamids kann somit durch Natriumperiodat mithilfe einer Glykolspaltung wieder aufgelöst werden (Abbildung 9). Das gewünschte Protein kann aus dem Gel wieder rausgelöst werden und wird dabei in den meisten Fällen nicht zerstört. In der Acrylamidlösung wurden die 0,8 % Bisacrylamid durch 3 % DATD ersetzt. Ansonsten wurde verfahren wie in Abschnitt III. 10.4 beschrieben (Spath & Koblet, 1979).

Damit das Protein aus dem Gel eluiert werden konnte wurde das ausgeschnittene Gelstück mit Natriumperiodatlösung (200 mM) versetzt. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur für 30 min statt. Für die Proteinfällung wurde die TCA (Trichloressigsäure) Methode angewandt. Eine 10 prozentige TCA Stammlösung wurde im Verhältnis 3:2 mit dem aufgelösten Gel gemischt und durch Zentrifugation (16000 g, 12 min, RT) das Protein pelletiert. Der Überstand und die Gelreste wurden verworfen und das Pellet in 15 µl 6x Ladepuffer aufgenommen. Die Probe wurde bei 95 °C denaturiert und auf ein neues Gel geladen. Um das Protein zu detektieren wurde eine Coomassie-Färbung (Abschnitt III. 10.7) durchgeführt.

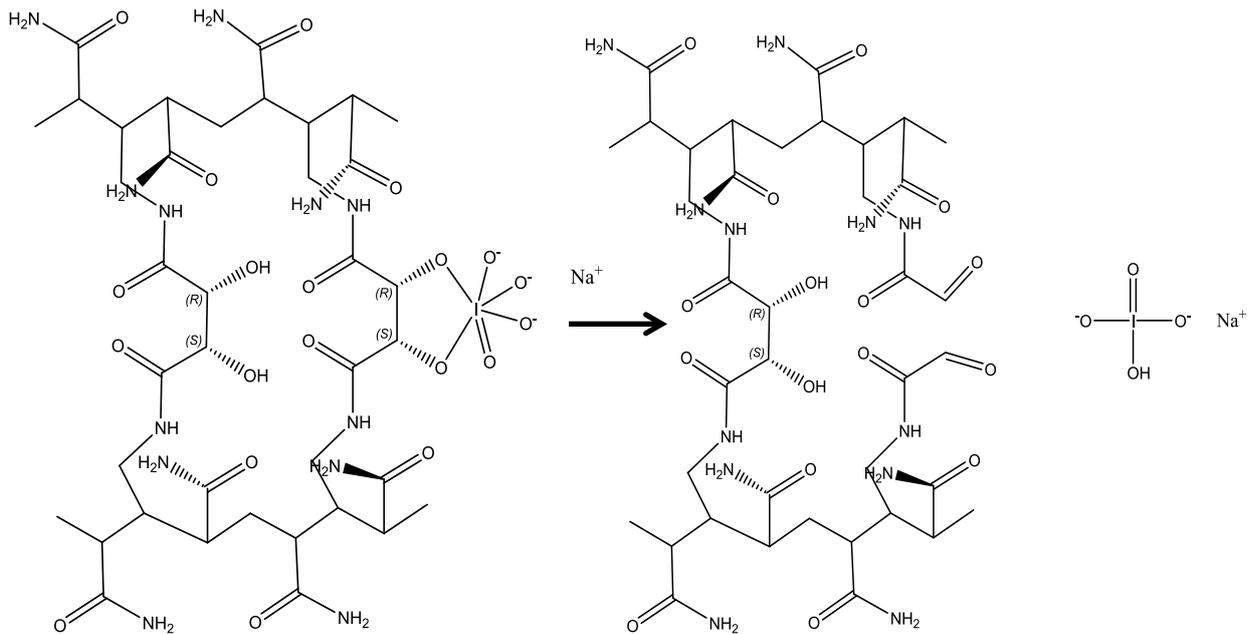


Abbildung 9: Chemische Darstellung der Glykolspaltung einer SDS-PAGE mit DATD durch Natrium periodat. Der obere und untere Strang ist das Acrylamid, die Quervernetzung des Acrylamids erfolgt durch DATD.

10.6 Häm-Färbung

Mit der Methode der Häm-Färbung können Proteine, welche eine Häm-Gruppe als Kofaktor haben, spezifisch angefärbt werden (Thomas *et al.*, 1976). Die Peroxidase Aktivität des Häm-Kofaktors kann dazu genutzt werden H₂O₂ zu reduzieren und dabei die Elektronen auf 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu übertragen. Der Farbstoff TMB geht bei der Reduktion von einer farblosen Leukoform in einen blauen Zustand über. Dadurch hinterlassen auf der SDS-PAGE nur Hämproteine eine blaue Bande.

Das SDS-Gel wurde nach dem Lauf für 30 min in 12,5 % TCA-Lösung gelegt. Das TCA dient der Fixierung und Regeneration der Hämproteine. Danach wird das Gel 30 min in Wasser gewaschen. Für die Färbung werden die Komponenten der Reaktionslösung der Tabelle 25: Reaktionslösung für die Häm-Färbung eines SDS-Gels. von oben nach unten einzeln zugegeben und so lange inkubiert, bis die Banden ausreichend sichtbar sind.

Tabelle 25: Reaktionslösung für die Häm-Färbung eines SDS-Gels.

Substanz	Menge
TMB (1 mg/ml)	10 ml
Citratpuffer (pH 6,4)	1 ml
H ₂ O ₂ (35%)	40 µl

10.7 Coomassie-Färbung

Die Proteine werden bei der Coomassie-Färbung nach demselben Prinzip angefärbt, wie bei der Proteinbestimmung nach Bradford beschrieben (Abschnitt III. 10.2). Für diese Färbung wird auch der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau verwendet, wodurch alle Proteine unspezifisch gefärbt werden (Zehr *et al.*, 1989).

Die Färbung der Gele mit Coomassie ist auch nach der Hämefärbung noch möglich. Die Gele wurden 30 min in Fixier- und Färbelösung gelagert. Die Lösung wurde danach durch Entfärber I getauscht. Die Gele wurden so lange in Entfärber I gelagert, bis die einzelnen Proteinbanden sichtbar wurden. Um den Hintergrund zu entfärben und eine klarere Sicht auf die Banden zu erlangen wurde Entfärber II solange zugegeben, bis das gewünschte Ergebnis erzielt wurde.

Tabelle 26: Die benötigten Lösungen für die Coomassie-Färbung.

Lösung	Substanz	Konzentration
Fixier- und Färbelösung	Methanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	20 % (v/v)
	Coomassie-Brilliant Blau G-250	0,25 (w/v)
Entfärber I	Methanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	20 % (v/v)
Entfärber II	Essigsäure	8 % (v/v)

10.8 Western-blot

Mit der Western-blot Methode können Proteine spezifisch über einen Tag, mit dem ein Protein gekennzeichnet ist, oder über einen für das Protein spezifischen Antikörper detektiert werden (Burnette, 1981).

Für den Transfer wurde das Trans-Blot Turbo® System (Bio-Rad) verwendet. Es wurden 6 Filterpapiere mit einer Dicke von 1 mm für 15 min in Puffer eingelegt (Tabelle 27) Die Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm wurde kurz vor dem Blotten mit Puffer benetzt. Über das Gel und unter die Membran werden jeweils 3 Filterpapiere angebracht. Der Aufbau ist in Abbildung 10 dargestellt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen dazwischen sind, da diese eine Weiterleitung des Stromflusses verhindern. Es wurde ein Strom von 1,3 A und 25 V angelegt. Die Dauer des Vorgangs variierte von 7-12 min, abhängig von der Größe des Proteins, welches untersucht werden sollte.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Puffers für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran.

Substanz	Menge (in 1 L)
TRIS	40 g
Glycin	20 g
Ethanol (95 %)	150 ml
Methanol	50 ml
Add. dH ₂ O 1 L; pH 8,7	

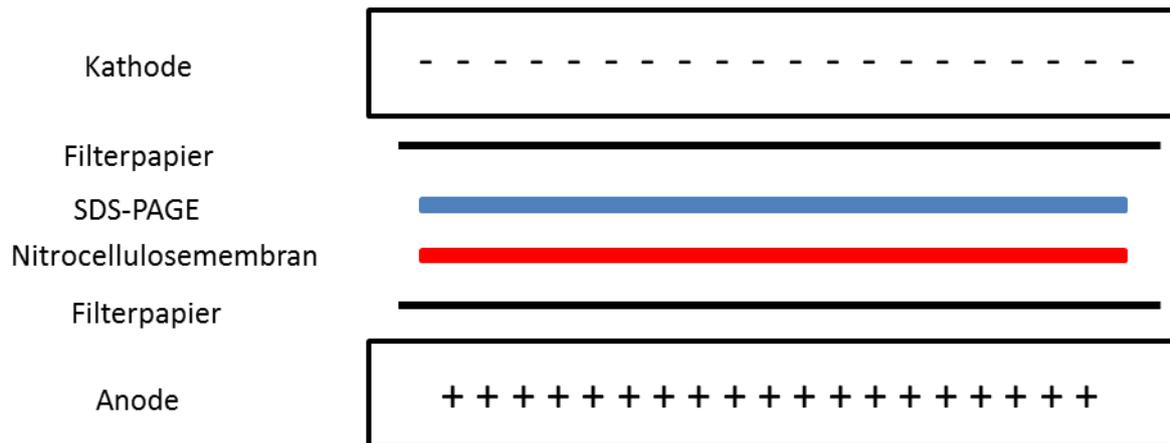


Abbildung 10: Aufbau für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Rot ist die Nitrocellulosemembran gekennzeichnet, blau das SDS-Gel. Die schwarzen Balken symbolisieren jeweils 3 Filterpapiere. Der Transfer erfolgt von der Kathode zur Anode.

Detektion: Das Protein wurde mittels einer Immunodetektion nachgewiesen. Bei diesem Vorgang wird ein Antikörper verwendet, welcher an ein spezifisches Epitop im Protein bindet. Bei diesem Epitop kann es sich entweder um eine eigens eingebrachte Aminosäuresequenz, wie ein His-Tag oder V5-Tag, handeln oder um eine im Protein schon vorhandene Sequenz. Ein zweiter Antikörper, welcher mit einer alkalinen Phosphatase (AP) verknüpft ist, bindet spezifisch an den ersten Antikörper. Über die alkaline Phosphatase kann nun eine Färbereaktion stattfinden. Dabei wird 5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) dephosphoryliert und das intermediat bildet durch Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) vermittelt ein Dimer, welches eine tief blaue Farbe hervorbringt (Abbildung 11). Die Farbreaktion wurde mithilfe des AP conjugation substrate KIT (Bio-Rad) nachgewiesen. Die einzelnen Schritte der Membran nach dem Transfer bis hin zur Färbung sind in Tabelle 28 aufgelistet.

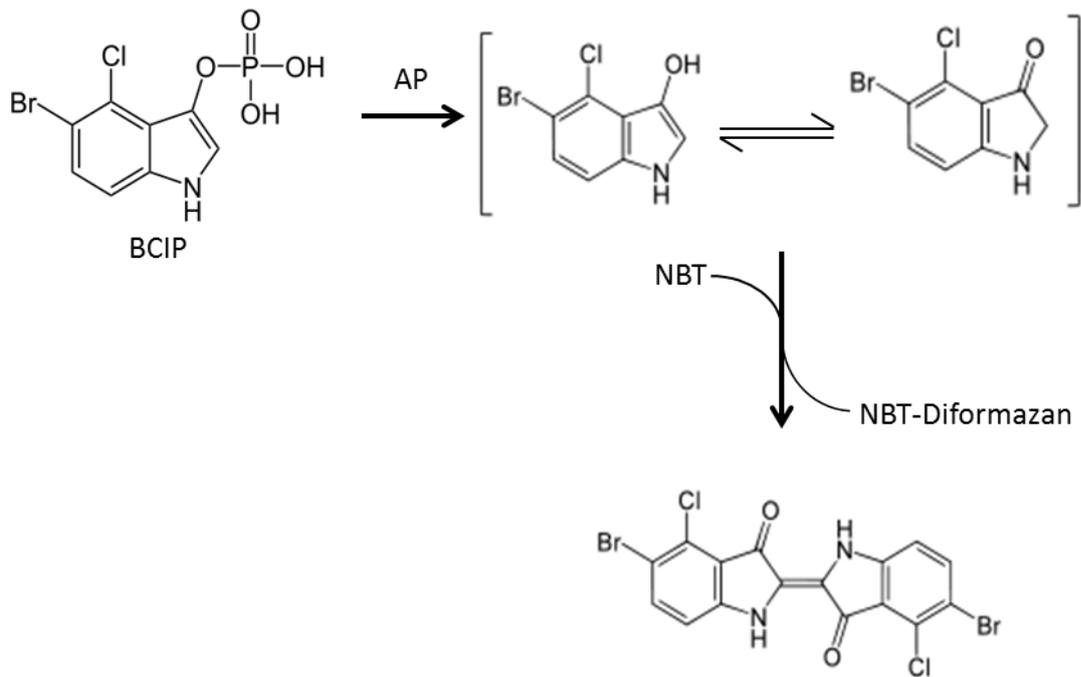


Abbildung 11: Reaktion von BCIP über die AP hin zum Indigo Farbstoff unter Einsatz von NBT.

Tabelle 28: Auflistung der Weiterverarbeitung der Nitrocellulosemembran nach dem Proteintransfer bis hin zur Färbung.

Wiederholungen	Lösung (TBS/TBST/TBSTT Tabelle 29)	Zeit
2 mal	TBS	10 min
	blocking Puffer (3 % (w/v) Michpulver in TBS)	1 h
	erster Antikörper (in 3 % BSA (w/v) in TBS; 1:1000)	1 h
2 mal	TBSTT	10 min
	TBS	10 min
	Zweiter Antikörper (in blocking Puffer; 1: 7500)	1 h
4 mal	TBST	5 min
5 mal	dH ₂ O	2 min

Färbung mit 15 ml Färbelösung laut Herstellerangaben (AP conjugation substrat KIT; Bio-Rad).

Die einzelnen Puffer für die Immunodetektion sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 29: Zusammensetzung der Puffer für die Waschschritte der Nitrocellulosemembran.

Puffer	Substanz	Menge
TBS Puffer (pH 7,5)	TRIS	10 mM
	NaCl	200 mM
TBST Puffer (pH 7,5)	TRIS	20 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,05 %
TBSTT Puffer (pH 7,5)	TRIS	20 mM
	NaCl	20 mM
	Tween 20	0,05 %
	Triton X-100	0,2 %

10.9 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht darauf, dass bestimmte Aminosäuresequenzen eine höhere Affinität haben an bestimmte Stoffe zu binden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Möglichkeiten der Affinitätschromatographie genutzt.

Metall-Ionen Affinitätschromatografie (IMAC): Mit dieser Methode kann man Proteine reinigen, welche mit einem His-Tag versehen sind. Der His-Tag besteht aus 6 oder 8 hintereinander gereihten Histidinen. Bei der verwendeten Säule sind Ni^{2+} Ionen an eine Resinmatrix gebunden und können damit Proteine, welche mit einem His-Tag versehen sind, binden. Imidazol kann wegen der ähnlichen Struktur und damit verbundenen Bindekapazität für die Elution des Proteins verwendet werden. Die Konzentration von Imidazol hängt dabei von der Bindekapazität des im Protein enthaltenem His-Tags ab. Die für die Reinigung verwendeten Puffer sind in Tabelle 30 aufgelistet. Die Vorgehensweise und einzelnen Schritte sind in Tabelle 32 aufgelistet. Das Programm wurde mit einer DuoFlow FPLC (Fast protein liquid chromatography) von Bio-Rad durchgeführt. Als Säule wurde eine HisTrap HP-Säule (GE healthcare) verwendet. Das Chromatogramm wurde bei 280 nm und 410 nm erstellt.

Tabelle 30: Zusammensetzung der Puffer für die IMAC.

Puffer	Substanz	Konzentration
Waschpuffer/ Regenerationspuffer	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
Elutionspuffer	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM

Reinigung des Strep-Tags: Der Strep-Tag besteht aus einer Aminosäuresequenz mit 8 Aminosäuren mit der definierten Sequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys. Dieser Tag bindet mit einer hohen Affinität an Strep-Tactin®, das von einem modifizierten Streptavidin stammt, welches ein Protein aus *Streptomyces avidinii* ist. Der natürliche Ligand des Streptavidins ist Biotin. Zum Eluieren wird d-Desthiobiotin, ein Strukturanalogon zu Biotin, verwendet. Für die Reinigung der Säule kann hier nicht der Waschpuffer genommen werden, da Desthiobiotin sich durch die Verringerung der Konzentration nicht von Strep-Tactin ablöst. Für die Regeneration wurde 4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid (HABA) genutzt, um Desthiobiotin wieder effektiv von der Säule zu lösen. Das HABA kann wieder mit Puffer für einen neuen Lauf von der Säule gelöst werden, oder direkt mit 20 % Ethanol für die Lagerung. Die Puffer sind in Tabelle 31, das Programm für die Reinigung ist in Tabelle 32 aufgelistet. Die Reinigung erfolgte wieder über eine DuoFlow FPLC mit einer Strep-Tactin superflow Plus Säule (Qiagen). Das Chromatogramm wurde bei 280 nm und 410 nm erstellt.

Tabelle 31: Zusammensetzung der Puffer für die Reinigung eines Strep-Tags.

Puffer	Substanz	Konzentration
Waschpuffer (pH 8)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	150 mM
Elutionspuffer (pH 8)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Desthiobiotin	2,5 mM
Regenerationspuffer (pH 8)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	HABA	1 mM

Tabelle 32: Auflistung der einzelnen Schritte einer Proteinreinigung über Affinitätschromatographie.

Funktion	Lösung	Volumen
Äquilibration	Waschpuffer	5 Säulenvolumina
Laden	Probe	Abhängig von der Bindekapazität der Säule.
waschen	Waschpuffer	10 Säulenvolumina
Elution	Elutionspuffer	5 Säulenvolumina
Regeneration	Waschpuffer	10 Säulenvolumina
Lagerung der Säule	20 % Ethanol	10 Säulenvolumina

10.10 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde dazu genutzt Proteine der Größe nach aufzutrennen. Die Porengröße der Säule ist unterschiedlich, wodurch kleinere Proteine durch Diffusion in mehr Poren

eindringen können als große Proteine. Daher müssen kleinere Proteine eine größere Strecke zurücklegen auf dem Weg durch die Säule als große Proteine. Daher gilt je größer das Protein, umso schneller der Lauf durch die Säule. Der Puffer hat keine Auswirkung auf die Bindekapazität des Proteins und kann daher entsprechend gewählt werden. Dies ist eine gute Möglichkeit um störende Faktoren, wie z.B. Imidazol, aus der vorhergehenden Reinigung zu entfernen.

Für die Reinigung wurde eine die HiLoad® 26/60 Superdex 200 prep grade Säule (GE healthcare) verwendet. Der Puffer ist in Tabelle 33 aufgelistet. Die Säule wurde mit 600 ml Puffer äquilibriert. Anschließend wurden max. 10 ml Probe geladen und mit 300 ml Puffer bei einer Flussrate von 2,5 ml/min eluiert. Für den Vorgang wurde die DuoFlow FPLC (Bio-Rad) genutzt. Das Chromatogramm wurde bei 280 nm und 410 nm erstellt.

Tabelle 33: Zusammensetzung des Puffers für die Gelfiltration.

Substanz	Konzentration
HEPES (pH 7,4)	50 mM
NaCl	200 mM

10.11 In vivo crosslinking Versuche

Mit einem crosslinker können Proteine über zwei definierte Gruppen oder teilweise auch unspezifisch kovalent verlinkt werden und somit Proteininteraktionen festgestellt werden. Die crosslinker verlinken dabei alle Proteine mit den entsprechenden Gruppen miteinander. Die Gruppen, welche miteinander verlinkt werden müssen einen bestimmten Abstand aufweisen, der über die Länge des crosslinkers gegeben wird. Die Interaktion wird mit einem Western-blot (Material und Methoden, Abschnitt 10.8) analysiert. Wird an einer bestimmten Stelle das Protein, welches untersucht wird, häufiger detektiert als an anderen Stellen, kann davon ausgegangen werden, dass das untersuchte Protein häufiger mit einem anderen bestimmten Protein interagiert als unspezifisch mit anderen Proteinen.

Es besteht aber häufig die Möglichkeit, dass zwei Proteine miteinander interagieren, aber nicht über einen crosslinker verbunden werden können. Dies liegt daran, dass der crosslinker einen bestimmten Abstand zweier spezifischer Gruppen benötigt, die er miteinander

verlinken kann. Übt die gewünschte Gruppe schon eine Interaktion aus oder sind sie zu weit voneinander entfernt, ist eine Verlinkung durch den crosslinker nicht möglich.

Die in dieser Arbeit verwendeten crosslinker (Thermo Fischer scientific; Tabelle 34) wurden nach Herstellerangaben bearbeitet. Alle crosslinker sind membrangängig, um eine Verknüpfung periplasmatischer Proteine zu gewährleisten.

Tabelle 34: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten crosslinker.

Crosslinker	Reaktive Gruppen
DMP (Dimethyl adipimidat)	Amine – Amine
DSS (Disuccinimidyl suberate)	Amine – Amine
TMEA (Tris-[2-maleimidoethyl]amine)	Thiole – Thiole (trifunktional)
BMDB (1,4-bismaleimidobutane)	Thiole – Thiole
SMPT (4-succinimidylloxycarbonyl- α -methyl- α -[2-pyridyldithio]toluene)	Amine – Thiol
SIA (succinimidyl iodoacetat)	Amine – Thiol
LC-SDA (succinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoate)	Amine – unspezifisch
DCC (Dicyclohexylcarbodiimid)	Amine – Carboxyl
EMCH (N-(ϵ -Maleimidocaproic acid) hydrazide)	Thiol – Carbonylgruppe

11 Reduktion der Hämgruppen

Der Zustand eines Hämproteins, ob es reduziert oder oxidiert ist, kann mithilfe der Änderung im Absorptionsspektrum festgestellt werden. Insbesondere der Peak bei 552 nm, welcher in reduziertem Zustand vorhanden ist, verschwindet in oxidiertem Zustand gänzlich. Über die Zunahme von diesem Peak kann die Reduktion detektiert werden.

Es wurde eine Lösung aus 40 % (v/v) Pyridin in 200 mM NaOH hergestellt. Es wurden 250 μ l dieser Lösung mit 250 μ l gereinigtem MtrA_{His} gemischt und 1,5 μ l einer 0,1 M K₃Fe(CN)₆-Lösung zugegeben. In dieser Lösung ist MtrA_{His} vollständig oxidiert. Die Küvette wurde mit einem Stopfen verschlossen, um eine weitere Oxidation durch Luftsauerstoff zu verhindern. Von dieser Lösung wurde ein Spektrum zwischen 400 und 600 nm mit dem Cary

50 UV/VIS Spektrometer (Varian, Darmstadt) aufgenommen. Es wurde sukzessive eine frisch angesetzte Dithionit Lösung (100 mg/ml) zugegeben, bis keine weitere Zunahme des Peaks mehr festgestellt werden konnte. Mithilfe der eingesetzten Proteinmenge konnte nun errechnet werden, wieviel Dithionit benötigt wurde um 1 mg MtrA_{His} zu reduzieren.

12 MtrAB Dynamik Versuch

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob das MtrA, welches durch die Bindung an MtrB in der Membran verankert ist, durch ein periplasmatisches MtrA ausgetauscht wird oder ob nur die Elektronen weitergegeben werden.

Es wurde die äußere Membran von ca. 2,5 g $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* Zellen mithilfe von Laurylsarcosine isoliert (Abschnitt III. 10.1) und in 7,5 ml Puffer (50 mM HEPES; 250 mM NaCl; pH 7,4) resuspendiert. Durch das Fehlen von Detergenzien wird die Membran zur Bildung von Liposomen gezwungen. Dieser Vorgang findet unter aeroben Bedingungen statt, wodurch die Hämproteine dieser Lösung oxidiert vorliegen. Es wurden 500 μ l von gereinigtem MtrA_{His} mithilfe von Dithionit reduziert (Abschnitt III. 11) und die beiden Lösungen unter anaeroben Bedingungen miteinander gemischt. Durch Ultrazentrifugation (208000 g, 4 °C, 1 h) wurde die Membran von der löslichen Fraktion getrennt und mittels Western-blot (Abschnitt III. 10.8) die Lokalisation des zugegebenen MtrA_{His} detektiert.

13 Analyse der Aminosäuresequenz in Lipoproteinen

Die Aminosäuresequenzen der Lipoproteine von eisenreduzierenden und nicht eisenreduzierenden, Gram-negativen Bakterien wurde mithilfe von Pubmed und DOLOP (Database of Bacterial Lipoproteins) ermittelt. Es wurde mit den verschiedenen Sequenzen durch die CLC Workbench ein Alignment der ersten 50 Aminosäuren durchgeführt.

IV. Ergebnisse

1 Dynamik von MtrA zwischen Periplasma und äußerer Membran

Die Interaktion zwischen MtrA und MtrB muss schon im Periplasma stattfinden, aufgrund der Schutzfunktion von MtrA gegenüber dem Abbau von MtrB durch die Protease DegP, welche im Periplasma lokalisiert ist (Schicklberger *et al.*, 2011). MtrA schützt MtrB während dem Transfer durch das Periplasma und ist nach der Integration von MtrB in die äußere Membran für den Transfer der Elektronen aus dem Periplasma verantwortlich. Die Interaktion und die dafür verantwortlichen Bereiche sind nicht bekannt. Um das Verhalten von MtrA nach der Integration von MtrB in die äußere Membran besser zu verstehen wurde untersucht, ob das gleiche MtrA, welches mit MtrB im Periplasma interagiert, statisch an MtrB gebunden bleibt oder an der Membran ausgetauscht werden kann. Nach der Weitergabe der Elektronen an MtrC liegt MtrA in oxidiertem Zustand vor. Das oxidierte MtrA in der Membran könnte nun von anderen c-Typ Cytochromen aus dem Periplasma reduziert werden oder sich von einem MtrA, welches in reduziertem Zustand im Periplasma vorliegt, ablösen lassen.

Es wurde mit zwei unterschiedlich markierten MtrA Varianten gearbeitet. Die Funktionalität von MtrA_{His} und _{onestrep}MtrA wurde ermittelt, indem eine $\Delta mtrA$ Mutante mit Plasmid-kodierten Kopien der Gene (pBAD_{onestrep}*mtrA* und pBAD*mtrA*_{His}) bei Wachstum mit Eisencitrat als Elektronenakzeptor komplementiert wurde. Die pBAD Plasmide wurden jeweils mit 0,1 mM Arabinose induziert. Als Kontrolle wurde mit dem *S. oneidensis* WT Stamm gleich verfahren. Für die Messung der Eisenreduktion wurden 100 μ l Probe mit 900 μ l 1 M HCl-Lösung gestoppt und die Eisenreduktion mit Ferrozin bei 595 nm gemessen. In Abbildung 12 ist gezeigt, dass _{onestrep}MtrA und MtrA_{His} beide einen $\Delta mtrA$ Stamm komplementieren können. Der His-Tag am C-Terminus und der onestrep-Tag am N-Terminus behindern nicht die Funktionalität des MtrA Proteins, wodurch gewährleistet werden kann, dass beide MtrA Varianten die gewünschte Funktion der Interaktion mit dem MtrB Protein und dem Transfer der Elektronen auf MtrC, ausüben können.

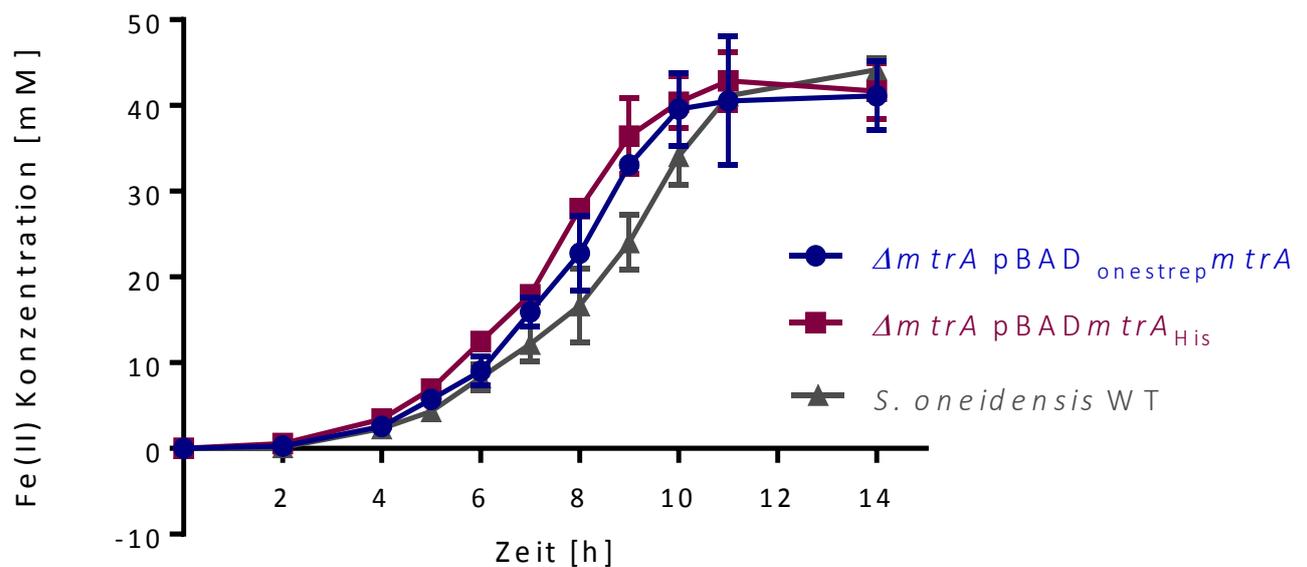


Abbildung 12: Bestimmung der Eisenreduktion der $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep} *mtrA*, $\Delta mtrA$ pBAD *mtrA*_{His} und der *S. oneidensis* WT Stämme. Jeder Stamm wurde in drei unterschiedlichen Messungen untersucht und anschließend der Mittelwert gebildet.

Die Stämme $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep} *mtrA* und $\Delta mtrA$ pBAD *mtrA*_{His} konnten somit beide verwendet werden, um die Dynamik von MtrA nach der Interaktion mit MtrB zu untersuchen. Da *S. oneidensis* die Proteine des Mtr-Wegs für die Eisenreduktion auch unter Nutzung von anderen anaeroben Elektronenakzeptoren exprimiert (Beliaev *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2010; Romine *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2015), wurde M4-Medium mit Fumarat als Elektronenakzeptor verwendet. Von $\Delta mtrA$ pBAD *mtrA*_{His} wurde das Periplasma gewonnen und das MtrA_{His} daraus über eine His-Tag Säule und eine Gelfiltrationssäule gereinigt. Das gereinigte MtrA_{His} wurde unter anaeroben Bedingungen mit Natrium dithionit reduziert. Die Konzentration von Natrium-dithionit wurde so gewählt, dass 90 % des gesamten MtrA_{His} Proteins reduziert vorlagen. Um ein Oxidation von MtrA durch den Luftsauerstoff zu verhindern, wurde dies in der anaeroben Kammer durchgeführt. Der $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep} *mtrA* Stamm wurde anaerob angezogen und Liposomen aus der äußeren Membran hergestellt. Es wurden 30 μg MtrA_{His} mit 3,5 mg Dithionit reduziert, mit den Liposomen der äußeren Membran gemischt. Für die Reaktion wurden fünf und 15 Minuten Zeit gelassen. Der lösliche Teil und die Membran wurden mittels Ultrazentrifugation getrennt und mit Western-blot wurde die Lokalisation des zugegebenen MtrA_{His} bestimmt. Auf das SDS-Gel wurde die Hälfte

des vorhandenen Proteins geladen, wobei mittels Acetonfällung das Volumen angepasst wurde. Das ergab für den Überstand, in dem außer MtrA keine weiteren Proteine vorhanden sein sollten, eine Menge von 7,5 µg Protein. Da in der äußeren Membran noch andere Proteine vorhanden sind und der MtrABC-Komplex nicht das einzige Protein darstellt, konnte die Menge des geladenen Proteins nicht definiert werden. Es wurde ebenfalls die Hälfte der Gesamtmenge der Membranfraktion auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem anti-His Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle wurden 7 µg gereinigtes MtrA_{His}, welches nicht bearbeitet wurde, geladen. Als Negativkontrolle wurden 25 µg der Membran der $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* Zellen, welche ebenfalls nicht bearbeitet wurden, verwendet.

MtrA_{His} ist nur in der löslichen Fraktion zu detektieren. In der Membranfraktion kann kein MtrA_{His} nachgewiesen werden (Abbildung 13). Dies gilt für 5 und für 15 Minuten Inkubationszeit. Die ganz schwache Färbung in der Membranfraktion beruht auf der Eigenfärbung der Cytochrome und kommt von dem in der Membranfraktion vorliegenden _{onestrep}MtrA. Aufgrund der Menge des geladenen Proteins ist es möglich diese Färbung zu erkennen. Als Negativkontrolle wurde die äußere Membran des $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* Stammes verwendet, um gleichzeitig unspezifische Banden auf dem Western-blot auszuschließen.

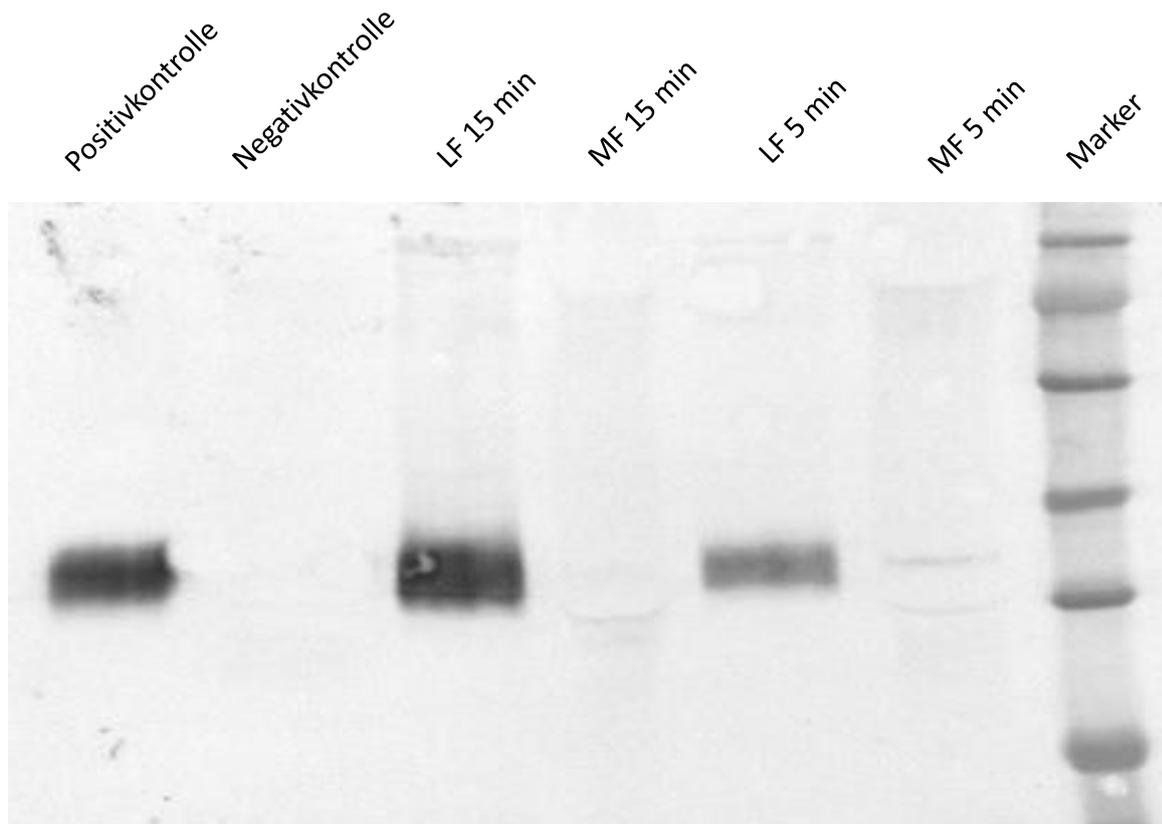


Abbildung 13: Lokalisation von MtrA_{His} durch einen anti-His Antikörper nach Zugabe von reduziertem MtrA_{His} zu den Liposomen der äußeren Membran eines $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* Stammes. Von rechts nach links wurde aufgetragen: Marker; Membranfraction (MF) nach 5 min Inkubation; lösliche Fraktion (LF) nach 5 min Inkubation; Membranfraction nach 15 min Inkubation; lösliche Fraktion nach 15 min Inkubation; Die Negativkontrolle ist eine nicht bearbeitete Membran der $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* Stämme; die Positivkontrolle ist gereinigtes, aber nicht bearbeitetes MtrA_{His}.

2 Wachstumskurven von MtrA und MtrB Mutationen

Der genaue Vorgang der Interaktion zwischen MtrA und MtrB im Periplasma ist noch nicht bekannt. Durch Punktmutationen in speziell gewählten Bereichen der beiden Proteine sollte der Einfluss bestimmter Bereiche untersucht werden. Der Einfluss der Regionen auf die Reduktionsrate von Eisen wurde durch Eisenreduktionsassays ermittelt. Die verwendeten pBAD Plasmide wurden immer mit 0,1 mM Arabinose induziert. Die Stämme wurden in einer LB Vorkultur über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von zwei inkubiert. Anschließend wurden sie in M4-Medium mit Eisencitrat als Elektronenakzeptor mit einer Anfangs OD₆₀₀ von 0,004 überführt. Die Eisenreduktionsrate wurde durch die Zunahme von Fe(II) mit Hilfe von Ferrozin bestimmt.

2.1 Wachstumskurven der Punktmutationen von MtrA

Die Punktmutationen wurden in einem pBAD_{onestrep}*mtrA* Plasmid durchgeführt, da der Tag aber in diesem Fall nicht benötigt wurde, ist er bei der Benennung des Stammes nicht erwähnt. Es wurde schon vorher gezeigt, dass mit dem pBAD_{onestrep}*mtrA* Plasmid ein Δ *mtrA* Stamm wieder komplementiert werden kann (Abbildung 12).

Bei Δ *mtrA* pBAD*mtrA* Q332L, R333G wurde das Glutamin an vorletzter Stelle in ein Leucin geändert und das an letzter Position befindliche Arginin in Glycin. Ein Prolin ist meistens für einen Loop im Protein zuständig und hat daher einen großen Einfluss auf die Faltung oder die Offenlegung von bestimmten Regionen des Proteins. Aufgrund dieser Eigenschaft von Prolin wurde das Prolin an Position 325 entweder in ein Alanin getauscht (Δ *mtrA* pBAD_{onestrep}*mtrA* P325A) oder in ein Stopp-Codon geändert (Δ *mtrA* pBAD_{onestrep}*mtrA* P325stopp), um den Einfluss der letzten sieben Aminosäuren zu untersuchen. Die Eisenreduktion wurde mittels Ferrozin bestimmt. Der *S. oneidensis* WT Stamm wurde als Kontrolle verwendet.

Abbildung 14 zeigt, dass alle N-terminalen Punktmutationen von MtrA keinen Einfluss auf die Eisenreduktion haben. Die Reduktionsrate von Eisencitrat ist bei den Stämmen Δ *mtrA* pBAD*mtrA* P325A, Δ *mtrA* pBAD*mtrA* P325stopp und Δ *mtrA* pBAD*mtrA* Q332L, R333G genauso schnell wie bei einem Wildtyp. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unterschiedlichen Messungen.

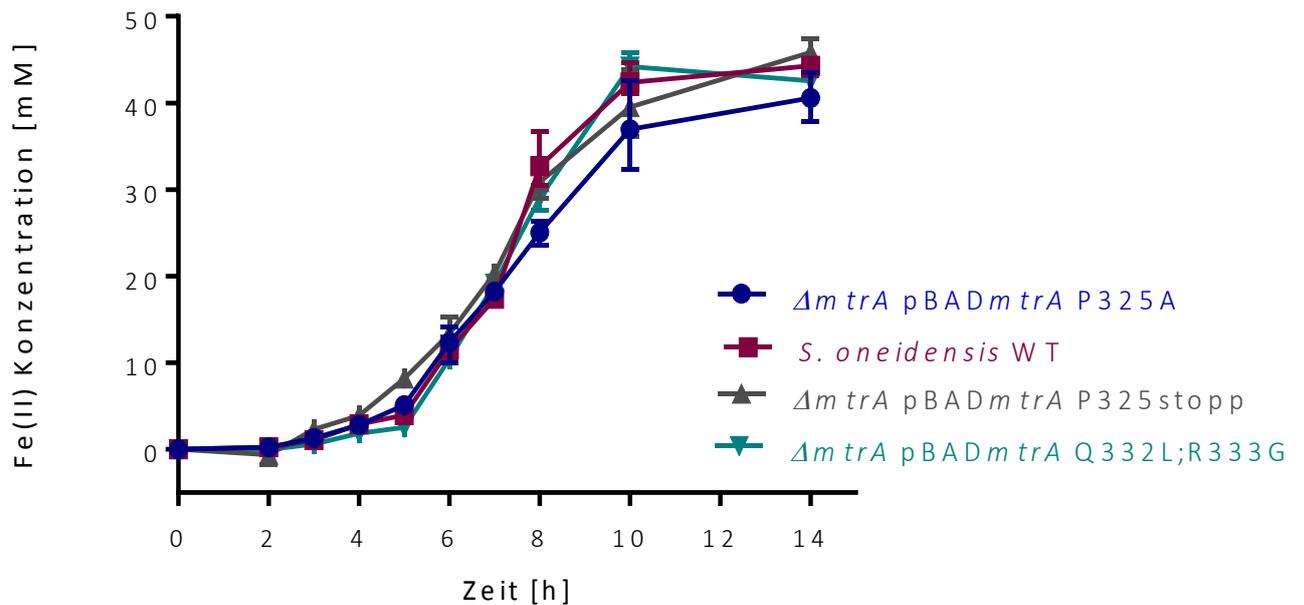


Abbildung 14: Untersuchung der Eisenreduktion verschiedener Punktmutationen. Am N-Terminus wurden verschiedene Aminosäuren geändert und die Reduktion von Eisen mittels Ferrozintest bestimmt. Die Versuche fanden im Triplikат statt.

2.2 Einfluss von definierten Bereichen bei MtrB auf die Reduktion von Eisen

Der Einfluss bestimmter Bereiche auf die Interaktion zwischen MtrA und MtrB sollte auch von der Seite von MtrB aus untersucht werden. Die Cysteine an Position 42 und 45 sind bei MtrB und dessen homologen Proteinen stark konserviert. Sie wurden daher schon genauer untersucht und ein Einfluss des Cysteins an Position 42 angenommen (Wee *et al.*, 2014). Dieser Phänotyp sollte noch einmal untersucht und bestätigt werden. In eine $\Delta mtrB$ Mutante wurden jeweils ein pBADmtrB, pBADmtrB C42A, pBADmtrB C45A und pBADmtrB C42/45A Plasmid transformiert. Der *S. oneidensis* WT Stamm und eine $\Delta mtrB$ Mutante dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

Das pBADmtrB Plasmid, welches als Template für die Punktmutation verwendet wurde, kann eine $\Delta mtrB$ Mutante wieder komplementieren. Das Eisencitrat wird von den drei Punktmutationen MtrB C42A, MtrB C45A und MtrB C42/45A mit der gleichen Rate reduziert wie von *S. oneidensis* WT und dem $\Delta mtrB$ pBADmtrB Stamm. Eine $\Delta mtrB$ Mutante ist nicht mehr in der Lage Eisen in der gegebenen Zeit zu reduzieren (Abbildung 15).

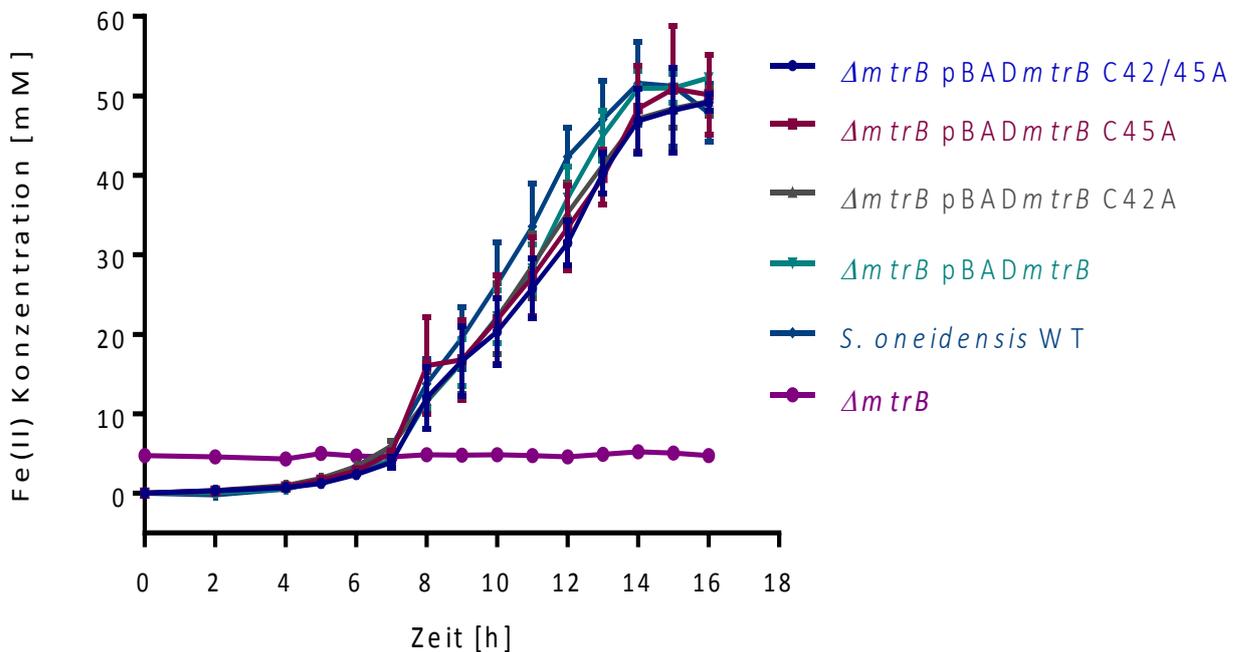


Abbildung 15: Bestimmung der Reduktionsrate von MtrB exprimierten Stämmen, bei welchem in definierten Bereichen eine Punktmutation eingesetzt wurde. Die Punktmutationen in dem MtrB zeigen gegenüber dem Wildtyp keinen Phänotyp. Ohne MtrB ist keine Eisenreduktion mehr möglich. Die Versuche fanden im Triplikate statt, der $\Delta mtrB$ Stamm wurde nur einzeln kontrolliert.

Die Verwendung von verschiedenen Tags an MtrB wurde für weitere Versuche getestet. Hierfür wurden verschiedene pBADmtrB Plasmide generiert und über den Ferrozintest untersucht, ob das Plasmid einen $\Delta mtrB$ Stamm wieder komplementieren kann. Getestet wurde ein pBADmtrB_{V5} Plasmid, in welchem MtrB C-Terminal mit einem V5-Tag markiert ist, ein pBADmtrB_{strep}, in welchem MtrB C-Terminal mit einem Strep-Tag versehen ist und ein pBAD_{His(8)}_mtrB, bei dem MtrB N-terminale mit einem His-Tag bestehend aus 8 Histidinen versehen wurde.

Der $\Delta mtrB$ pBADmtrB_{V5} Stamm ist nicht mehr in der Lage Eisencitrat in der Zeit zu reduzieren in der der Wildtyp dazu fähig ist. Der V5-Tag hemmt das MtrB Protein in dessen Funktion, wodurch das pBADmtrB_{V5} Plasmid nicht in der Lage ist den $\Delta mtrB$ Stamm zu komplementieren. Die $\Delta mtrB$ pBADmtrB_{strep} und $\Delta mtrB$ pBAD_{His(8)}_mtrB Stämme sind zur

Eisenreduktion im ähnlichen Umfang wie der Wildtyp befähigt. Es besteht also die Möglichkeit den $\Delta mtrB$ Stamm mit einem $pBAD_{His(8)}_{mtrB}$ oder einem $pBADmtrB_{Strep}$ Plasmid zu komplementieren (Abbildung 16).

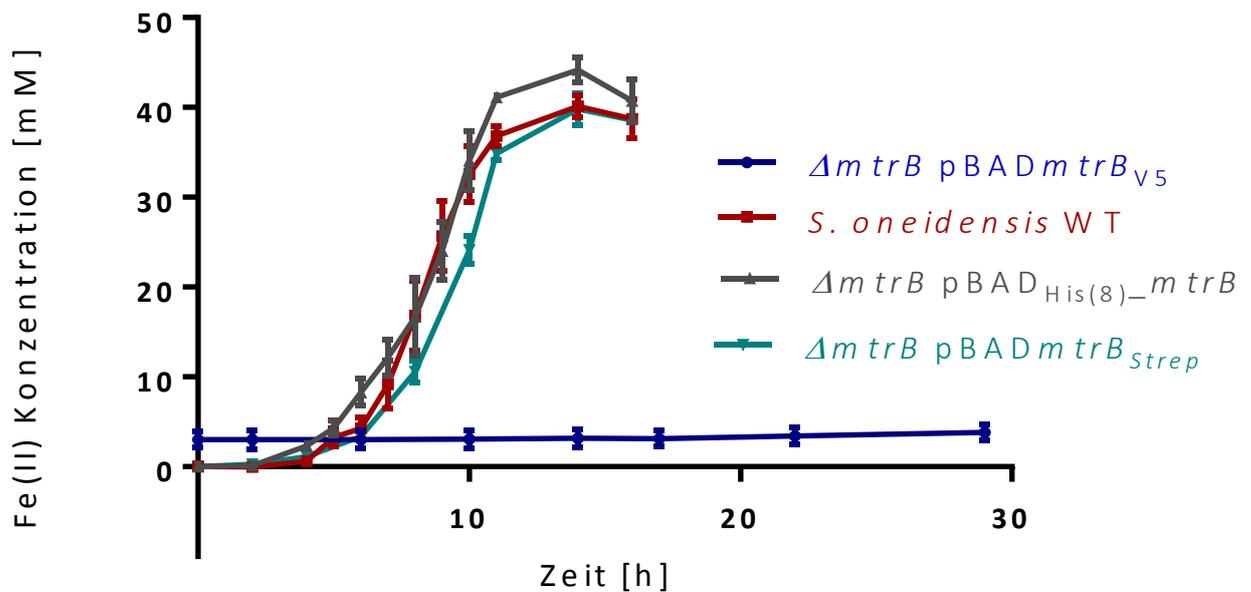


Abbildung 16: Eisenreduktionsraten von einem $\Delta mtrB$ pBADmtrB_{V5}, einem $\Delta mtrB$ pBADmtrB_{Strep} und einem $\Delta mtrB$ pBAD_{His(8)}mtrB Stamm. Als Vergleich wurde ein *S. oneidensis* WT mitbestimmt. Die Fehlerbalken wurden durch die Abweichung von 3 unabhängigen Proben generiert.

Die Möglichkeiten einen His-Tag an den N-Terminus und einen Strep-Tag an den C-Terminus von MtrB zu setzen, lässt eine Interaktion von MtrA und MtrB in der Mitte des Proteins vermuten. Es wurde daher eine Punktmutation an Position 432-439 von MtrB generiert. Die Aminosäuresequenz DRETTDE zwischen Position 432 und 439 wurde in die Sequenz AVKPRMK getauscht. Der Austausch der Aminosäuren fand in dem pBADmtrB Plasmid, welches in Abbildung 15 schon getestet wurde, statt. Das dadurch entstandene Plasmid wurde in einen $\Delta mtrB$ Stamm transformiert, wodurch ein $\Delta mtrB$ pBADmtrB PM 432-439 Stamm entstand. Das MtrB PM 432-439 wurde durch die Zugabe von 0,1 mM Arabinose induziert und die Reduktionsrate in M4 Medium mit Fe(III) Citrat als Elektronenakzeptor mit der Ferrozinmethode bestimmt.

Der $\Delta mtrB$ pBADmtrB PM 432-439 Stamm weist einen Phänotyp in der Reduktionsrate gegenüber dem *S. oneidensis* WT auf (Abbildung 17).

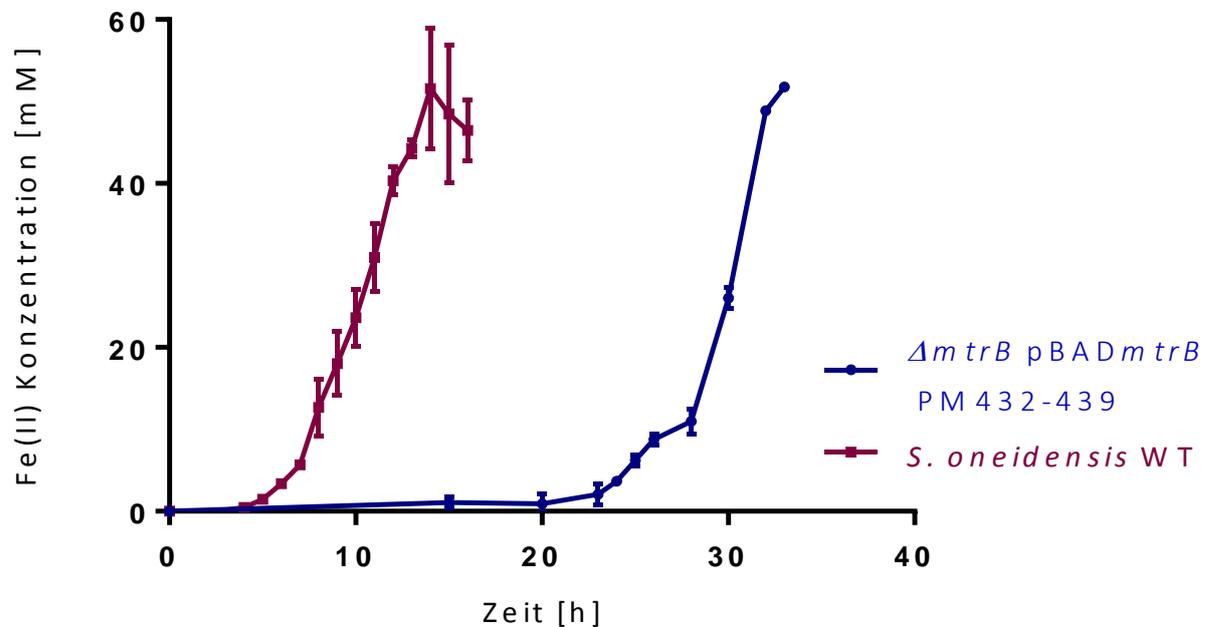


Abbildung 17: Fe(II)-Reduktion einer $\Delta mtrB$ pBADmtrB PM 432-439 Mutante. Als Vergleich ist der *S. oneidensis* WT mit in den Graphen integriert. Die Fehlerbalken resultieren aus einem Duplikat der Proben.

Für die Untersuchung der Präsenz von MtrB in der Zelle wurden die beiden $\Delta mtrB$ pBADmtrB PM 432-439 aus dem Duplikat nach der Reduktion von 50 mM Eisencitrat geerntet und die äußere Membran separiert. Die Proben wurden jeweils bei 37 °C und bei 95 °C denaturiert, um einen möglichen Effekt der Mutation auf die Faltung von MtrB zu untersuchen. Die Proben zeigen nur nach Denaturierung bei 95 °C eine Bande. Nach einem Erhitzen der Probe auf 37 °C kann MtrB nicht detektiert werden (Abbildung 18).

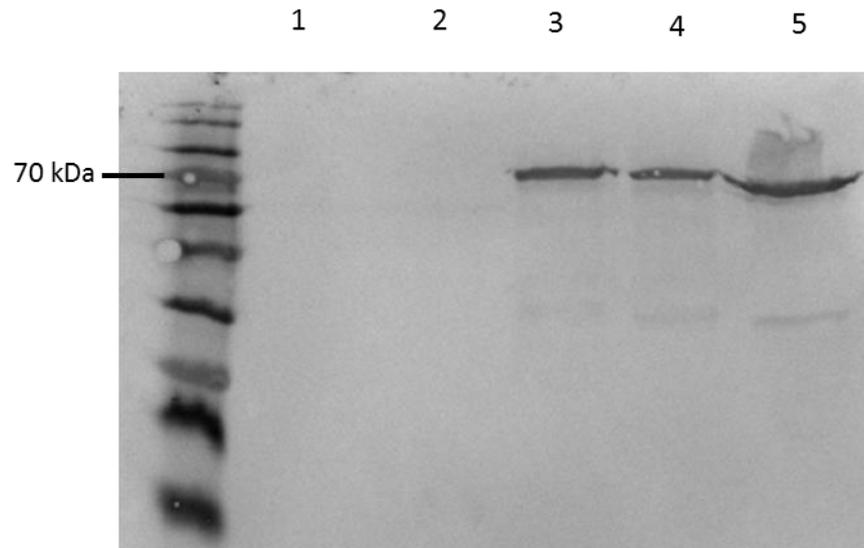


Abbildung 18: Blot der beiden $\Delta mtrB$ pBAD*mtrB* PM 432-439 Stämme nach Reduktion von 50 mM Eisencitrat. Die äußeren Membranen von Probe 1 und Probe 2 wurden einmal bei 37 °C denaturiert (1; 2) und einmal bei 95 °C denaturiert (3; 4). Als Positivkontrolle wurde die äußere Membran eines *S. oneidensis* WT Stammes bei 95 °C denaturiert (5). Es wurden jeweils 25 µg Protein geladen.

3 Detektion von MtrB auf dem Blot unter verschiedenen Bedingungen

3.1 Stabilität von MtrB in verschiedenen *surA*, *skp*, *degP* und *mtrA* Mutanten

Dass das periplasmatische *c*-Typ Cytochrom MtrA einen Einfluss auf den Abbau des OMPs MtrB durch die Protease DegP hat, konnte schon gezeigt werden (Schicklberger *et al.*, 2011). Auf dieser Kenntnis aufbauend sollte der Einfluss der Chaperone SurA und Skp, welche für die korrekte Faltung von äußeren Membranproteinen zuständig sind, untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Deletionsmutanten hergestellt und die Existenz von MtrB mittels Western-blot analysiert. Da ein knock out von beiden Wegen, welche für den Einbau von OMPs zuständig sind, letal für die Zelle ist, konnte SurA nur einzeln deletiert werden.

Die Zellen wurden anaerob in M4-Medium mit Fumarat als Elektronenakzeptor bis zu einer OD_{600} von 0,7 angezogen. Die Zellen wurden nach der Ernte in Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4), welcher 2 % Triton X-100 enthält, resuspendiert und mit der French-press aufgeschlossen. Durch das Triton X-100 gelangt der Größte Teil der inneren Membran in Lösung. Durch Ultrazentrifugation wird die äußere Membran vom Rest der Zelle separiert. Es wurden 25 µg

Protein bei 95 °C denaturiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem anti-MtrB Antikörper.

In der $\Delta mtrA$ Mutante konnte kein MtrB detektiert werden. Das MtrB ist in den $\Delta surA$ und Δskp Stämmen in der äußeren Membran detektierbar. In den $\Delta mtrA\Delta degP$ und $\Delta mtrA\Delta degP\Delta skp$ Stämmen ist MtrB in der äußeren Membran trotz des fehlenden MtrA nachweisbar. Der *S. oneidensis* WT Stamm diente als Positivkontrolle (Abbildung 19).

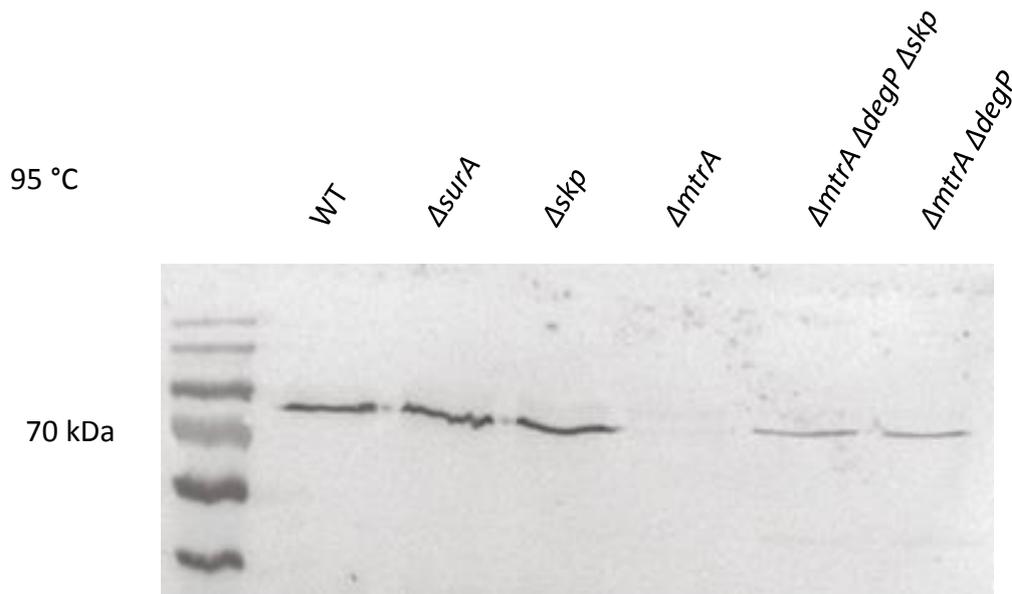


Abbildung 19: Detektion von MtrB in verschiedenen Mutanten nach der Denaturierung der Proben bei 95 °C. MtrB wurde mit dem anti-MtrB Antikörper detektiert. Nur in der $\Delta mtrA$ Mutante kann MtrB nicht nachgewiesen werden.

Die äußeren Membranproteine sind sehr stabil und bilden oft Aggregate, wenn sie von dem zuständigen Chaperon nicht in Lösung gehalten werden. Sie können daher bei nicht vollständiger Denaturierung unterschiedliche Laufeigenschaften in einem SDS-Gel aufweisen, wenn sie korrekt oder falsch gefaltet sind (Burgess *et al.*, 2008). Es wurde daher derselbe Versuchsansatz, wie in Abbildung 19 gezeigt wurde, erneut durchgeführt. Die Proteine wurden jedoch nicht bei 95 °C, sondern nur bei 37 °C denaturiert.

Bei dem Erwärmen der Proben auf 37 °C kann MtrB in den $\Delta mtrA\Delta degP$ und bei den $\Delta mtrA\Delta degP\Delta skp$ Stämmen detektiert werden. Bei den anderen Stämmen kann MtrB nicht detektiert werden (Abbildung 20).

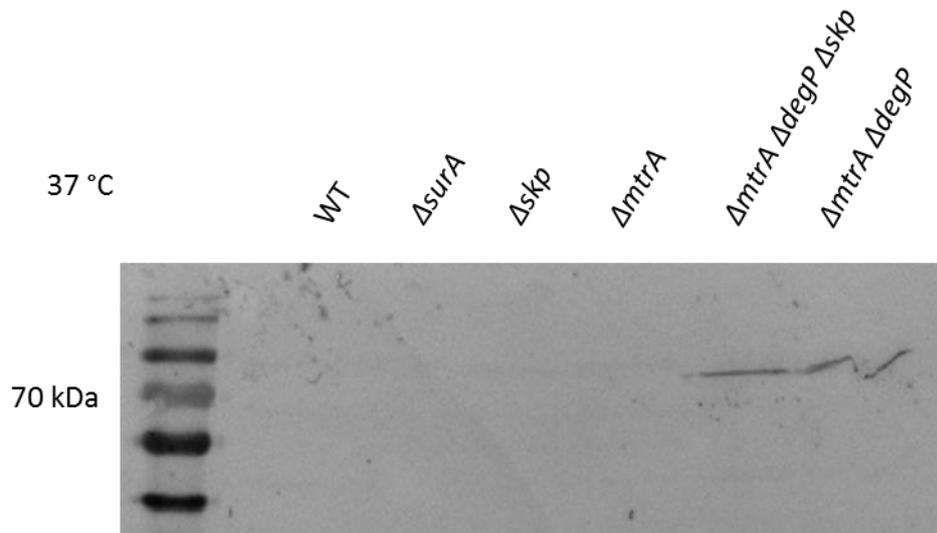


Abbildung 20: Detektion von MtrB in verschiedenen Mutanten nach Erwärmen der Probe auf 37 °C. Der Nachweis erfolgte mit einem anti-MtrB Antikörper. Beim WT, $\Delta surA$ und Δskp Stamm kann kein MtrB mehr nachgewiesen werden. Bei $\Delta mtrA \Delta degP$ und bei $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ kann MtrB immer noch nachgewiesen werden.

Bei den Stämmen *S. oneidensis* WT, $\Delta surA$ und Δskp ist MtrB zwar vorhanden (Abbildung 19) das Epitop für den anti-MtrB Antikörper ist jedoch nicht zugänglich, wodurch eine Detektion von MtrB nicht möglich ist. Bei der $\Delta mtrA$ Mutante ist MtrB in der Zelle nicht präsent und kann daher in beiden Fällen nicht nachgewiesen werden. In den $\Delta mtrA \Delta degP$ und $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ Stämmen ist in beiden Fällen, bei einer Denaturierung bei 95 °C und 37 °C MtrB nachweisbar. Es zeigt sich ein unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Gel, wenn MtrA in der Zelle anwesend oder abwesend ist.

3.2 Lokalisation von MtrB in einem $\Delta degP \Delta skp \Delta mtrA$ Stamm

In den vorangegangenen Versuchen wurde ausschließlich die äußere Membran untersucht. Es stellt sich also die Frage, ob MtrB richtig in der äußeren Membran eingebaut wird, ob es im Periplasma verbleibt oder in der inneren Membran vorhanden ist. Desweiteren musste untersucht werden, ob sich MtrB wildtypisch verhält, wenn MtrA exprimiert wird, aber DegP und Skp fehlen. Es wurde daher ein $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ pBADmtrA_{His} Stamm generiert und mit einem $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ Stamm verglichen.

Das Periplasma wurde mit der Periplasmapräparation gewonnen und die innere und äußere Membran mit 0,5 % Lauroylsarcosin getrennt. Für die vollständige Denaturierung und die mögliche Detektion von MtrB mit dem anti-MtrB Antikörper wurden die Proben bei 95 °C bearbeitet.

MtrB ist mit MtrA und auch ohne MtrA nur in der äußeren Membran zu detektieren. Im Periplasma und in der inneren Membran ist es in beiden Fällen nicht möglich MtrB zu detektieren und bei vollständiger Denaturierung somit nicht vorhanden (Abbildung 21).

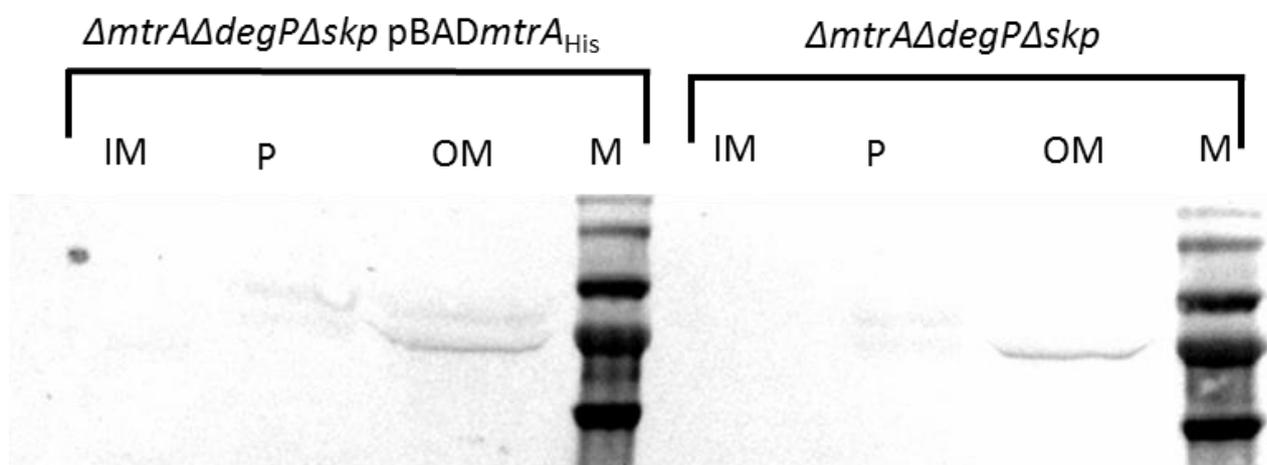


Abbildung 21: Detektion von MtrB nach Denaturierung der Probe bei 95 °C. Links sind Fraktionen des $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ pBADmtrA_{His} Stammes aufgetragen und rechts die des $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ Stammes. Es wurden verschiedene Teile der Zelle separiert und aufgetragen: IM: innere Membran, P: Periplasma, OM: äußere Membran (outer membrane) und M: Marker.

Die Proben der $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ pBADmtrA_{His} und $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ Stämme wurden noch mal auf ein SDS-Gel aufgetragen, wobei die Proben nur bei 37 °C denaturiert wurden. Durch die Denaturierung der Proben bei niedrigen Temperaturen sollte erneut die Stabilität von MtrB in An- oder Abwesenheit von MtrA untersucht werden.

Abbildung 22 zeigt eine Detektion von MtrB in der äußeren Membran des $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ Stammes. In Anwesenheit von MtrA in einem $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ pBADmtrA_{His} Stamm kann MtrB jedoch bei einer Denaturierung bei 37 °C nicht nachgewiesen werden. Auch in Abbildung 22 kann MtrB weder im Periplasma noch in der inneren Membran nachgewiesen werden.

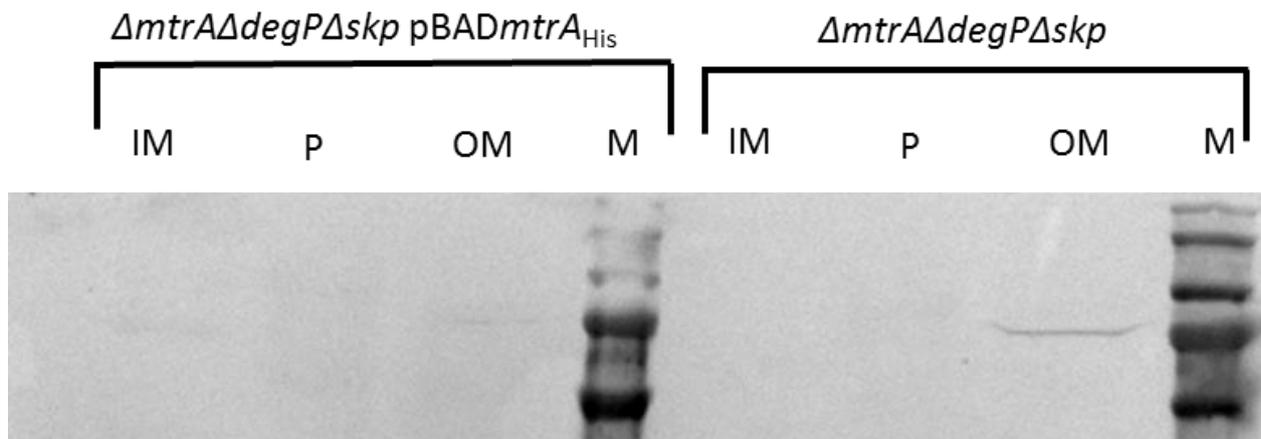


Abbildung 22: Detektion von MtrB durch Denaturierung der Probe bei 37 °C. Links sind die Teile des $\Delta mtrA\Delta degP\Delta skp$ pBADmtrA_{His} Stammes aufgetragen und rechts die des $\Delta mtrA\Delta degP\Delta skp$ Stammes. Es wurden verschiedene Teile der Zelle separiert und aufgetragen: IM: innere Membran, P: Periplasma, OM: äußere Membran (outer membrane) und M: Marker.

3.3 In vitro Proteinexpression

Für die *in vitro* Proteinexpression wurde das MembraneMax HN Kit verwendet. Die einzelnen Komponenten, welche für die Proteinexpression nötig sind, stammen hierbei aus einem *E. coli* Stamm. Durch die Zugabe eines Plasmides mit einem T7-Promotor kann das gewünschte Protein direkt exprimiert werden. Die im Kit enthaltene Membran wird von einem Protein zusammengehalten, welches einen His-Tag besitzt, wodurch die Membranfraktion nach der Proteinexpression über eine His-Tag Säule gereinigt werden kann. Der Ablauf des Versuches ist in Abbildung 23 zur Verdeutlichung schematisch dargestellt.

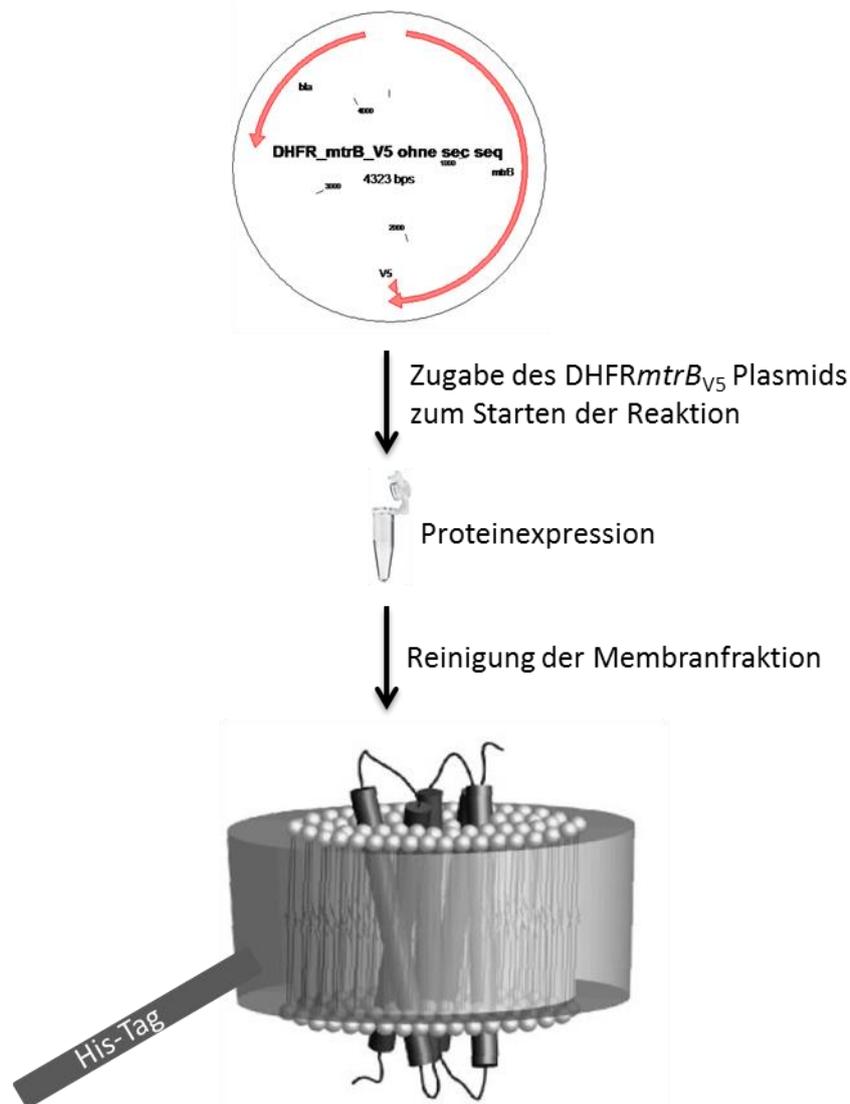


Abbildung 23: Schematischer Ablauf des Versuchs für die in vitro Proteinexpression mit anschließender Trennung der Membranfraktion und der löslichen Fraktion.

Um den Einfluss von MtrA auf die Faltung von MtrB zu testen, wurde gereinigtes *onestrep*MtrA in einer Menge von 1,2 µg Protein in 20 µl Reaktionsvolumen für die Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde bei 30 °C für 4 h inkubiert und anschließend die Membranfraktion und die lösliche Fraktion voneinander getrennt. Für die Expression von MtrB wurde das DHFR*mtrB*_{V5} Plasmid verwendet. Das V5-Epitop wurde aufgrund der Möglichkeit der Detektion von Aggregaten von MtrB verwendet. Da in diesem Kit für die Lokalisation des Proteins keine Signale notwendig sind, verhindert der V5-Tag nicht die Integration von MtrB in die Membran. Zudem wurde bei dem *mtrB*_{V5} Gen die Sekretionssequenz entfernt, da sie auch in vivo beim Transport durch die innere Membran durch das Sec-System entfernt wird und beim Einbau in die äußere Membran oder der Interaktion mit anderen Proteinen im

Periplasma nicht mehr vorhanden ist. Um eine vollständige Denaturierung von MtrB auszuschließen wurde die Probe einmal bei 37 °C und einmal bei 95 °C inkubiert, um MtrB zu denaturieren.

In Abbildung 24 wird die Detektion von MtrB mittels des anti-V5 Antikörpers bei verschiedenen Temperaturen in der Membranfraktion und dem löslichen Teil gezeigt. Die lösliche Fraktion stellt in diesem Fall das Periplasma dar, in dem jedoch keine Proteasen für den Abbau von falsch lokalisiertem MtrB vorhanden sind. In der löslichen Fraktion werden zwei Banden detektiert. Die obere Bande bei 120 kDa enthält Aggregate von MtrB, die untere Bande ist nicht aggregiertes MtrB. Das MtrB kann mit und ohne MtrA bei 95 °C und bei 37 °C detektiert werden. In der Membranfraktion wurde nur die untere Bande bei 70 kDa detektiert. Auf dieser Höhe läuft MtrB, wenn es als Monomer vorliegt und vollständig denaturiert ist. Es konnte aber auch hier bei 95 °C und auch bei 37 °C in beiden Fällen, mit oder ohne MtrA, detektiert werden.

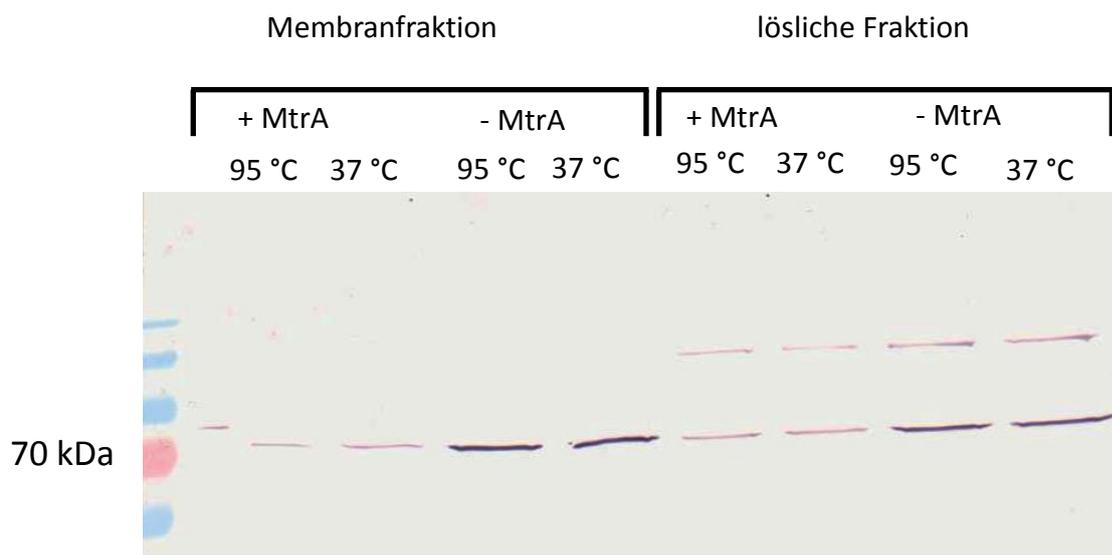


Abbildung 24: Detektion von MtrB mit dem anti-V5 Antikörper nach Denaturierung der Proben bei 95 °C und 37 °C. Auf der linken Seite ist die gereinigte Membranfraktion, auf der rechten Seite ist die lösliche Fraktion aufgetragen. Es sind jeweils zwei Proben von der Reaktion mit MtrA (+ MtrA) und einmal die Expression von MtrB ohne die Zugabe von MtrA (- MtrA) einmal bei 37 °C und einmal bei 95 °C Denaturierung der Proteine.

Die weitere Untersuchung der oberen Bande bei ca. 120 kDa im löslichen Teil, wurde durch Elution der Bande aus einem bestehenden Gel durchgeführt. Es wurde zu diesem Zweck eine SDS-PAGE mit DATD anstelle von Bisacrylamid für die Quervernetzung hergestellt. Das DATD kann mit Hilfe von Natriumperodat durch eine Glycolspaltung getrennt werden, wodurch

die Quervernetzung im Gel verloren geht. Anschließend kann das Protein mit einer TCA-Fällung aus dem Gel eluiert werden. Das Proteinpellet wurde in 15 μ l 6-fach Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die denaturierte Probe wurde anschließend auf ein SDS-Gel geladen und mithilfe einer Coomassiefärbung wurden die Proteine sichtbar gemacht. Auf der Höhe von 70 kDa, auf der MtrB in denaturiertem Zustand läuft, wurde eine schwache Bande sichtbar. Es ist keine weitere Bande auf dem Gel detektierbar gewesen (Abbildung 25). Das Gel mit DATD als Quervernetzung wurde mit 50 μ g Protein beladen.

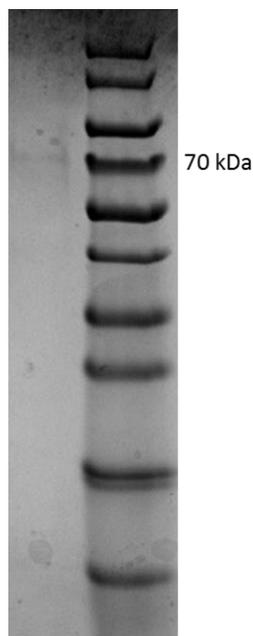


Abbildung 25: Coomassiefärbung der SDS-PAGE nach Elution der Bande bei ca. 120 kDa aus einem Gel mit DATD als Quervernetzung und Laden auf ein neues Gel.

4 Analyse von MtrC Punktmutationen

Es ist zwar bekannt, dass MtrC über das Typ-II-Sekretionssystem in die äußere Membran gebracht wird (Richter *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2008), die Erkennungssequenz oder Funktion des Einbaus in die äußere Membran ist bisher aber gänzlich unbekannt. Es wurden daher die Aminosäuresequenzen der fünf äußeren Membranproteinen von *S. oneidensis*, welche in den Mtr-Pfad eingebunden sind, untersucht und genauer betrachtet. Es konnte dabei eine stark konservierte Sequenz direkt hinter dem Lipidanker ausgemacht werden (Abbildung 26). Von MtrC, OmcA und MtrF sind sowohl die Expression wie auch die Funktion weitgehend

bestimmt. Die Induktion der Expression erfolgte mit 0,1 mM Arabinose. Die LB Vorkultur mit einer OD_{600} von zwei wurde 1:500 in das M4-Medium zugegeben.

Die Reduktionsrate des ΔOMC pBAD*mtrC* D9G Stammes ist nur gering niedriger als die des ΔOMC pBAD*mtrC* Stammes ohne Punktmutation im MtrC. Der ΔOMC pBAD*mtrC* PM 5-9 hat eine ca. 29 h andauernde Latenzphase bevor die Reduktion von Eisencitrat beginnt. Nach Beendigung der Latenzphase wird das Eisencitrat jedoch innerhalb von 11 h komplett reduziert, was mit der Reduktionsrate des ΔOMC pBAD*mtrC* Stammes wieder gleich kommt (Abbildung 27).

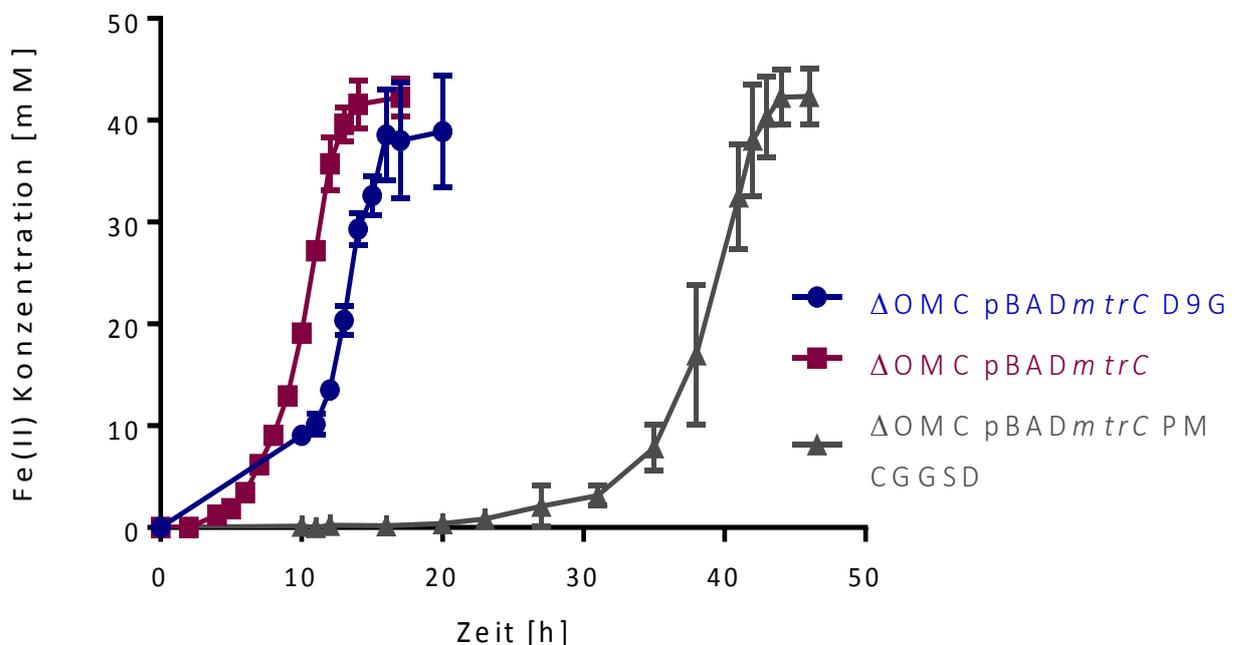


Abbildung 27: Bestimmung der Eisenreduktion des ΔOMC pBAD*mtrC* Stammes und den beiden Punktmutationen ΔOMC pBAD*mtrC* D9G und ΔOMC pBAD*mtrC* PM 5-9.

Es stellt sich aufgrund der vergleichbaren Reduktionsrate des ΔOMC pBAD*mtrC* PM 5-9 Stammes die Frage, ob die Zellen eine andere Möglichkeit zur Eisenreduktion nutzen, oder ob die Expression der Punktmutierten Version von MtrC entsprechend lange braucht, um danach mit der gleichen Rate zu starten. Um diese Frage zu beantworten sollte eine Hämefärbung der äußeren Membran gemacht werden und die Präsenz von MtrC untersucht werden. Da FccA auch in der Fraktion der äußeren Membran detektiert werden kann, würde

dies die Unterscheidung von MtrC massiv stören, weswegen der Versuch in $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ Zellen durchgeführt wurde. In einem $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ Stamm sollte nur MtrA und MtrC als einzige c-Typ Cytochrome in der äußeren Membran vorliegen. Mit den $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC D9G und $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC PM 5-9 Zellen wurde genauso verfahren wie bei den Versuchen zur Bestimmung der Reduktionsrate und die Zellen wurden nach der vollständigen Reduktion des Eisencitrats geerntet. Die Präparation der äußeren Membran wurde mit 2 % Triton X-100 durchgeführt. Im Überstand konnte durch den Bradford Test kein Protein festgestellt werden, weswegen dieser nicht weiter berücksichtigt wurde. Es wurden 40 μg Protein auf das Gel geladen und mit der Häm-färbung die Cytochrome sichtbar gemacht.

MtrA ist in beiden Fällen bei 37 kDa sichtbar, wobei die Konzentration von MtrA bei den $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC PM 5-9 Zellen wesentlich höher ist als bei den $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC D9G Zellen. Bei den $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC D9G Zellen ist eine deutliche Färbung bei 70 kDa sichtbar. Bei den $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC PM 5-9 Zellen hingegen ist nur eine sehr schwache Bande auf dieser Höhe erkennbar.

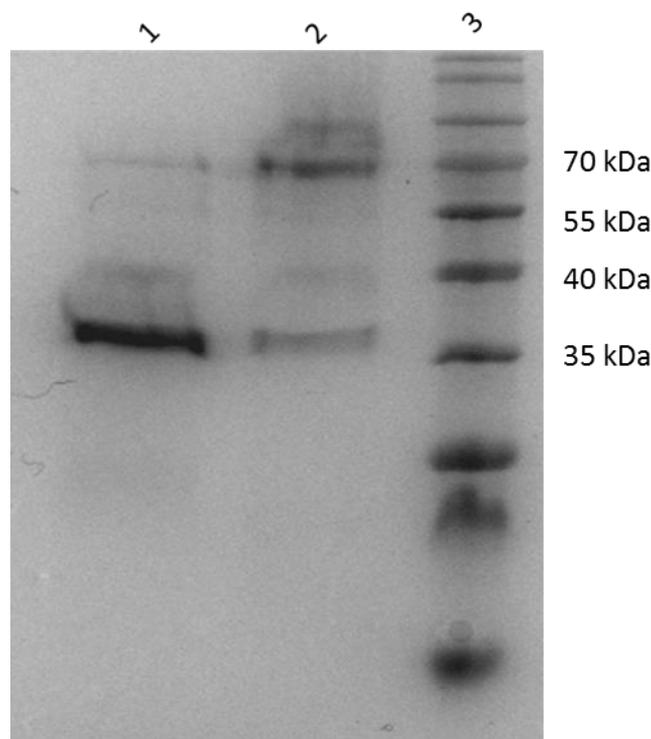


Abbildung 28: Detektion der Cytochrome in der äußeren Membran mittels Häm-Färbung der $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC PM 5-9 (1) und $\Delta\text{OMC}\Delta\text{fccA}$ pBADmtrC D9G (2) Zellen. Auf der rechten Seite ist der Marker erkennbar (3). Es wurden 40 μg Protein geladen.

5 Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenzen der Lipoproteine

Durch die Ergebnisse der in MtrC eingeführten Punktmutationen und dem Phänotyp bei vollständiger Veränderung der CGGSD Region, wurde die Homologie der Lipoproteine untereinander eingehender untersucht. Dafür wurden weitere Lipoproteine aus *S. oneidensis* gesucht, welche ein ähnliches Motiv direkt hinter dem Lipidanker enthalten. Bei den weiteren Untersuchungen wurde das Motiv auf das Cystein, welches zu dem Lipidanker gehört am Anfang und die Asparaginsäure am Ende beschränkt. Es wurde nicht vorausgesetzt, dass es sich bei den Proteinen um c-Typ Cytochrome handeln muss. Daraus ergab sich eine CXD Consensus Sequenz, wobei ein X zwischen einer und fünf Aminosäuren Länge untersucht wurde, wobei die Aminosäuren zwischen dem Cystein und der Asparaginsäure nicht definiert wurden.

Es wurden noch sechs weitere Lipoproteine mit einer CXD Sequenz, welche keine c-Typ Cytochrome sind gefunden. Das SO_4018 Protein hat die gleiche Sequenz wie MtrC, die Funktion ist jedoch unbekannt. DmsA ist mit einer Lokalisation in den extrazellulären Raum in der äußeren Membran verankert, DmsA ist für die Reduktion von DMSO zuständig (Gralnick *et al.*, 2006). BamE ist Teil des Bam-Komplexes mit Lokalisation im Periplasma. Es hat zwar eine CXD Sequenz, ist mit einer CSVFD Sequenz aber nicht mit der CGGSD Sequenz von MtrC vergleichbar. Die Lokalisation der anderen Proteine UshA, SO_2281 und SO_4356 ist unbekannt.



Abbildung 29: Lipoproteine aus *S. oneidensis* mit einer CXD Sequenz direkt an den Lipidanker anschließend, welche keine c-Typ Cytochrome sind. Als Vergleich ist MtrC als einziges c-Typ Cytochrom beigefügt.

Es stellt sich die Frage, ob diese Sequenz für *S. oneidensis* spezifisch ist, oder ob diese Sequenz auch in anderen Organismen, bei denen eine Möglichkeit zur dissimilatorischen Eisenreduktion nachgewiesen wurde, genutzt wird. Es wurde daher in allen Proteobakterien, welche Eisen reduzieren können nach einer CXD Sequenz gesucht. Dabei wurde wieder das Cystein, welches als letzte Aminosäure des Lipidankers hoch konserviert ist, als Beginn des Motivs betrachtet. Weiter wurde eine Asparaginsäure oder eine Glutaminsäure, aufgrund der ähnlichen Eigenschaft der zwei Aminosäuren, wieder mit einem Abstand zwischen einer und fünf Aminosäuren hinter dem Cystein als Endpunkt angenommen. Es wurde nach Lipoproteinen im Allgemeinen gesucht und nicht spezifisch nach *c*-Typ Cytochromen. Da in *S. oneidensis* auch Lipoproteine mit unbekannter Funktion gefunden wurden, welche ein CXD Motiv beinhalten, wurde auch bei dieser Suche die Funktion der einzelnen Lipoproteine nicht berücksichtigt.

		20		40		60		80																																																																															
ABX48785	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	A	Q	T	T	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	T	M	A	L	-	A	G	C	-	G	-	S	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	E	P	A	P	-	A	I	Q	T	L	N	F	T	F	D	-	K	S	V	I	58											
WP_012088805	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	A	Q	T	T	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	T	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	S	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	E	P	A	P	-	A	I	Q	I	L	N	F	T	F	D	-	K	S	V	I	58											
WP_028760482	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	A	Q	T	T	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	T	M	A	L	-	A	G	C	-	G	-	S	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	E	P	A	P	-	A	I	Q	T	L	N	F	A	F	D	-	K	S	V	V	58											
WP_011846453	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	A	Q	T	T	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	T	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	S	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	E	P	A	P	-	A	I	Q	T	L	N	F	T	F	D	-	K	S	V	V	58											
WP_012588039	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	A	Q	T	T	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	T	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	S	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	E	P	A	P	-	A	I	Q	T	L	N	F	T	F	D	-	K	S	V	V	58											
WP_011919067	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	A	Y	K	S	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	S	M	A	L	-	V	G	C	-	G	-	S	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	E	T	G	-	-	G	E	P	A	G	-	A	I	Q	T	L	N	F	N	F	E	-	K	A	L	I	58											
WP_011759324	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	T	Q	K	T	K	I	A	L	-	-	L	I	A	A	S	A	-	-	L	G	L	-	T	A	C	-	G	-	S	D	G	S	D	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	E	P	A	G	-	S	I	A	E	L	H	F	T	F	N	-	D	T	R	I	56											
WP_012155924	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	T	N	K	S	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	G	A	V	S	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	D	D	G	N	D	G	N	S	G	-	-	N	P	G	-	-	G	P	A	A	D	-	Y	I	N	T	L	N	L	K	V	T	-	D	V	T	Y	58											
WP_012277865	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	T	N	K	S	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	G	A	V	S	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	D	D	G	N	D	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	P	A	A	D	-	Y	I	N	T	L	N	L	K	V	T	-	D	V	T	Y	58											
WP_020913332	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	V	K	K	S	K	I	A	L	-	-	L	L	A	A	G	A	V	S	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	D	D	G	T	D	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	P	A	A	D	-	Y	I	N	T	L	N	L	K	V	T	-	D	V	T	Y	58											
WP_012141872	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	V	K	N	N	K	F	A	L	-	-	L	L	A	A	S	A	V	S	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	S	D	G	D	D	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	P	V	A	E	-	Y	I	N	T	L	N	L	D	V	T	-	K	V	T	Y	58											
WP_011866322	M	-	-	-	-	-	-	-	-	MN	V	Q	N	N	K	F	K	L	-	-	L	L	A	A	G	A	V	S	M	A	L	-	T	G	C	-	G	-	S	D	G	S	D	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	P	A	A	D	-	A	I	E	V	L	H	L	D	V	T	-	K	V	E	Y	58											
CAD66548	M	D	D	L	C	R	E	N	-	-	M	M	N	K	K	Y	T	K	M	A	L	-	-	L	L	A	M	S	A	S	M	T	L	-	V	G	C	-	G	G	D	D	G	E	A	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	E	P	A	E	-	A	I	K	T	L	N	L	D	I	T	-	K	V	T	Y	66									
WP_011638087	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	N	K	K	Y	T	K	M	A	L	-	-	L	L	A	M	S	A	S	M	T	L	-	V	G	C	-	G	G	D	D	G	E	A	G	N	P	G	-	-	N	P	G	-	-	G	E	P	A	E	-	A	I	K	T	L	N	L	D	I	T	-	K	V	T	Y	58										
WP_013344867	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	T	N	N	K	M	Q	W	R	L	-	-	T	A	C	A	A	I	M	A	T	A	L	-	V	G	C	-	G	-	D	D	G	N	D	G	N	D	G	P	G	-	-	R	P	G	-	-	G	N	P	A	E	-	T	I	A	Q	L	N	L	E	V	T	-	K	V	E	59								
ABX48787	M	-	-	-	-	N	K	F	-	-	A	K	M	S	T	Q	F	S	L	M	L	-	-	A	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	K	G	Q	D	G	N	P	G	-	-	E	P	A	-	-	K	P	P	A	L	-	T	I	T	S	L	N	V	M	V	D	-	K	V	A	56										
WP_012088807	M	-	-	-	-	N	K	F	-	-	A	K	M	S	T	Q	F	S	L	M	L	-	-	A	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	K	G	Q	D	G	N	P	G	-	-	E	P	A	-	-	K	P	P	A	L	-	T	I	T	S	L	L	K	V	M	I	D	-	K	V	A	56									
ABN61105	M	-	-	-	-	N	K	F	-	-	A	K	M	S	T	Q	F	S	L	M	L	-	-	A	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	K	G	Q	D	V	N	P	G	-	-	E	P	A	-	-	K	P	P	A	L	-	T	I	T	S	L	L	K	V	M	V	D	-	K	V	A	56									
WP_012588037	M	-	-	-	-	N	K	F	-	-	A	K	M	S	S	K	F	S	L	M	L	-	-	V	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	N	G	Q	D	G	N	P	G	-	-	E	P	A	-	-	K	P	P	A	L	-	T	I	T	S	L	L	N	V	M	V	D	-	K	V	A	56									
WP_028760480	M	-	-	-	-	N	K	F	-	-	A	K	I	R	T	Q	F	S	L	M	L	-	-	A	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	N	G	Q	D	G	N	P	G	-	-	E	P	A	-	-	K	P	P	A	L	-	T	I	T	S	L	L	N	I	M	V	D	-	K	V	A	56									
AAD05536	M	-	-	-	-	N	K	F	-	-	A	S	F	T	T	Q	Y	S	L	M	L	-	-	L	I	A	T	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	S	D	G	D	D	G	S	P	G	-	-	E	P	G	-	-	K	P	P	A	M	-	T	I	S	S	L	N	I	S	V	D	-	K	V	A	I	57									
WP_012277861	M	-	-	-	-	K	R	V	T	Q	S	-	-	L	A	I	K	-	-	S	I	P	L	-	-	M	L	I	A	-	-	V	L	A	-	G	-	C	-	G	-	-	G	D	D	G	N	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	S	E	I	N	S	L	D	I	V	N	-	E	V	L	F	57								
WP_012155920	M	-	-	-	-	K	R	V	T	Q	S	-	-	L	I	A	K	I	A	K	T	I	P	L	-	-	L	I	A	-	-	M	L	A	-	G	-	C	-	G	-	-	G	D	D	A	Q	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	S	E	I	N	S	L	N	I	S	V	N	-	E	V	L	F	60							
WP_020913328	M	-	-	-	-	K	L	I	T	Q	S	-	-	-	-	R	L	H	K	S	I	P	L	-	-	G	L	I	A	-	-	M	L	A	-	A	C	-	G	-	-	G	D	D	G	S	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	S	V	I	N	E	L	N	I	T	I	K	-	D	V	A	F	57								
ABO24387	M	-	-	-	-	M	K	M	N	K	T	-	-	-	-	F	-	-	-	H	Y	A	A	L	F	-	-	G	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	D	G	K	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	M	V	I	D	T	L	V	V	S	F	D	-	P	V	Q	M	56						
WP_041407290	M	-	-	-	-	N	K	T	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	H	Y	A	A	L	F	-	-	G	L	V	S	-	-	L	L	S	-	A	C	-	G	-	-	G	D	D	G	K	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	M	V	I	D	T	L	V	V	S	F	D	-	P	V	Q	M	53							
ABV36139	M	M	M	N	K	S	T	K	S	-	-	-	-	N	T	V	S	L	Y	R	L	I	P	L	-	-	T	L	T	-	-	L	L	A	-	A	C	-	G	-	S	-	G	D	D	G	A	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	S	D	I	S	T	L	M	V	E	V	T	-	G	V	T	62								
WP_041421594	M	-	-	-	-	N	K	S	T	K	S	-	-	-	N	T	V	S	L	Y	R	L	I	P	L	-	-	T	L	T	-	-	L	L	A	-	A	C	-	G	-	S	-	G	D	D	G	A	P	G	N	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	S	D	I	S	T	L	M	V	E	V	T	-	G	V	T	61							
WP_011759327	M	S	-	-	-	S	K	R	-	-	-	-	-	I	S	I	K	R	L	C	R	L	P	L	-	-	A	G	A	T	-	-	L	L	A	L	-	T	A	C	-	G	-	-	G	S	D	G	D	S	G	K	P	G	-	-	E	P	G	-	-	G	P	P	A	M	-	T	I	Q	S	L	H	V	E	F	M	D	V	G	F	-	T	D	G	V	65
WP_013344872	M	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	S	D	L	S	S	L																																																																		

WP_011759325	MMKR FN - FNA	---	ATKAIL	GA - GLLSL - -	- - TLV - C - G	- - SDG KDG ED	GKDG VIG VSI	DKTSTL KATF	TNAS IDAGV -	65
WP_012588038	MMKR FN - FNA	---	ATKAML	GA - GLLSL - -	- - LLA - C - G	- GSDG KDG ED	GKPG PVGLDI	SQATT LKATL	EDVK IDS GT -	66
WP_012141873	MMKK FNS FNA	KRS	AAAKAVL	SA - GILSF - -	- - ALA - C - G	- - SDG KDG ED	GKDG VVG VNI	DAAKS VNAIF	TNAT VEAGV -	70
WP_011638086	MMNT ITV - - -	- -	SPA AKAVL	SA - GLIAL - -	- - ALS - C - G	- GSDG TNG ED	GPDG IIG VNI	DATST LKATF	TDAT VVD GK -	66
WP_012155923	MMNK FN - - -	- -	LSAASKALL	TA - GVLSL - -	- - AVT - C - G	- - SDG KDG ND	GNDG VIG VSI	DNAKS INA IM	TDAT V DAGT -	65
WP_020913329	MEIK TRSSKL	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	61
WP_013344869	MTTTK QNW - -	- - - -	KLLA	SA - - AMVSL -	- - AL - S - C - G	- - SDG SDGSN	GEDG KPG PVG	IHSESPTVV	AHFT - - - DA	59
ABZ77335	MMMN - - - RY	KLTS	AVKSAI	GL - - GALSI -	- - AL - V - C - G	- - SDG KDG ED	GENG NIG VDI	QQATS LKANI	LHATVTEGV -	66
WP_012089796	MMNTN TRSQW	- - - -	KIF	TP - - IAVAV -	- - CLMTA - C - -	- - SDG EEGKE	GPPG IVS ISI	EQADTLKATI	EKVAIDAQTQ	64
WP_012587117	MMNTN TRSQW	- - - -	KIF	TP - - IAVAV -	- - CLMTA - C - -	- - SDG EEGKE	GPPG IVS ISI	EQADTLKATI	EKVAIDAQTQ	64
WP_011847421	MMNTN NR SQW	- - - -	KIF	TP - - IAVAV -	- - CLMTA - C - -	- - SDG EEGKE	GPPG IVS ISI	EQADTLKATI	EKVAIDAQTQ	64
ABX50413	MMNTN TRSQW	- - - -	KIF	TP - - IAVAV -	- - CLMTA - C - -	- - SDG EEGKE	GPSG IVS ISI	EQANTL KATI	EKVAIDAQTQ	64
WP_012156771	MMIM - - - - -	- - - -	TKKTS	LA - - LLIGSA -	- LFI - GC - -	- - SDG KDG KD	GEDGTPGGGG	E - - - PGTSGL	HID - MAEEAI	57
WP_012278727	MMIM - - - - -	- - - -	TKKTS	IA - - LLIGSA -	- LFI - GC - -	- - SDG KDG KD	GEDGAPGGGG	D - - - PGTSGL	HID - MAEEAI	57
WP_013346732	MT - K - - - -	- - - -	TNKNP	LW - LVLASAM	ALGL - AG - -	- - SGDDG KDGQ	DGAPGTPGNP	GEDGKPGTSG	LHID - MAEEA	62
WP_020913917	MK - - - - -	- - - -	FDMKVAT	LA - - TLTGL -	- - AL - AG - -	- - SGDDG TNGK	DGAPGTPG - -	- - - - TPGTPG	IPV - - ATDAK	53
ABD69442	M - - - - NFG -	- - - -	- - - -	FVRIAAATLM	IYTL - AG - G	GS - DGATGPT	GPTGPAGPPG	APGANAGSVV	KL - - - SSLTP	58
WP_011466339	M - - - - KYSE	LSS	QKRAGPH	WLKFAAAGLL	AAAI - AG - G	GS - DGAGPGA	GATGPAGATG	PAGTPAVPTV	SV - - - AALTP	69
ABD71778	M - - - - KYPD	LSS	RSLRST	WLKFASASLL	AVAI - AG - G	GGSDG APGAT	GAPGAPGAPG	APGVDLTA LV	NVGSNTT AAT	73
ADN75565	MTTW FNRQOD	RLMN	PSTPLA	PWRTLLATAT	LALTLTG - -	- PDDG DD - G	ADGPEGPPGE	VSLDVA - - -	- - AANSLNAT	69
WP_012531798	MQGT LWK KFS	TFL	- - - - -	- - - IASTAAA	ALFL - GC - -	- - EGDG KDRGE	PGKNAT - - - S	- FTNISSLTP	QQQANLTFDQ	62
WP_012774558	MQRK L LKRSS	SFL	- - - - -	- - - IALTAAA	TLFL - GC - -	- - EGDG KDPGA	PGRDAT - - - S	GFTNISSLTT	QQRVDLEFDQ	63
ABX48682	MMKN YNKS - -	- - - - -	- - - - -	- - LLALALVS	TLSL - TA - C - G	- - - D - - - - G	SDGQDGAPGT	PGTPTPTGTP	GTPGTPGTPA	56
WP_012588112	MMKN YNKS - -	- - - - -	- - - - -	- - LLALALVS	TLSL - TA - C - G	- - - D - - - - G	SDGQDGAPGT	PGTPTPTGTP	GTPGTPGTPA	56
WP_011846370	MMKN YNKS - -	- - - - -	- - - - -	- - LLALALVS	TLSL - TA - C - G	- - - D - - - - G	SDGQDGAPGT	PGTPTPTGTP	GTPGTP - - - A	53
WP_012088741	MMKN YNKS - -	- - - - -	- - - - -	- - LLALALVS	TLSL - TA - C - G	- - - D - - - - G	SDGQDGAPGT	PGTPTPTGTP	GTPGTP - - - A	53
WP_011636387	M - KN YNRT - -	- - - - -	- - - - -	- - LLAAA FIA	ALGV - TG - G	- - SDGS DGAA	GEPGT - - - PG	TPGTPTPTGT	PAGSVVTTVD	58
ABC82968	MK - - - QFTKR	TWETT	MTRRA	LTGLVAAIFA	ATSV - AG - S	- - GDG DPGS	PGPAGPPGAE	GPAGPTG - PT	GPQGPAGESP	72
WP_041453620	M - - - - - - -	- - - - -	TTRRA	LTGLVAAIFA	ATSV - AG - S	- - GDG DPGS	PGPAGPPGAE	GPAGPTG - PT	GPQGPAGESP	60
WP_007422213	M - - - - - - -	- TKG	HRAALLA	AAAAAAMSLP	GLAQ - AG - A	SG - DETAQA	ATGOTLYDAN	CAACHMTNLS	GGSGPALG - -	65
ACD95020	M - - - - - - -	- - - - -	ELKR	YLIFAVLLIS	LFTF - SG - -	- - GEDK TIYE -	- - TDTNTGGT	- TQKSFTFTS	QTDVAPSS - -	55
WP_011939597	M - - - - - - -	- - - - -	K - KR	ILTVSAMIM -	- - L - AG - -	- - GD FEWFPE	EKPATTITAS	TPTADSSTFT	NQCGVQTST -	54
WP_012531619	MTISG AIIAAG	ARRL	AGGRFR	PLRTSALLLA	TILLLSG - -	- - GD I VWFPP	YVRLGT - - - -	- - TP DQFTFP	AKTGTDKSV -	69
WP_041406027	MNNK - - - - -	- - - - -	- - - - -	SPLITLALIL	TTSL - AA - C - G	GS GD P - - - -	- - IDDTSPSP	KPPVVSYP SY	T - - - - - - -	46
ACM20218	M - - - - - - -	- - - - -	KYC	R - L - - - MFL	FTLLLGC - -	- GSDKT - SQN	G - STFAASEK	CI - - DCHNTS	QAISSVTGAK	53
WP_041267449	M - - - - - - -	- - - - -	KYC	R - L - - - MFL	FTLLLGC - -	- GSDKT - SQN	G - STFAASEK	CI - - DCHNTS	QAISSVTGAK	53
WP_012646948	M - - - - - - -	- - - - -	RLS	YPLTLILFSL	LL - LLTA - C - -	- GSDSSDSL	Q - STFAASDK	CI - - TCHNIS	SPVSKVTGAK	57
WP_012531782	M - - - - - - -	- - - - -	- - - - -	RLKSLFLFL	VPVLVAGCGG	GTSDNGVPI	KLAA SQCMN	LSC HGTMT - -	SPGTGAVIAD	59
WP_011940106	M - - - - - - -	- - - - -	KNG	FFTSLILLSL	LIAVMTG - -	- GSDNSGSQT	ALSTFAASEA	CI R - - CHTTT	NNISPVTGMN	59
WP_004513940	MYGN - - - - -	- - - - -	SVRR	LLLVGCLLTV	AAML - VC - G	SGS SKKE	GAGAGT	AQATPTGNIQ	SSV - - - - - -	50

In Abbildung 30 sind die Proteine mit einem CXD oder CXE Motiv der eisenreduzierenden Proteobakterien aufgelistet. Die Proteine stammen von den *Shewanella* und *Geobacter* Stämmen, welche für die DIR bekannt sind, von *Desulfovibrio desulfuricans*, *Rhodoferax ferrireducens*, *Ferrimonas balearica* und *Anaeromyxobacter dehalogenans*. Die Stämme *Rhodobacter capsulatus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Pelobacter carbinolicus* sind zwar für DIR bekannt, es wurden aber keine Lipoproteine mit entsprechendem CXD Motiv gefunden.

Aufgrund der Tatsache, dass nicht alle eisenreduzierenden Bakterien solch ein Motiv in den Lipoproteinen aufweisen, stellt sich die Frage wie es in Gram-negativen Bakterien aussieht, welche nicht zu DIR fähig sind. Bei DOLOP (database for bacterial lipoproteins) sind 278 bekannte Lipoproteine von verschiedenen Organismen aufgelistet. Es wurden nur die Lipoproteine der Gram-negativen Organismen untersucht. Das CXD oder CXE Motiv ist auch in Organismen zu finden, welche nicht zu DIR fähig sind (Abbildung 31). Die Charakteristik der Aminosäuren, welche zwischen dem Cystein und der Asparaginsäure oder Glutaminsäure liegen, wurde bei dem Alignment nicht berücksichtigt.

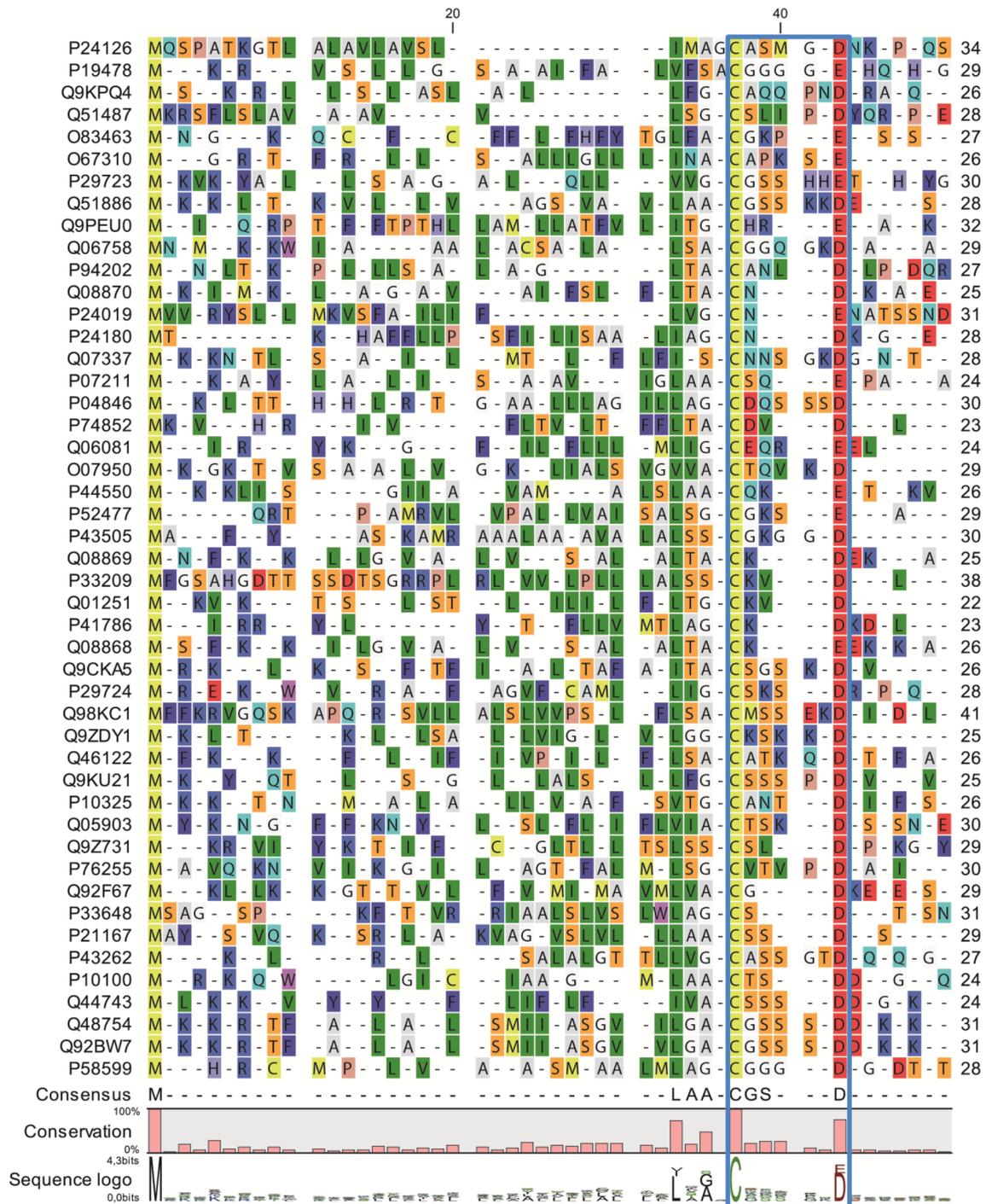


Abbildung 31: Bioinformatische Untersuchung der Lipoproteine von Organismen, welche nicht zur dissimilatorischen Eisenreduktion fähig sind. Untersucht wurde auf ein mögliches CXD/E Motiv. Die Anzahl der Aminosäuren nach dem Cystein wurde auf maximal fünf Aminosäuren begrenzt. Die Stelle des Motives ist blau umrandet.

Bei den verwendeten Organismen sind jedoch genügend Lipoproteine bekannt, welche kein CXD/E Motiv aufweisen können (Abbildung 32).

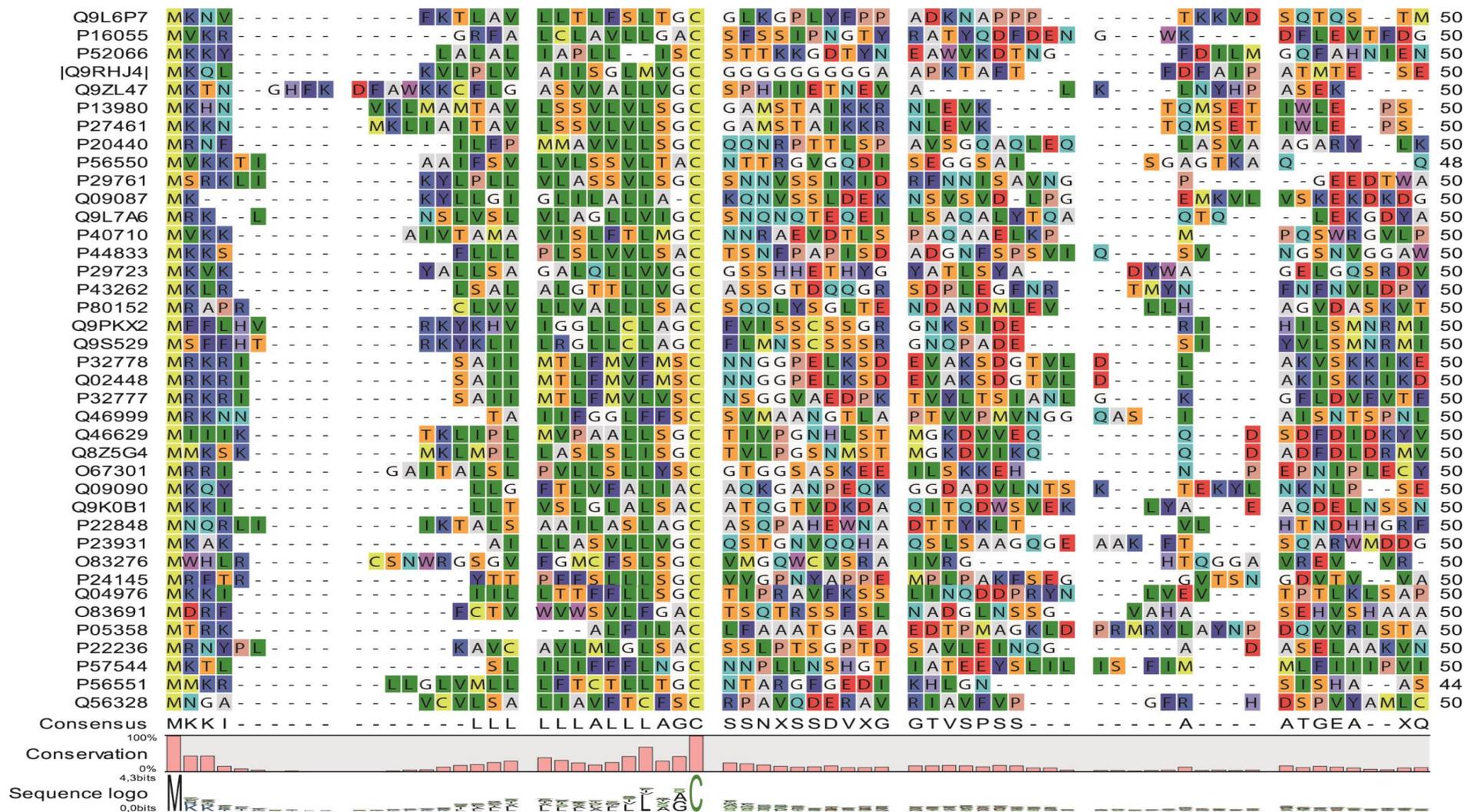


Abbildung 32: Lipoproteine Gram-negativer Organismen, die kein CXD/E Motiv an den Lipidanker anschließend haben.

V. Diskussion

1 Die Dynamik von MtrA bei der Bindung an MtrB in der äußeren Membran

Es konnte bereits gezeigt werden, dass MtrA für den Schutz von MtrB gegen den proteolytischen Abbau durch die Serinprotease DegP notwendig ist (Schicklberger *et al.*, 2011). Damit dieser Schutz möglich ist, muss davon ausgegangen werden, dass MtrA und MtrB bereits im Periplasma miteinander interagieren. Wie sich MtrA nach dem Einbau von MtrB in die äußere Membran verhält ist noch nicht geklärt.

Es wäre denkbar, dass MtrA im Periplasma mit MtrB interagiert und dieses in die äußere Membran geleitet. Das anschließende Verhalten von MtrA in der äußeren Membran sollte bei diesem Versuch untersucht werden.

MtrA kann von verschiedenen *c*-Typ Cytochromen im Periplasma Elektronen erhalten und diese später wieder an die Reduktase MtrC weiterleiten. Die Konzentration an Hämgruppen durch die im Periplasma lokalisierten *c*-Typ Cytochrome ist mit 3,76 mM hoch. Man bezeichnet die Möglichkeit Elektronen im Periplasma zwischen den einzelnen Cytochromen hin und her zu schieben als ein sogenanntes Elektronen Netzwerk (Sturm *et al.*, 2015). Die Elektronenübertragung von FccA auf MtrA konnte schon nachgewiesen werden (Schuetz *et al.*, 2009), aber auch aus der inneren Membran kann MtrA über CymA Elektronen erhalten (Beliaev *et al.*, 2001). Sowohl in der äußeren Membran als auch im Periplasma kann MtrA nachgewiesen werden (Schuetz *et al.*, 2009). Es stellt sich demnach die Frage, ob MtrA von verschiedenen *c*-Typ Cytochromen reduziert wird und dafür im Periplasma in Lösung vorliegen muss, oder ob es statisch an MtrB gebunden bleibt, somit in der äußeren Membran lokalisiert ist und dort von anderen löslichen Cytochromen reduziert wird. Um Elektronen an die terminale Reduktase MtrC weiterzugeben besteht die Möglichkeit, dass das oxidierte MtrA von einem reduzierten MtrA verdrängt wird, wodurch es zu einem Austausch von MtrA in der äußeren Membran kommen würde. Eine statische Bindung zwischen MtrA und MtrB wäre bei diesem Szenario nicht möglich (Abbildung 33A).

Aufgrund der Lokalisation von DegP im Periplasma muss auch die Bindung zwischen MtrA und MtrB schon im Periplasma erfolgen, damit der Schutz von MtrB gewährleistet werden

kann. Zudem muss die Bindung stark genug sein, dass eine Interaktion zwischen MtrA und MtrB im Periplasma beibehalten wird. Eine *S. oneidensis* $\Delta stc\Delta fccA$ Mutante zeigt einen starken Phänotyp bei der Eisenreduktion (Sturm *et al.*, 2015). Die wahrscheinlichere Hypothese ist daher, dass MtrA statisch an MtrB gebunden ist und MtrB nicht mehr verlässt. Dasjenige MtrA, welches MtrB durch das Periplasma geleitet hat, würde demnach an MtrB gebunden bleiben und die Elektronen aus dem Periplasma von anderen Proteinen, wie z.B. Stc und FccA, aufnehmen (Abbildung 33B). Aufgrund der Hypothese eines Netzwerkes, welches durch *c*-Typ Cytochrome gebildet wird und für die Verteilung der Elektronen zuständig ist, wäre es für die Zelle kein Nachteil MtrA zusätzlich im Periplasma zu lokalisieren und dieses nicht mit MtrC in Kontakt zu bringen, sondern nur als lösliches Elektronenshuttle einzusetzen.

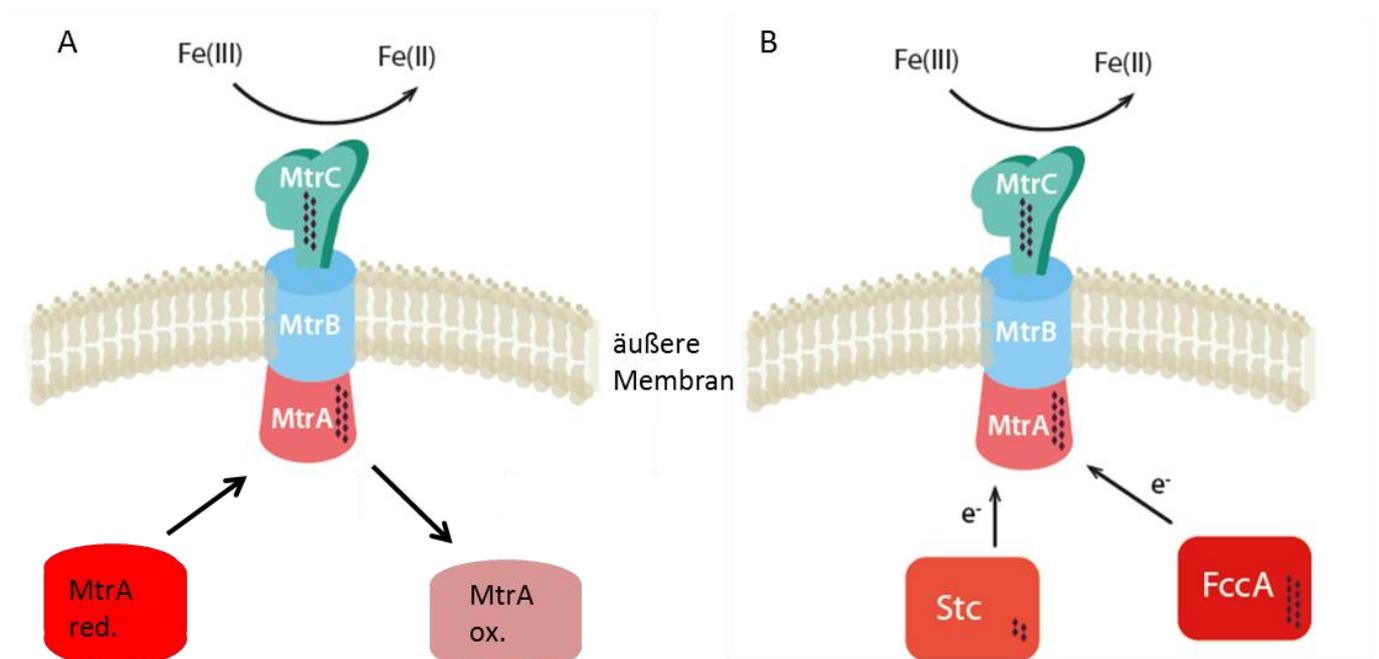


Abbildung 33: Mögliche Dynamik von MtrA bei der Bindung an MtrB in der äußeren Membran. Die Cytochrome sind mit Rauten gekennzeichnet. A) Das an MtrB gebundene MtrA wird nach der Abgabe der Elektronen an MtrC von einem neuen, reduzierten MtrA (MtrA red.) ersetzt und geht als oxidiertes MtrA (MtrA ox.) wieder im Periplasma in Lösung. B) Das MtrA bleibt stetig an MtrB in der äußeren Membran gebunden und nimmt die Elektronen zur Weitergabe an MtrC von anderen periplasmatischen Proteinen wie z. B. FccA oder Stc auf.

Der Versuch zur MtrA Dynamik (Ergebnisse 1) zeigt, dass bei *in vitro* Versuchen das MtrA_{HIS}, welches zu den Liposomen der äußeren Membran des $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* Stammes

zugegeben wurde, nicht in der Membran nachgewiesen werden kann (Abbildung 13). Es konnte also gezeigt werden, dass ein MtrA, welches in reduziertem Zustand vorliegt, das MtrA, welches im oxidierten Zustand an der Membran lokalisiert ist, nicht von einem membranständigen MtrB ablösen kann. Es wurde dadurch die Hypothese einer statischen Bindung von MtrA an MtrB verstärkt (Abbildung 33B). Das MtrA, welches MtrB durch das Periplasma geleitet hat, bleibt statisch an MtrB gebunden und erhält die Elektronen von anderen c-Typ Cytochromen aus dem Periplasma. Es muss also eine starke Bindung zwischen MtrA und MtrB im Periplasma stattfinden, welche durch einfache Diffusion nicht gelöst werden kann. Die statische Bindung von MtrA an MtrB in der Membran korreliert auch mit der Erkenntnis von Sturm *et al.*, dass eine $\Delta stc\Delta fccA$ Doppelmutante einen Phänotyp bei Wachstum mit Eisencitrat als Elektronenakzeptor aufweist (Sturm *et al.*, 2015). Falls es einen dynamischen Austausch von oxidiertem MtrA, welches in der Membran vorliegt, durch reduziertes MtrA aus dem Periplasma kommend geben würde, wäre die Eisenreduktion nicht auf Stc und FccA angewiesen, aufgrund der möglichen Elektronenübertragung von CymA auf MtrA (Beliaev *et al.*, 2001). Die $\Delta stc\Delta fccA$ Mutante sollte bei einem dynamischen Austausch keinen oder nur einen schwachen Phänotyp bei der Reduktion von Eisen aufweisen.

2 Einfluss von MtrA auf den Einbau und die Stabilität von MtrB

Die Lokalisation von MtrB und die Ähnlichkeit zu anderen β -barrel Proteinen wie FepA aus *E. coli* war schon früh bekannt (Beliaev & Saffarini, 1998). Für den Einbau und die korrekte Faltung der OMPs gibt es bei Proteobakterien einen speziellen Mechanismus für deren Transport durch das Periplasma. Um eine Aggregation im Periplasma zu verhindern sind die OMPs auf die Chaperone SurA und Skp sowie die Protease DegP angewiesen. Der Einbau der OMPs in die äußere Membran findet anschließend über den Bam-Komplex statt (Duguay & Silhavy, 2004; Ricci & Silhavy, 2012; Rigel & Silhavy, 2012; Sklar *et al.*, 2007).

Der Einfluss von MtrA auf die Elektronenübertragung durch die äußere Membran wurde schon früh nachgewiesen (Ross *et al.*, 2007). Das MtrA auch einen Einfluss auf einen Abbau von MtrB durch die Protease DegP hat wurde wesentlich später erkannt (Schicklberger *et al.*, 2011). Weitere Details zur Interaktion zwischen MtrA und MtrB sind noch nicht bekannt. Die

statische Bindung von MtrA an das membranständige MtrB lässt auf eine starke Bindung schließen, welche schon im Periplasma stattfindet (Diskussion 1). Die β -barrel Proteine werden jedoch einzeln von SurA, Skp oder DegP durch das Periplasma geleitet und korrekt gefaltet. Der Einfluss von DegP als Protease auf den Einbau von MtrB wurde schon gezeigt (Schicklberger *et al.*, 2011). Ein Einfluss von SurA und Skp als Chaperone muss hingegen noch geklärt werden.

2.1 Einfluss von SurA, Skp, DegP und MtrA auf die Stabilität von MtrB

Ein β -barrel Protein wird direkt nach Eintritt in das Periplasma als OMP erkannt, von einem Chaperon durch das Periplasma geleitet und durch den Bam-Komplex in die äußere Membran eingebaut (Silhavy *et al.*, 2010; Sklar *et al.*, 2007). Der Schutz den MtrB durch das *c*-Typ Cytochrom MtrA vor dem Abbau durch DegP bei einer Fehlfaltung von MtrB erhält, ist eine Besonderheit (Schicklberger *et al.*, 2011). Es ist bisher kein β -barrel Protein bei Gram-negativen Bakterien bekannt, welches einzeln in die Membran eingebaut wird und das ein anderes Chaperon als SurA, Skp oder in Ausnahmen auch DegP, für den Einbau in die äußere Membran benötigt. Die korrekte Faltung von β -barrel Proteinen kann auf einem SDS-Gel in vielen Fällen detektiert werden. Durch die Stabilität von OMPs ist deren Laufeigenschaft auf einer SDS-PAGE nach Denaturierung des Proteins bei 37 °C unterschiedlich bei korrekter oder fehlerhafter Faltung. Das Signal des Proteins in ungefaltetem Zustand befindet sich auf gleicher Höhe wie der komplett denaturierte Zustand bei Bearbeitung der Probe vor der SDS-PAGE bei 95 °C. Der gefaltete Zustand kann dabei veränderte Laufeigenschaften aufweisen, wie bei OmpA, das im SDS Gel unterhalb oder OmpX, das im SDS Gel oberhalb des ungefalteten Proteins zu finden ist (Burgess *et al.*, 2008; Sklar *et al.*, 2007). Bei Bildung von Trimeren und Dimeren in der Membran sind diese nach Denaturierung bei 37 °C noch zu erkennen da sie oft erst bei 95 °C aufgelöst werden. Bei MtrB kann vermutlich der korrekt gefaltete Zustand auf einer SDS-PAGE mit dem anti-MtrB Antikörper nicht detektiert werden. MtrB kann nur in ungefaltetem Zustand oder in komplett denaturiertem Zustand bei 77 kDa detektiert werden (Abbildung 21, Abbildung 22).

In

Tabelle 35 ist die Stabilität von MtrB in verschiedenen Mutanten abzulesen. In der zweiten Spalte ist mit + die Detektion von MtrB nach Denaturierung bei 95 °C aufgelistet, mit – ist die Abwesenheit von MtrB gekennzeichnet, da selbst bei kompletter Denaturierung des Proteins keine Detektion möglich ist und MtrB somit in der Zelle abgebaut wurde. In der dritten Spalte ist mit + gekennzeichnet, dass MtrB schon bei 37 °C in ungefaltetem Zustand vorliegt und damit das Epitop für den anti-MtrB Antikörper frei gibt. Das + in der dritten Spalte steht somit gleichzeitig für eine geringere Stabilität von MtrB, da dieses bei Denaturierung bei geringen Temperaturen schon in ungefaltetem Zustand vorliegt. Mit – in der dritten Spalte ist die Freigabe des Epitops für die Bindung des anti-MtrB Antikörpers nicht gegeben, was für eine korrekte Faltung und damit eine höhere Stabilität von MtrB spricht.

Tabelle 35: Auflistung der Existenz und Stabilität von MtrB in verschiedenen Deletionsmutanten. Mit + ist die mögliche Detektion gekennzeichnet und die Eigenschaft bei 37 °C das Epitop für den anti-MtrB Antikörper frei zu geben. Mit - ist die bei 95 °C die Abwesenheit von MtrB gekennzeichnet. Bei 37 °C ist mit - die Eigenschaft von MtrB gekennzeichnet das Epitop für den anti-MtrB Antikörper bei 37 °C nicht frei zu geben.

Stamm	MtrB bei 95 °C	MtrB bei 37 °C
<i>S. oneidensis</i> WT	+	-
Δ skp	+	-
Δ surA	+	-
Δ mtrA	-	-
Δ degP Δ mtrA	+	+
Δ degP Δ skp Δ mtrA	+	+
Δ degP Δ skp Δ mtrA pBADmtrA _{His}	+	-

Es zeigt sich, dass MtrB in Abwesenheit von MtrA abgebaut wird. Bei der zusätzlichen Abwesenheit von DegP ist MtrB jedoch auch ohne die Anwesenheit von MtrA detektierbar, allerdings in ungefaltetem Zustand. Es ist somit schon bei 37 °C die Freigabe des Epitops für den anti-MtrB Antikörper zugänglich, wodurch ein Signal auf dem Western-Blot detektiert werden kann. Sobald MtrA exprimiert wird, ist MtrB in stabilem Zustand vorhanden und denaturiert erst bei 95 °C. Das MtrB, welches mit MtrA zusammen in die äußere Membran gelangt ist, bildet demnach ein stabil gefaltetes Protein und verdeckt durch diese Faltung

das Epitop für den Antikörper. Aufgrund der Instabilität von MtrB bei Abwesenheit von MtrA und anwesendem Chaperon SurA, oder beiden Chaperonen SurA und Skp, konnte gezeigt werden, dass ohne MtrA auch die Chaperone nicht zu einer korrekten Faltung von MtrB beitragen. Die beiden Chaperone SurA und Skp haben keinen Einfluss auf die Faltung von MtrB sobald MtrA fehlt. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass MtrB in einer $\Delta mtrA$ Mutante als falsch gefaltet erkannt wird und durch DegP abgebaut wird. Durch die Detektion von MtrB in ungefaltetem Zustand in einer $\Delta degP \Delta mtrA$ Doppelmutante auf dem Western-Blot (Abbildung 22) wird diese Theorie noch weiter bekräftigt. Die genaue Funktion von MtrA kann in diesem Fall nicht eindeutig geklärt werden. Ob MtrA auch für die Faltung zuständig ist oder nur für die Erkennung von MtrB und die damit verbundene Faltung durch die Chaperone SurA oder Skp ist nicht geklärt.

Für ein besseres Verständnis der Funktion von MtrA wurde eine in vitro Proteinexpression durchgeführt.

2.2 Einfluss von MtrA bei einer in vitro Proteinexpression von MtrB

Bei der in vitro Proteinexpression konnte MtrB von einem DHFR Plasmid exprimiert und durch die Zugabe von gereinigtem MtrA konnte weiter die Funktion von MtrA, für den Einbau von MtrB in die Membran, untersucht werden. Durch die Reinigung der Membranfraktion ist es möglich dasjenige MtrB, welches in die Membran eingebaut wurde, von dem MtrB, welches noch in der löslichen Fraktion vorliegt, zu unterscheiden. Es ist im Western-Blot kein Unterschied zu sehen, wenn MtrB mit MtrA zusammen exprimiert oder wenn MtrB alleine exprimiert wurde (Abbildung 24). In der löslichen Fraktion ist in beiden Fällen, mit und auch ohne Zugabe von MtrA, eine Aggregation von MtrB zu erkennen. MtrA ist demnach nicht dazu in der Lage MtrB in Lösung zu halten, was jedoch zu der Aufgabe eines Chaperons bei dem Geleit eines β -barrel Proteins durch das Periplasma gehört. Wenn es sich bei MtrA um ein Chaperon für MtrB handelt, müsste es möglich sein durch die Zugabe von MtrA eine Aggregation zu verhindern. Die geringere Proteinkonzentration, die nach der Zugabe von MtrA gemessen wurde, hängt höchst wahrscheinlich mit einer RNase-Kontamination zusammen, da MtrA nicht RNase frei zu reinigen ist. Das Signal für MtrB hat in der löslichen Fraktion die gleiche Intensität wie in der Membranfraktion. Es sind demnach gleiche Mengen an MtrB in die Membran eingelagert wie sie auch in der löslichen

Fraktion vorliegen. Durch die Detektion von MtrB in der Membran ist ersichtlich, dass MtrB die Möglichkeit hat, sich ohne die Hilfe des Bam-Komplexes in die Membran zu integrieren. Im Fall von OmpT konnte gezeigt werden, dass ein OMP zwar in der Lage ist sich ohne die Hilfe des Bam-Komplex in die Membran einzubauen, jedoch ist die Kinetik der Integration des OMPs in die Membran äußerst gering. Außerdem muss das Chaperon dafür sorgen, dass keine Aggregatbildung stattfindet, da eine Integration in die Membran in aggregiertem Zustand nicht mehr möglich ist (Hagan *et al.*, 2010). Es ist demnach für ein β -barrel Protein nicht möglich sich ohne beide Komponenten, einem Chaperon und dem Bam-Komplex, in die äußere Membran einzubauen.

Aufgrund der aufwendigen Faltung und dem Einbau der Hämgruppen in das c-Typ Cytochrom MtrA, ist es nicht möglich MtrA ebenfalls *in vitro* zu exprimieren und dabei eine korrekte Faltung zu gewährleisten. Es ist daher nur möglich den Einfluss von MtrA in maturiertem Zustand zu untersuchen.

Durch die Untersuchung der Chaperone SurA und Skp, der Protease DegP und des c-Typ Cytochroms MtrA können mehrere Möglichkeiten für den Einbau von MtrB angenommen werden (Abbildung 34). Aufgrund der Tatsache, dass MtrA in den *in vitro* Expressionsversuchen keinen Einfluss auf MtrB hat und dieses auch nicht in Lösung halten kann, stellt sich die Frage in welchem Zustand MtrA vorliegen muss um eine korrekte Faltung von MtrB zu gewährleisten.

MtrA in gefaltemem Zustand: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass MtrA zwar in gefaltemem Zustand vorliegt und mit MtrB interagiert, MtrB für die korrekte Faltung und Integration in die Membran jedoch noch ein weiteres Protein benötigt (Abbildung 34A). Denkbar wäre hierfür beispielsweise SurA. Im Fall von Skp wäre ein MtrAB Komplex zu groß für das Chaperon, weil die maximale Proteingröße für Skp 89 kDa beträgt (Qu *et al.*, 2007). In beiden Einzelmutanten Δskp und $\Delta surA$ konnte MtrB jedoch in korrekt gefaltemem Zustand nachgewiesen werden (Abbildung 19, Abbildung 20). Wenn die beiden Chaperone für die Faltung von MtrB notwendig sind, muss bei einem knock out eines Proteins das andere Chaperon die Faltung übernehmen können.

MtrA in ungefaltemem Zustand: Eine weitere Möglichkeit für den Einfluss von MtrA auf MtrB wäre deren Interaktion in ungefaltemem Zustand (Abbildung 34B). Für diese Möglichkeit

spricht, dass MtrA das MtrB Protein bei den in vitro Versuchen nicht in Lösung halten konnte und MtrB Aggregate bildete. MtrA könnte in einem Zustand, in dem die Hämgruppen noch fehlen, eine Chaperon Funktion für MtrB besitzen und dessen Faltung vorantreiben. Ob die Tätigkeit eines Chaperons in diesem Fall von MtrA ausgeht oder von einem dritten Protein konnte bei diesen Versuchen nicht ermittelt werden.

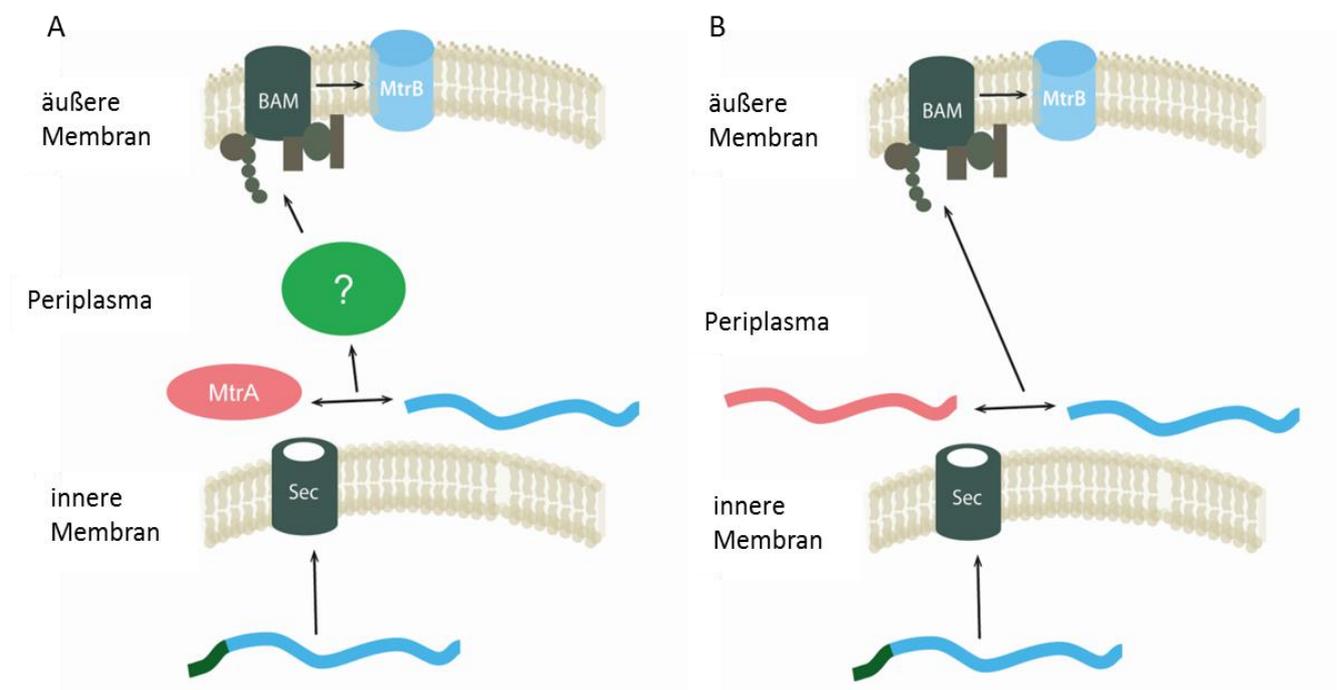


Abbildung 34: Schematische Darstellung der möglichen Funktionen von MtrA bei der Integration von MtrB in die äußere Membran. A) Interaktion von nativem MtrA mit MtrB im Periplasma und die Faltung und der Einbau von MtrB mithilfe des BAM-Komplexes durch ein weiteres Protein. B) Interaktion von ungefaltetem MtrA mit ungefalteter MtrB und korrekter Faltung und Einbau in die äußere Membran von MtrA ohne den Einfluss eines weiteren Proteins.

2.3 Untersuchung der Punktmutationen

2.3.1 Untersuchung von MtrB mit His-, strep- und V5-Tag

Durch die Untersuchung verschiedener Markierungen im Protein sollte die Verwendung des am besten geeigneten Tags definiert werden, um ihn in späteren Versuchen einzusetzen oder ohne Markierung des Proteins zu arbeiten. Zudem kann damit der Einfluss des C- oder N-Terminus auf die Funktionalität des Proteins untersucht werden. Das Einfügen von

zusätzlichen Aminosäuren in ein bestehendes Konstrukt könnte dazu führen die Tertiärstruktur eines Proteins zu verändern oder die für den Einbau des Proteins nötigen Signalsequenzen zu behindern.

Der V5-Tag am C-Terminus von MtrB verhindert das Wachstum mit Eisencitrat als Elektronenakzeptor, wohingegen der Strep-Tag keinen Effekt aufweist. Das liegt an den Sequenzen der einzelnen Markierungen. Für die Lokalisation in die äußere Membran ist eine aromatische Aminosäure notwendig, was bei den meisten OMPs ein Phenylalanin an letzter Stelle des Proteins ist (de Cock *et al.*, 1997). Bei MtrB ist ein Tyrosin an drittletzter Stelle die einzig mögliche Aminosäure für dieses Signal. Der angefügte Strep-Tag besitzt an drittletzter Stelle ein Phenylalanin, welches das Tyrosin von MtrB ersetzen und damit dessen Funktion übernehmen könnte. Bei dem V5-Tag ist hingegen keine aromatische Aminosäure vorhanden, wodurch die aromatische Aminosäure für die Lokalisation von MtrB durch den V5-Tag überdeckt wird. Der Abstand zur nächstgelegenen aromatischen Aminosäure im Fall eines C-terminalen V5-Tags beträgt 16 Aminosäuren bis zu dem MtrB eigenen Tyrosin. Dieser Abstand ist für eine Erkennung anscheinend zu groß (Abbildung 35).

V5-tag: Gly-Leu-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr

strep-tag: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

MtrB: ...Leu-Met-Leu-Ser-Mer-Ser-Tyr-Lys-Leu

Abbildung 35: Die Aminosäuresequenz des V5-Tags, des Strep-Tags und der letzten Aminosäuren von MtrB. Die aromatischen Aminosäuren sind rot umrahmt.

Da hierdurch gezeigt wird, dass der C-Terminus für eine Erkennung der Lokalisation von MtrB offen bleiben muss, ist eine mögliche Interaktion mit MtrA am C-Terminus von MtrB unwahrscheinlich.

Der His-Tag am N-Terminus scheint nicht zu stören, da die Reduktionsrate eines *S. oneidensis* Stammes, mit N-terminal Histidin markiertem MtrB Protein, der eines *S. oneidensis* WT Stammes gleicht. Da der His-Tag den N-Terminus von MtrB verlängert, ist eine Interaktion zwischen MtrB und MtrA, die direkt von den am N-Terminus von MtrB liegenden Aminosäuren ausgehen würde, auch unwahrscheinlich. Zudem ist die Orientierung des

N-Terminus von MtrB in Richtung der Zelloberfläche (Shi *et al.*, 2012) und daher wäre nur eine Interaktion mit MtrC, nicht aber mit MtrA möglich.

2.3.2 Einfluss der Punktmutationen in MtrA und MtrB auf die Eisenreduktion

Durch gerichtete Punktmutationen auf einzelne Aminosäuren, oder kleinere Bereiche im Protein, kann der Einfluss von bestimmten Regionen, oder auch nur einzelner Aminosäuren untersucht werden. Bei der Mutation von einzelnen Aminosäuren, wird die Form eines Proteins meist nicht geändert. Durch den Erhalt der Form des Proteins kann man untersuchen, ob die geänderte Aminosäure mit einem anderen Rest noch mit einem Protein interagieren kann, oder ob die Interaktion gestört wird.

Der Einfluss auf die Interaktion zwischen MtrA und MtrB wurde hier von beiden Proteinen aus untersucht. Für die Untersuchung der Interaktion von MtrA mit MtrB in nicht gefaltetem Zustand (Abbildung 34B) müsste die Interaktion vom C- oder N-Terminus von MtrA ausgehen, da eine Interaktion in der Mitte von MtrA aufgrund der Häm-Motive unwahrscheinlich ist. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Interaktion zwischen MtrA und MtrB vom C-Terminus von MtrA untersucht. Da zwischen dem letzten Häm-Motiv und dem Ende von MtrA nur 15 Aminosäuren liegen beschränkt sich die mögliche Interaktion auf nur wenige Aminosäuren. Bei MtrA wurden die letzten zwei Aminosäuren punktmuiert und sogar die letzten sieben Aminosäuren komplett entfernt. Mutationen im C-Terminus von MtrA haben jedoch keinen Einfluss auf die Eisenreduktion. Ein $\Delta mtrA$ Stamm konnte mit den pBADmtrA Q332L,R333G, pBADmtrA P325 und dem pBADmtrA P325stopp Plasmiden komplementiert werden. An der Eisenreduktionsrate mit MtrA Q332L,R333G, dem MtrA P325A und dem MtrA P325stopp ist ersichtlich, dass der C-Terminus von MtrA keinen Einfluss auf die Interaktion mit MtrB hat und somit auch nicht auf die Eisenreduktion.

Der Einfluss des Cysteins an Position 42 von MtrB wurde bereits untersucht (Wee *et al.*, 2014) die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die Eisenreduktion findet bei einem MtrB C45A, einem MtrB C42A und einem MtrB C42,45A mit der gleichen Rate wie bei einem *S. oneidensis* WT statt (Abbildung 15). Trotz der hohen Konservierung dieser beiden Cysteine weist eine Mutation keinen Phänotyp bei der Eisenreduktion auf. Aufgrund der Orientierung des N-Terminus von MtrB zum extrazellulären Raum (White *et al.*, 2013) wäre über diese beiden Cysteine nur eine

Interaktion mit MtrC möglich. Die beiden Cysteine in MtrC, welche nicht mit einer Hämgruppe verbunden sind, liegen jedoch nicht in der Nähe der Membran und somit ist keine Bildung einer Disulfidbrücke zwischen MtrB und MtrC möglich (Abbildung 5).

Ein *S. oneidensis* Stamm mit einer Mutation der Aminosäuren zwischen Position 432 und 439 zeigt einen deutlichen Effekt bei der Reduktion von Eisencitrat. Der $\Delta mtrB$ pBAD $mtrB$ PM 432-439 Stamm kann erst nach 31 h 50 mM Eisencitrat reduzieren, wohingegen der *S. oneidensis* WT nur 13 h für die komplette Reduktion benötigt (Abbildung 17). Die lange lag Phase (20 h) und anschließende Reduktionsrate, welche mit einem *S. oneidensis* WT vergleichbar ist, lässt auf ein nicht korrekt funktionierendes MtrB schließen. Es wurde jedoch gezeigt, dass MtrB korrekt in die äußere Membran eingebaut wurde (Abbildung 18). MtrB konnte nach Denaturierung bei 37 °C nicht in der Membran detektiert werden und hat somit eine Stabilität, welche mit einem wildtypischen MtrB vergleichbar ist. Zudem wurde MtrB nicht von DegP als falsch gefaltetes OMP erkannt. Diese Mutation hat somit keinen Einfluss auf die Faltung von MtrB, sondern auf die Elektronenübertragung von MtrA zu MtrC. Da *S. oneidensis* noch weitere Wege für die Eisenreduktion zur Verfügung stehen (Schicklberger *et al.*, 2013) kann aufgrund der langen lag Phase und anschließender wildtypischer Reduktion von Eisen auf eine Umgehung des Mtr-Weges geschlossen werden.

3 MtrB, ein ungewöhnliches β -barrel Protein

Ein typisches β -barrel Protein hat zwischen 8 β -Faltblättern wie z.B. OmpA (Pautsch & Schulz, 1998) und 22 β -Faltblättern wie z.B. FepA (Buchanan *et al.*, 1999). MtrB ist mit 28 β -Faltblättern (Beliaev & Saffarini, 1998) ein außergewöhnlich großes OMP, welches sich auch noch in weiteren Eigenschaften von einem typischen OMP unterscheidet. Die gewöhnliche Orientierung eines β -barrel Proteins in der Membran ist mit den großen Loops zwischen den β -Faltblättern extrazellulär und den kleineren Loops mit Orientierung ins Periplasma. Die Fass Struktur entsteht dadurch, dass das letzte β -Faltblatt mit dem ersten interagiert und somit die Fass Struktur erst ermöglicht wird. Aus dieser Struktur ergibt sich aber auch die Orientierung des N- und C-Terminus. Diese sind, aus der Struktur resultierend, beide in das Periplasma gerichtet (Fairman *et al.*, 2011; Jordanov *et al.*, 2012; Pautsch & Schulz, 1998). Bei MtrB hingegen ist die Orientierung der Loops umgekehrt, die großen,

flexiblen Loops sind nach innen gerichtet und die kleinen Loops zur Oberfläche der Zelle. Bei MtrB hat der N-Terminus eine extrazelluläre Orientierung (White *et al.*, 2013). Es ist demnach bekannt, dass MtrB kein gewöhnliches β -barrel Protein ist, sondern von der gewöhnlichen Struktur in manchen Punkten abweicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass es sich bei MtrB nicht um ein β -barrel Protein handelt, welches über den SurA- oder den Skp/DegP-Weg in die äußere Membran gelangt. Es konnte keine Abhängigkeit der Faltung von MtrB durch die Chaperone SurA und Skp gezeigt werden. Eine korrekte Faltung von MtrB ist nur bei Anwesenheit von MtrA möglich. Sobald MtrA abwesend ist wird MtrB von DegP als falsch gefaltet erkannt. Bei Fehlen von MtrA und DegP liegt MtrB in ungefalteten Zustand vor, weshalb ein Signal für MtrB im Western-Blot bei Bearbeitung der Probe bei 37 °C sichtbar wird. Durch die selbständige Integration von MtrB in die äußere Membran bei der *in vitro* Proteinexpression, kann davon ausgegangen werden, dass auch *in vivo* keine Abhängigkeit von dem Bam-Komplex besteht. Die Abhängigkeit von einem Bam-Komplex ist *in vivo* schwer zu zeigen, da eine Deletion des Bam-Komplexes letal wäre für die Zelle. Bei MtrB könnte es sich somit um eine Art von Autotransporter handeln, welcher für die Faltung nur von dem Protein abhängt, mit dem das β -barrel Protein interagiert und sich gemeinsam in die Membran einlagert. Für die Einlagerung von diesen Autotransportern in die äußere Membran ist kein Bam-Komplex notwendig. Es wurde ein Weg beschrieben, bei dem das β -barrel Protein und die sogenannte „passenger domain“ mit Hilfe des Sec-Systems unabhängig voneinander durch die innere Membran gelangen. Das TPS (**t**wo **p**artner **s**ecretion) System ist eine Form der Autotransporter oder Typ V Sekretions Systems (Henderson *et al.*, 2000; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Bei diesem System kann das β -barrel Protein und das Protein, welches anschließend im löslichen Teil vorliegt, unabhängig voneinander in das Periplasma transportiert werden. Die Interaktion der beiden Proteine findet erst im Periplasma statt. Nach der Interaktion haben die beiden Proteine eine Autochaperon Funktion, wodurch die Proteine sich ohne ein entsprechendes Chaperon gemeinsam korrekt falten und in die Membran einbauen. Für diesen Einbau in die Membran ist hierfür der Bam-Komplex nicht notwendig (Oliver *et al.*, 2003). Für die korrekte Faltung der beiden Proteine ist daher nur die Interaktion der Proteine notwendig. Der zeitliche Ablauf der Faltung der „passenger domain“ und der „transporter domain“ konnte noch nicht festgestellt werden. Bei diesem TPS System wird die „passenger domain“ durch das

Membranprotein in den extrazellulären Raum sekretiert. Dabei ist eine Bindung an das membranständige Protein oder eine Sekretion in den Überstand durch eine proteolytische Abspaltung der „passenger domain“ möglich (Henderson *et al.*, 2004). Durch den Einfluss von MtrA auf die Faltung und Integration von MtrB in die äußere Membran, in den verschiedenen *surA*, *skp* und *degP* Mutanten (Diskussion 2.1), kann eine Art TPS System für den Einbau von MtrB in die äußere Membran vermutet werden. Dafür würde auch die selbstständige Integration von MtrB in die Membran und die fehlende Abhängigkeit vom Bam-Komplex bei den Versuchen der *in vitro* Proteinexpression (Diskussion 2.2) sprechen. Im Versuch zur Dynamik von MtrA (Diskussion 1) konnte eine permanente Bindung von MtrA an MtrB gezeigt werden. Für die Bindung und Faltung von MtrB müssten MtrA und MtrB somit im Periplasma miteinander interagieren, was mit dem TPS System korrelieren würde. Der einzige Punkt, welcher nicht mit diesem Weg übereinstimmt, wäre die Orientierung von MtrA in das Periplasma. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen aber deutlich auf den Einbau von MtrB in Form des TPS Weges hin und entfernen sich von der Hypothese, dass MtrB durch den SurA- oder Skp/DegP-Weg in die äußere Membran integriert werden würde.

4 Einfluss der Punktmutationen in MtrC

Der Einfluss eines bestimmten Motivs in MtrC wurde anhand der Reduktionsrate des jeweiligen *S. oneidensis* Konstrukts untersucht. Das CGGSD Motiv direkt hinter dem Lipidanker am N-Terminus ist eine hochkonservierte Sequenz der äußeren Membrancytochrome in *Shewanella oneidensis*. Aufgrund der hohen Homologie von fünf Aminosäuren in den äußeren Lipoproteinen, welche für die Eisenreduktion zuständig sind, wurde von einer bestimmten Funktion des Motivs ausgegangen.

Lipoproteine werden häufig durch das Lol-System (lipoprotein outer membrane localization System) von der inneren in die äußere Membran transportiert (Matsuyama *et al.*, 1995; Terada *et al.*, 2001). Für die Lokalisation des Lipoproteins durch das Lol-System sind entsprechende Signale anschließend an das hoch konservierte Cystein im Lipidanker zuständig. Die Lokalisation des Lipoproteins in die innere oder äußere Membran hängt dabei von einer Asparaginsäure an Position +2 oder +3, nach dem Cystein, in Kombination mit entsprechenden Aminosäuren an der anderen Position ab (Gennity & Inouye, 1991; Seydel

et al., 1999). Aufgrund der Abhängigkeit der Lipoproteine von einer Asparaginsäure, beim Transport in die äußere Membran durch das Lol-System, wurde auch bei dem CGGSD Motiv von der Abhängigkeit durch die Asparaginsäure an Position +4 ausgegangen. Um die Möglichkeit einer Lokalisation durch die Asparaginsäure auszuschließen, wurde die Asparaginsäure an Position neun im *mtrC* Gen durch ein Alanin ersetzt. Bei dem Stamm Δ OMC pBAD*mtrC* D9G konnte jedoch kein Phänotyp erkannt werden. Die Asparaginsäure an Position +4 scheint nicht für die Lokalisation von MtrC ausschlaggebend zu sein.

Das MtrC Lipoprotein wird jedoch nicht durch das Lol-System, sondern durch das Typ-II-Sekretions System (T2SS) in die äußere Membran geleitet. Die Signale für das T2SS sind jedoch noch nicht im Detail erforscht. Ein beliebtes Protein für die Untersuchung des Transportes nach außen, durch das T2SS ist das Pula Lipoprotein aus *Klebsiella oxytoca*. Bei Pula wurden bis jetzt zwei Bereiche mit jeweils 80 Aminosäuren als Signal erkannt (Francetic & Pugsley, 2005; Pugsley *et al.*, 1991). Die CGGSD Sequenz von MtrC scheint nicht für die Sekretion durch das T2SS zuständig zu sein, da sie nur aus fünf Aminosäuren besteht. Eine Mutation der gesamten Sequenz (CGGSD \rightarrow VVGAI) zeigt jedoch einen starken Phänotyp. Die Mutation des Cysteins, welches für die Verankerung in der Membran nötig ist, sollte aber nicht alleine für den Phänotyp zuständig sein. Reduziertes, lösliches MtrF ist in der Lage durch Zugabe von Ferrihydrit *in vitro* oxidiert zu werden. Es ist auch möglich die Reduktionsrate von Eisen bei Δ OMC Zellen mit der Zugabe von MtrF bis zu 70 %, bei gleicher Zeit, wieder zu komplementieren (Clarke *et al.*, 2011). Da in der Punktmutation des ganzen Motives das Cystein, welches für die Verankerung in der Membran zuständig ist, durch ein Valin getauscht wird ist das mutierte MtrC nicht mehr in der Lage in die Membran eingebaut zu werden. Ein Fehlen des Lipidankers bei MtrC und MtrF bewirkt, dass die Proteine im Überstand nachgewiesen werden können (Richardson *et al.*, 2012). Die lange lag-Phase der Reduktionsrate von Δ OMC pBAD*mtrC* PM (Abbildung 27) und das schwache Signal der Häm-Färbung (Abbildung 28) lassen jedoch auf einen Abbau von MtrC oder eine Lokalisation im inneren der Zelle schließen. Die Reduktion von Fe(III)-Citrat müsste in diesem Fall anderweitig stattfinden. Ein alternativer Weg für die Reduktion von Fe(III) in *S. oneidensis* konnte schon gezeigt werden. In diesem Fall werden MtrAB durch SO_4359 und SO_4360 ersetzt werden (Schicklberger *et al.*, 2013). Das CGGSD Motiv, direkt an den Lipidanker anschließend, wurde daher auch in anderen Lipoproteinen in *S. oneidensis* gesucht, um dessen Einfluss genauer zu untersuchen. Es wurden sechs weitere Proteine mit einem CXD

Motiv direkt an den Lipidanker in *S. oneidensis* gefunden (Abbildung 29). Es findet sich auch in DmsA, einem Protein für die Reduktion von DMSO, ein ähnliches Motiv (CNSGSSD). DmsA ist ebenfalls in der äußeren Membran lokalisiert mit der Orientierung nach außen (Gralnick *et al.*, 2006). Die Verlängerung des Motives könnte daraus resultieren, dass DmsA nicht über das Sec-System, sondern über das Tat-System durch die innere Membran gelangt. Für die anderen Proteine UshA, SO_4018, SO_2281 und SO_4356 ist leider keine Orientierung bekannt. Das Motiv scheint jedoch nicht davon abzuhängen, ob das Lipoprotein ein c-Typ Cytochrom oder ein anderes Lipoprotein ist. Das BamE Lipoprotein ist zum Periplasma hin orientiert. Die Sequenz von BamE (CSVFD) unterscheidet sich vor allem durch das Phenylalanin, mit dem aromatischen Rest und auch durch das Valin stark von dem Motiv von MtrC (CGGSD) und ist daher nicht mit der Sequenz von MtrC zu vergleichen.

Das Motiv scheint also keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins zu haben. Durch eine ähnliche Sequenz in DmsA kann man auch einen Einfluss auf die Faltung des Lipoproteins ausschließen, da DmsA durch das Tat-System schon in gefaltetem Zustand in das Periplasma gelangt.

5 Untersuchung unterschiedlicher Lipoproteine in verschiedenen Organismen

Das CGGSD Motiv, welches bei MtrC einen Phänotyp aufweist, wurde auch noch in anderen Organismen, welche zu dissimilatorischer Eisenreduktion fähig sind, untersucht. Hierfür wurden *Shewanella* sp., *Geobacter* sp., *Desulfovibrio desulfuricans*, *Rhodoferrax ferrireducens*, *Rhodobacter capsulatus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Ferrimonas balearica*, *Anaeromyxobacter dehalogenans* und *Pelobacter carbinolicus* untersucht. Es konnte eine Vielzahl an Lipoproteinen mit einer ähnlichen Sequenz ausgemacht werden (Abbildung 30). Der Platz zwischen dem Cystein, welches in der Membran verankert ist und der Asparaginsäure wurde mit maximal fünf Aminosäuren gewählt. Überwiegend bei den *Geobacter* Spezies konnte keine Asparaginsäure, sondern eine Glutaminsäure entdeckt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Struktur dieser beiden Aminosäuren wurden diese Proteine mit einbezogen. Die Aminosäuren zwischen dem Cystein und der Asparaginsäure/Glutaminsäure bestehen meistens aus Glycin und Serin und nur in sehr seltenen Fällen sind andere Aminosäuren enthalten. Es wurden 98 Proteine mit ähnlichem

Motiv direkt nach dem Lipidanker gefunden, was ungefähr drei Proteine pro Organismus, welcher für diese Untersuchung verwendet wurde, ausmacht. Bei *S. oneidensis* wurden zwar 10 Proteine mit diesem Motiv entdeckt, aber nur von vier Proteinen ist die Funktion und die Expression bekannt. Sechs der Proteine, welche in *S. oneidensis* dieses Motiv beinhalten, werden nicht exprimiert oder sind nicht weiter mit der Funktion oder Lokalisation charakterisiert. Die durchschnittliche Anzahl dieses Motives in den Lipoproteinen von anderen Organismen ist daher mit der Anzahl exprimierter Proteine in *S. oneidensis* vergleichbar. Die einzige Gemeinsamkeit der Lipoproteine aus *S. oneidensis*, welche dieses Motiv enthalten und von welchen die Funktion und Lokalisation bekannt ist, ist die Lokalisation in der äußeren Membran und die Orientierung zur Oberfläche der Zelle. Aufgrund der Häufigkeit an Lipoproteinen, welche mit diesem CCGSD Motiv in Organismen, welche zu DIR fähig sind, gefunden wurden, lässt sich nicht ausschließen, dass die Sequenz mit der Lokalisation und Orientierung der Lipoproteine zusammenhängt.

Um zu untersuchen, ob das Motiv mit der DIR zusammenhängt oder ob es eine anderweitige Funktion beinhaltet, wurden die Lipoproteine Gram-negativer Organismen, welche nicht zu DIR fähig sind, untersucht. Es wurden 165 Lipoproteine untersucht von denen 74 ein CXD Motiv aufweisen. Von diesen 74 Lipoproteinen beinhalten jedoch nur 19 ausschließlich Glycin und Serin zwischen dem Cystein und der Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Die anderen 55 Lipoproteine mit dem CXD Motiv haben noch andere Aminosäuren dazwischen und sind daher mit BamE zu Vergleichen und nicht mit MtrC (Abbildung 31). Bei den meisten Lipoproteinen, welche nicht aus Organismen stammen, die zur dissimilatorischen Eisenreduktion fähig sind, ist kein CXD/E Motiv zu erkennen (Abbildung 32). Es scheint also ein Motiv zu sein, welches vermehrt in Organismen auftritt, welche zu DIR fähig sind. Aufgrund des seltenen Auftretens des Motives in Lipoproteinen in Organismen, welche nicht zu DIR fähig sind, scheint das Motiv hier keine Funktion zu übernehmen.

E. coli hat 90 Lipoproteine von denen vier bekannt sind an der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert zu sein. Diese sind TraT (Manning *et al.*, 1980), CsgG (Robinson *et al.*, 2006), Lpp in bestimmten Formen (Cowles *et al.*, 2011) und Wza(K30) (Drummel-Smith & Whitfield, 2000). Alle vier Lipoproteine enthalten kein vergleichbares CXD Motiv. Im Fall von MtrC hat das Motiv eine Funktion und ist in Lipoproteinen von Organismen, welche zur DIR fähig sind ebenfalls zu finden. Das Motiv findet sich aber in Organismen, welche nicht zur DIR fähig sind nicht in diesem Maße in Lipoproteinen. Das CXD Motiv scheint somit in

Proteobakterien, welche zu DIR fähig sind, eine Funktion zu haben, aber nicht für Proteobakterien im Allgemeinen. Die Funktion bei MtrC konnte leider nicht ausreichend geklärt werden.

6 Ausblick

Die Hypothese, dass es sich bei MtrA und MtrB um einen Autotransporter handelt müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Hierfür könnten nochmals Versuche mit dem in vitro Proteinexpressions Kit durchgeführt werden. Falls es sich bei MtrB wirklich um einen Autotransporter handelt, ist dessen Integration in die äußere Membran ohne den Bam-Komplex möglich. Es müsste getestet werden, ob MtrA vor der Faltung mit MtrB interagieren muss und ob MtrA auch ohne eine anschließende korrekte Faltung MtrB zu dessen korrekter Faltung verhilft. Durch die Eigenschaft von MtrA als c-Typ Cytochrom ist eine Faltung von MtrA bei der in vitro Proteinexpression nicht möglich und könnte ein weiteres Problem bei der Untersuchung des Faltungsmechanismus von MtrB darstellen. Zudem könnte mit der Zugabe verschiedener Chaperone untersucht werden, ob ein drittes Protein für die Faltung zuständig ist oder ob MtrA eine zusätzliche Funktion als Chaperon besitzt.

Der Dms-Komplex, welcher für die DMSO Reduktion zuständig ist, hat ein ähnliches Muster wie der Mtr-Komplex. Eine Untersuchung des Verhaltens des Dms-Komplexes könnte daher mit dem Mtr-Komplex verglichen werden und die Hypothese des Autotransporters untermauern.

Ein möglicher Interaktionspunkt von MtrA und MtrB sind die größeren Loops mit der Orientierung in das Periplasma. Durch gezielte Punktmutationen der Loops könnte der Bereich, welcher für die Interaktion von MtrA und MtrB zuständig ist besser untersucht werden.

Durch eine Reinigung von MtrA, ungefaltetem MtrB und dem MtrAB-Komplex könnte eine CD-Spektroskopie durchgeführt werden und damit ein besseres Verständnis des Faltungszustandes von MtrB erhalten werden. Dadurch könnte weiter auch die Fähigkeit von MtrA, als Chaperon zu dienen, festgestellt werden.

Bei MtrC müssten weitere Untersuchungen der Lokalisation ohne das CGGSD Motiv festgestellt werden. Hierfür könnte mit einem tag an MtrC gearbeitet werden. Zudem müsste durch eine Deletion der Proteinkomplexe, welche die Funktion des MtrABC-Komplexes übernehmen könnten, geklärt werden, ob der Mtr-Weg umgangen wird oder ob die Reduktion von Eisen weiterhin von MtrABC ausgeführt wird. Die Lipoproteine mit dem CXD Motiv müssten auf eine weitere Gemeinsamkeit untersucht werden, um eine mögliche Funktion des Motives, zu ermitteln.

VI. Literaturverzeichnis

Beliaev, A. S. & Saffarini, D. A. (1998). *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol* **180**, 6292-6297.

Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L. & Hunnicutt, D. (2001). MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Molecular microbiology* **39**, 722-730.

Beliaev, A. S., Klingeman, D. M., Klappenbach, J. A., Wu, L., Romine, M. F., Tiedje, J. M., Neilson, K. H., Fredrickson, J. K. & Zhou, J. (2005). Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *Journal of Bacteriology* **187**, 7138-7145.

Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. & Lovley, D. R. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295**, 483-485.

Bouhenni, R., Gehrke, A. & Saffarini, D. (2005). Identification of genes involved in cytochrome c biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4935-4937.

Bradford, M. 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.

Braunschweig, J., Bosch, J. & Meckenstock, R. U. (2013). Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. *N Biotechnol* **30**, 793-802.

Brutinel, E. D. & Gralnick, J. A. (2012). Anomalies of the anaerobic tricarboxylic acid cycle in *Shewanella oneidensis* revealed by Tn-seq. *Molecular microbiology* **86**, 273-283.

Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**, 56-63.

Bucking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S. & Gescher, J. (2010). Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS microbiology letters* **306**, 144-151.

Burgess, N. K., Dao, T. P., Stanley, A. M. & Fleming, K. G. (2008). Beta-barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane in vivo demonstrate varied folding behavior in vitro. *The Journal of biological chemistry* **283**, 26748-26758.

- Burnette, W. N. (1981).** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Burns, J. L. & DiChristina, T. J. (2009).** Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires psrA, a homolog of the phsA gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5209-5217.
- Cerny, G. & Teuber, M. (1971).** Differential release of periplasmic versus cytoplasmic enzymes from *Escherichia coli* by polymixin B. *Arch Mikrobiol* **78**, 166-179.
- Chaudhuri, S. K. & Lovley, D. R. (2003).** Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* **21**, 1229-1232.
- Chen, R. & Henning, U. (1996).** A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Molecular microbiology* **19**, 1287-1294.
- Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J. & other authors (2011).** Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9384-9389.
- Coursolle, D. & Gralnick, J. A. (2010).** Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Molecular microbiology*.
- Coursolle, D. & Gralnick, J. A. (2012).** Reconstruction of Extracellular Respiratory Pathways for Iron(III) Reduction in *Shewanella oneidensis* Strain MR-1. *Front Microbiol* **3**, 56.
- Cowles, C. E., Li, Y., Semmelhack, M. F., Cristea, I. M. & Silhavy, T. J. (2011).** The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **79**, 1168-1181.
- Dale, J. R., Wade, R., Jr. & Dichristina, T. J. (2007).** A conserved histidine in cytochrome c maturation permease CcmB of *Shewanella putrefaciens* is required for anaerobic growth below a threshold standard redox potential. *Journal of Bacteriology* **189**, 1036-1043.
- de Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T. & Tommassen, J. (1997).** Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **269**, 473-478.
- Drummelsmith, J. & Whitfield, C. (2000).** Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane. *EMBO J* **19**, 57-66.
- Duguay, A. R. & Silhavy, T. J. (2004).** Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 121-134.
- El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., Lau, W. M., Nealon, K. H. & Gorby, Y. A. (2010).** Electrical transport along bacterial nanowires from

Shewanella oneidensis MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 18127-18131.

Fairman, J. W., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. (2011). The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 523-531.

Flynn, C. M., Hunt, K. A., Gralnick, J. A. & Srienc, F. (2012). Construction and elementary mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bio Systems* **107**, 120-128.

Francetic, O. & Pugsley, A. P. (2005). Towards the identification of type II secretion signals in a nonacylated variant of pullulanase from *Klebsiella oxytoca*. *J Bacteriol* **187**, 7045-7055.

Fuchs, G., T. Eiting, J. Heider, B. Kemper, E. Kothe, B. Schink, E. Schneider & G. Uden, (2007). Allgemeine Mikrobiologie.: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Gao, H., Barua, S., Liang, Y. & other authors (2010). Impacts of *Shewanella oneidensis* c-type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microbial biotechnology* **3**, 455-466.

Gennity, J. M. & Inouye, M. (1991). The protein sequence responsible for lipoprotein membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity. *The Journal of biological chemistry* **266**, 16458-16464.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**, 343-345.

Gralnick, J. A., Vali, H., Lies, D. P. & Newman, D. K. (2006). Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4669-4674.

Gralnick, J. A. & Newman, D. K. (2007). Extracellular respiration. *Molecular microbiology* **65**, 1-11.

Hagan, C. L., Kim, S. & Kahne, D. (2010). Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* **328**, 890-892.

Henderson, I. R., Cappello, R. & Nataro, J. P. (2000). Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends in microbiology* **8**, 529-532.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.

Holmes, D. E., Bond, D. R., O'Neil, R. A., Reimers, C. E., Tender, L. R. & Lovley, D. R. (2004). Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb Ecol* **48**, 178-190.

- Hoyle, B. & Beveridge, T. J. (1983).** Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **46**, 749-752.
- Hunt, K. A., Flynn, J. M., Naranjo, B., Shikhare, I. D. & Gralnick, J. A. (2010).** Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Journal of Bacteriology* **192**, 3345-3351.
- Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halegoua, S. & Inouye, M. (1977).** Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 1004-1008.
- Iordanov, I., Renault, M., Reat, V., Bosshart, P. D., Engel, A., Saurel, O. & Milon, A. (2012).** Dynamics of *Klebsiella pneumoniae* OmpA transmembrane domain: the four extracellular loops display restricted motion behavior in micelles and in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2344-2353.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Antoine, R. (2001).** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Molecular microbiology* **40**, 306-313.
- Jones, M. E., Fennessey, C. M., DiChristina, T. J. & Taillefert, M. (2010).** *Shewanella oneidensis* MR-1 mutants selected for their inability to produce soluble organic-Fe(III) complexes are unable to respire Fe(III) as anaerobic electron acceptor. *Environmental microbiology* **12**, 938-950.
- Kim, S., Malinverni, J. C., Sliz, P., Silhavy, T. J., Harrison, S. C. & Kahne, D. (2007).** Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**, 961-964.
- Kotloski, N. J. & Gralnick, J. A. (2013).** Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio* **4**.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leisman, G. B., Waukau, J. & Forst, S. A. (1995).** Characterization and environmental regulation of outer membrane proteins in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 200-204.
- Leys, D., Tsapin, A. S., Nealson, K. H., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. & Van Beeumen, J. J. (1999).** Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Nat Struct Biol* **6**, 1113-1117.
- Lies, D. P., Hernandez, M. E., Kappler, A., Mielke, R. E., Gralnick, J. A. & Newman, D. K. (2005).** *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4414-4426.

- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W. & Rabaey, K. (2006).** Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* **40**, 5181-5192.
- Lovley, D. R. (1995).** Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J Ind Microbiol* **14**, 85-93.
- Lovley, D. R. & Coates, J. D. (1997).** Bioremediation of metal contamination. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 285-289.
- Lovley, D. R., Holmes, D. E. & Nevin, K. P. (2004).** Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. **49**, 219-286.
- Lutz, R. & Bujard, H. (1997).** Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **25**, 1203-1210.
- Maier, T. M., Myers, J. M. & Myers, C. R. (2003).** Identification of the gene encoding the sole physiological fumarate reductase in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Basic Microbiol* **43**, 312-327.
- Majzlan, J. (2013).** Minerals and aqueous species of iron and manganese as reactants and products of microbial metal respiration. In: *Microbial Metal Respiration: Heidelberg: Springer-Verlag.*
- Manning, P. A., Beutin, L. & Achtman, M. (1980).** Outer membrane of *Escherichia coli*: properties of the F sex factor traT protein which is involved in surface exclusion. *J Bacteriol* **142**, 285-294.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2008).** *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3968-3973.
- Matsuyama, S., Tajima, T. & Tokuda, H. (1995).** A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J* **14**, 3365-3372.
- McCormick, M. L., Bouwer, E. J. & Adriaens, P. (2002).** Carbon tetrachloride transformation in a model iron-reducing culture: relative kinetics of biotic and abiotic reactions. *Environ Sci Technol* **36**, 403-410.
- Meyer, T. E., Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., de Smet, L., Frishman, D., Nealson, K. H., Cusanovich, M. A. & van Beeumen, J. J. (2004).** Identification of 42 possible cytochrome C genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *OMICS* **8**, 57-77.

- Missiakas, D., Betton, J. M. & Raina, S. (1996).** New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Molecular microbiology* **21**, 871-884.
- Murphy, J. N. & Saltikov, C. W. (2007).** The *cymA* gene, encoding a tetraheme c-type cytochrome, is required for arsenate respiration in *Shewanella species*. *J Bacteriol* **189**, 2283-2290.
- Myers, C. R. & Nealson, K. H. (1988).** Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* **240**, 1319-1321.
- Myers, C. R. & Myers, J. M. (1997).** Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **179**, 1143-1152.
- Myers, C. R. & Myers, J. M. (2002a).** MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5585-5594.
- Myers, J. M. & Myers, C. R. (2002b).** Genetic complementation of an outer membrane cytochrome *omcB* mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 requires *omcB* plus downstream DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2781-2793.
- Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. & Fernandez, R. C. (2003).** A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Molecular microbiology* **47**, 1367-1383.
- Pautsch, A. & Schulz, G. E. (1998).** Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol* **5**, 1013-1017.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M. & other authors (2014).** *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12883-12888.
- Pitts, K. E., Dobbin, P. S., Reyes-Ramirez, F., Thomson, A. J., Richardson, D. J. & Seward, H. E. (2003).** Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA: expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *The Journal of biological chemistry* **278**, 27758-27765.
- Press, F. R. S. (2008).** Allgemeine Geologie.
- Pugsley, A. P., Poquet, I. & Kornacker, M. G. (1991).** Two distinct steps in pullulanase secretion by *Escherichia coli* K12. *Molecular microbiology* **5**, 865-873.
- Qu, J., Mayer, C., Behrens, S., Holst, O. & Kleinschmidt, J. H. (2007).** The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J Mol Biol* **374**, 91-105.

- Ricci, D. P. & Silhavy, T. J. (2012).** The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1067-1084.
- Richardson, D. J., Edwards, M. J., White, G. F. & other authors (2012).** Exploring the biochemistry at the extracellular redox frontier of bacterial mineral Fe(III) respiration. *Biochem Soc Trans* **40**, 493-500.
- Richter, K., Schicklberger, M. & Gescher, J. (2012).** Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**, 913-921.
- Rigel, N. W. & Silhavy, T. J. (2012).** Making a beta-barrel: assembly of outer membrane proteins in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **15**, 189-193.
- Rizzitello, A. E., Harper, J. R. & Silhavy, T. J. (2001).** Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 6794-6800.
- Robinson, L. S., Ashman, E. M., Hultgren, S. J. & Chapman, M. R. (2006).** Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Molecular microbiology* **59**, 870-881.
- Romine, M. F., Carlson, T. S., Norbeck, A. D., McCue, L. A. & Lipton, M. S. (2008).** Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3257-3265.
- Ross, D. E., Ruebush, S. S., Brantley, S. L., Hartshorne, R. S., Clarke, T. A., Richardson, D. J. & Tien, M. (2007).** Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5797-5808.
- Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2011).** Towards electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the mtr pathway for reductive metabolism. *PLoS One* **6**, e16649.
- Rouviere, P. E. & Gross, C. A. (1996).** SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* **10**, 3170-3182.
- Ruebush, S. S., Brantley, S. L. & Tien, M. (2006).** Reduction of soluble and insoluble iron forms by membrane fractions of *Shewanella oneidensis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2925-2935.
- Saltikov, C. W. & Newman, D. K. (2003).** Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10983-10988.
- Scherer, M. M., Richter, S., Valentine, R. L. & Alvarez, P. J. (2000).** Chemistry and microbiology of permeable reactive barriers for in situ groundwater clean up. *Crit Rev Microbiol* **26**, 221-264.

- Schicklberger, M., Bucking, C., Schuetz, B., Heide, H. & Gescher, J. (2011).** Involvement of the *Shewanella oneidensis* decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the beta-barrel protein MtrB. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1520-1523.
- Schicklberger, M., Sturm, G. & Gescher, J. (2013).** Genomic plasticity enables a secondary electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 1150-1159.
- Schnaitman, C. A. (1971).** Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J Bacteriol* **108**, 545-552.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A. M. & Gescher, J. (2009).** Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7789-7796.
- Schwalb, C., Chapman, S. K. & Reid, G. A. (2003).** The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry* **42**, 9491-9497.
- Seydel, A., Gounon, P. & Pugsley, A. P. (1999).** Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Molecular microbiology* **34**, 810-821.
- Shanks, R. M., Caiazza, N. C., Hinsa, S. M., Toutain, C. M. & O'Toole, G. A. (2006).** *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5027-5036.
- Shi, L., Deng, S., Marshall, M. J. & other authors (2008).** Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. *J Bacteriol* **190**, 5512-5516.
- Shi, L., Richardson, D. J., Wang, Z., Kerisit, S. N., Rosso, K. M., Zachara, J. M. & Fredrickson, J. K. (2009).** The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 220-227.
- Shi, L., Rosso, K. M., Clarke, T. A., Richardson, D. J., Zachara, J. M. & Fredrickson, J. K. (2012).** Molecular Underpinnings of Fe(III) Oxide Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol* **3**, 50.
- Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010).** The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000414.
- Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2007).** Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**, 2473-2484.
- Spath, P. J. & Koblet, H. (1979).** Properties of SDS-polyacrylamide gels highly cross-linked with N,N'-diallyltartardiamide and the rapid isolation of macromolecules from the gel matrix. *Anal Biochem* **93**, 275-285.

- Spieß, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999).** A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339-347.
- Straub, K. L., Benz, M. & Schink, B. (2001).** Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol Ecol* **34**, 181-186.
- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O. & Gescher, J. (2015).** A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *The ISME journal*.
- Styrvold, O. B. & Strom, A. R. (1984).** Dimethylsulphoxide and trimethylamine oxide respiration of *Proteus vulgaris*. Evidence for a common terminal reductase system. *Arch Microbiol* **140**, 74-78.
- Sugai, M. & Wu, H. C. (1992).** Export of the outer membrane lipoprotein is defective in secD, secE, and secF mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 2511-2516.
- Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S. I. & Tokuda, H. (2001).** Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **276**, 47690-47694.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**, 100-180.
- Thomas, P. E., 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.
- Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., Neilson, K. H. & other authors (2001).** Identification of a small tetraheme cytochrome c and a flavocytochrome c as two of the principal soluble cytochromes c in *Shewanella oneidensis* strain MR1. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3236-3244.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L. & Lovley, D. R. (1998).** Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* **395**, 65-67.
- Walton, T. A. & Sousa, M. C. (2004).** Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* **15**, 367-374.
- Wee, S. K., Burns, J. L. & DiChristina, T. J. (2014).** Identification of a molecular signature unique to metal-reducing Gammaproteobacteria. *FEMS microbiology letters* **350**, 90-99.
- White, G. F., Shi, Z., Shi, L. & other authors (2013).** Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 6346-6351.

Yang, C., Rodionov, D. A., Li, X. & other authors (2006). Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *The Journal of biological chemistry* **281**, 29872-29885.

Zehr, B. D., Savin, T. J. & Hall, R. E. (1989). A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **182**, 157-159.

Danksagung

Ein Großer Dank geht an Prof. Dr. Johannes Gescher für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit der Durchführung und die ständige Motivation.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für den Spaß während der Arbeit, den Konferenzen und den Klausurtagungen.

Insbesondere gilt mein Dank Kadda für die Unterstützung bei der Arbeit und Privat. Danke Kadda für die Läufe im Wald, die Gespräche und Motivation.

Ich danke Thea für die vielen Kekse.

Den Leuten für die vielen Mittwochabende bei Fußball, Pizza und Bier gilt ein Dank für die Ablenkung neben der Arbeit.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung in sämtlichen Lebenslagen. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Danke Luisa für den Platz an deiner Seite.

Manuskript

1 **The correct folding of the β -barrel protein MtrB from *Shewanella oneidensis***
2 **depends on the interaction with the c-type cytochrome MtrA in the periplasm.**

3

4 Simon Stephan, Lucas Marin, Johannes Gescher.

5 Department of Applied Biology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology (CS),
6 Karlsruhe, Germany;

7

8 **Abstract**

9 The facultative anaerobic bacterium *Shewanella oneidensis* can reduce insoluble electron
10 acceptors like Fe(III)-oxides. The reduction of these insoluble metal oxides necessitates the
11 activity of protein complexes that transfer respiratory electrons across the outer membrane
12 to the surface of the cells. The MtrABC complex of *S. oneidensis* consists of the periplasmic
13 c-type cytochrome MtrA, the β -barrel protein MtrB and the cell surface localized decaheme
14 c-type cytochrome MtrC which catalyzes the terminal electron transfer reaction. Usually,
15 β -barrel proteins are transported through the periplasm by aid of the two chaperons SurA
16 and Skp. Misfolded β -barrel proteins are degraded by the protease DegP. The c-type
17 cytochrome MtrA is not only important to protect MtrB against the degradation via DegP
18 also to stabilize MtrB in the outer membrane. In $\Delta degP \Delta mtrA$ and $\Delta degP \Delta mtrA \Delta skp$ cells
19 MtrB is detectable on a western-blot in unfolded state after denaturing the protein at 37°C.
20 Only if MtrA is present MtrB can form a stable β -barrel protein in the outer membrane. The
21 correct integration of MtrB into the outer membrane depends on the presence of MtrA. For
22 the integration process of MtrB into the outer membrane and to protect MtrB against the
23 degradation via DegP MtrA must bind statically on MtrB in the periplasm. This binding of
24 MtrA in the oxidized form at MtrB persists after the integration into the outer membrane
25 and cannot exchange by another reduced MtrA.

26

27

28

29 **Introduction:**

30 A number of microorganisms can respire using ferric iron as electron acceptor. This process
31 is called dissimilatory iron reduction and is of utmost importance for the global iron cycle.
32 Furthermore, the process affects or initiates several geochemical and biological reactions in
33 soil or sediments since the end product ferrous iron is involved in various abiotic redox
34 reactions and also an important trace nutrient. Moreover, the process is also of
35 biotechnological relevance since dissimilatory metal reducing microorganisms can be used in
36 microbial fuel cell or bioremediation applications (Braunschweig *et al.*, 2013; Lovley, 1995).
37 At neutral pH conditions iron forms insoluble ferric (oxy)(hydr)oxides (Straub *et al.*, 2001).
38 Hence, the respiratory electron acceptor has to be reduced on the cell surface which was the
39 evolutionary selection pressure for the formation of extended respiratory chains that span
40 the way from the cytoplasmic membrane to the surface of the outer membrane in Gram-
41 negative microorganisms (Gralnick & Newman, 2007).

42

43 The γ -proteobacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 is the best understood model organism
44 concerning the reduction of metal oxides so far (Fredrickson *et al.*, 2008; Richardson *et al.*,
45 2012). Respiratory electrons are transported to the outer membrane via a complex network
46 of c-type cytochromes. Electron transfer across the outer membrane is catalyzed by a three
47 protein complex consisting of one cytochrome each on the periplasmic (MtrA; mtr = **metal**
48 **reducing**) and cell surface (MtrC) site of the outer membrane, with a membrane-associated
49 β -barrel protein (MtrB) most likely acting as a connector between them. MtrC was also
50 shown to be the terminal reductase for a number of insoluble metals as well as electron

51 shuttling compounds such as humic acids or flavins. Interestingly, gene clusters of decaheme
52 cytochromes like MtrA followed by MtrB-like β -barrel proteins are wide spread within
53 microbial genomes and evidence was provided that these complexes might be a general
54 strategy for electron transport over the outer membrane either in outward direction (as in
55 microbial metal reducers like *S. oneidensis* or *Geobacter sulfurreducens*) or in inward
56 direction (as in metal oxidizing genera like *Gallionella* or *Siderooxydans*).

57

58 *S. oneidensis* MtrA and MtrB single deletion mutants are unable to use ferric iron as an
59 electron acceptor and also an MtrC mutant is strongly affected in the reduction of ferric iron
60 (Beliaev & Saffarini, 1998; Bucking *et al.*, 2010). Interestingly, MtrA seems to have a dual
61 function. Certainly, it is involved in electron transfer, but MtrA deletion mutants are also
62 unable to produce the β -barrel protein MtrB due to degradation via DegP in the periplasm
63 (Schicklberger *et al.*, 2011).

64

65 The integration of β -barrel proteins like MtrB in the outer membrane is well studied in *E.*
66 *coli*. Chaperones are generally necessary for the transport of these proteins to the outer
67 membrane. They attach to the unfolded polypeptides that exit the SecYEG pore and prevent
68 aggregation of the hydrophobic protein parts in the hydrophilic periplasmic environment. An
69 aggregation of the proteins would be the signal for proteolytic degradation by proteases like
70 DegP. In *Escherichia coli*, the three chaperons SurA, Skp and DegP (the latter has a dual
71 function as protease and chaperon) have been reported to be involved in the transport of
72 nascent β -barrel proteins through the periplasm (Duguay & Silhavy, 2004; Sklar *et al.*, 2007).
73 None of the three chaperons is essential, but double mutants have synthetic or even
74 synthetic lethal phenotypes (Rizzitello *et al.*, 2001). The chaperon that is involved primarily in

75 the transport of outer membrane proteins through the periplasm is SurA. This chaperon is a
76 peptidyl-prolyl cis/trans isomerase and deletion mutants show decreased outer membrane
77 density and are hypersensitive to detergents and hydrophobic antibiotics. Furthermore,
78 mutants are characterized by a reduced concentration of various beta-barrel proteins in the
79 outer membrane. Vertommen et al. proposed a model suggesting three types or groups of
80 outer membrane beta-barrel proteins in *E. coli*. Type 1 is dependent on SurA and Skp or
81 DegP can assist folding only to a very limited degree. Type 2 preferentially depends on SurA
82 for transport through the periplasm and synthesis of proteins belonging to this group is
83 strongly reduced in its absence. A large fraction of outer membrane beta-barrel proteins
84 including OmpA and OmpF is part of this group. Type 3 is independent of SurA activity. BamA
85 or TolC are examples of proteins that belong to this group (Vertommen *et al.*, 2009).

86 When chaperone bound outer membrane β -barrel proteins reach the outer membrane they
87 interact with the Bam-complex that facilitates folding and insertion of the proteins into the
88 outer membrane. Interestingly, β -barrel proteins are highly stable and they remain folded
89 even in SDS-PAGE gels if the protein samples are not treated by high temperatures (Burgess
90 *et al.*, 2008).

91

92 It is the aim of this work to dissect the function of MtrA in MtrB protection and folding in
93 greater detail. Our results suggest that MtrA has a direct or indirect function as chaperone
94 for periplasmic transport of MtrB.

95 **Material and Methods:**

96

97 **Bacterial strains and culture condition:**

98 The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. The cultures were grown
99 aerobically in lysogeny broth medium (LB). Anaerobic cultures were grown in M4 media at
100 pH 7.4 as described in Schütz *et al.* (Schuetz *et al.*, 2009). The medium was complemented
101 with 0.1 % casamino acids. Lactate (50 mM) and fumarate (100 mM) were added as electron
102 donor and electron acceptor, respectively. If necessary, kanamycin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was added
103 as selection marker. Arabinose was used in a concentration of 0.1 mM to express genes
104 cloned in a pBAD vector backbone.

105

106 **Construction of *S. oneidensis* deletion mutants and expression plasmids:**

107 The *degP*, *skp* and *surA* deletion mutants were made using the pMQ150 suicide vector as
108 described previously (Schuetz *et al.*, 2009). The pMQ150 and pBAD vectors were constructed
109 through the isothermal in vitro recombination method (Gibson *et al.*, 2009). Primers 1-4 and
110 5-8 were used for amplification of homologues regions upstream and downstream of *skp*
111 and *surA*, respectively. Overlaps of the amplified fragments were used for cloning in plasmid
112 pMQ150. The *mtrA* gene was amplified using primer 15 and 16 and subsequently cloned into
113 a pBAD plasmid. The sequence of *mtrA* was modified so that the protein contains a C-
114 terminal his-tag. The pBAD_{onestrep}*mtrA* plasmid was used from Schütz *et al.* (Schuetz *et al.*,
115 2009) and was transformed into the $\Delta mtrA$ strain. The pMQ150 $\Delta degP$ Plasmid from
116 Schicklberger *et al.* (Schicklberger *et al.*, 2011) was used for the $\Delta degP\Delta mtrA$ deletion
117 mutant.

118 The *mtrB* gene was cloned in the DHFR plasmid using primers 17 and 18. The DHFR plasmid
119 and the PCR product were cleaved with NdeI and BamHI. The fragments were ligated using
120 the T4 ligase (NEB, Ipswich UK). The cloned version of *mtrB* is devoid of a secretion signal
121 sequence and contains the c-terminal sequence for a V5 epitope.

122

123 Cell fractionation:

124 Cells were resuspended in buffer (50 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7.5) containing 2% Triton
125 X-100 to isolate the outer membrane (Hoyle & Beveridge, 1983; Myers & Myers, 2002a;
126 Schnaitman, 1971). DNase I was added and the suspension was passed through a french
127 press cell (1260 psi). The outer membrane was separated via centrifugation (208000 g, 4°C, 1
128 h) and the pellet was resuspended in buffer.

129

130 In vitro protein synthesis kit:

131 In vitro protein synthesis was achieved with the MembraneMax HN kit from Life
132 Technologies (Carlsbad, California). Plasmid DHFR*mtrB*_{V5} was used as a template. The
133 membrane fraction was purified via a HisTrap-column (GE healthcare, Freiburg, Germany).

134

135 Western blot analysis:

136 The protein concentrations were determined using Roti-Quant (Roth, Karlsruhe, Germany)
137 with bovine serum albumin fraction V as a standard. For the in vitro protein synthesis
138 experiments the whole fraction was loaded on the SDS-gel. The samples were heated to
139 either 37°C, 70°C or 95°C with 6x SDS-loading dye and afterwards separated on a SDS-PAGE
140 (Laemmli, 1970). Proteins were detected with antibodies with a specific epitope against
141 either the MtrB (White *et al.*, 2013), the V5 tag, or the his tag (AbD secretec, Kidlinkton, UK).

142 Staining of the proteins was achieved using anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled to
143 alkaline phosphatase (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany). Signals were visualized with
144 the alkaline phosphatase conjugation substrate kit from Bio-Rad (Munich, Germany).

145

146 Purification of MtrA_{His}:

147 The periplasmic fraction containing the his-tagged version of MtrA was isolated with
148 polymyxin B as described by Pitts and colleagues (Pitts *et al.*, 2003). MtrA_{His} was purified
149 using a HisTrap column and a subsequent gel filtration. After loading the column was washed
150 with a buffer at pH 7.5 containing 50 mM imidazole, 50 mM HEPES, 250 mM NaCl. The
151 protein was eluted with 500 mM imidazole in the same buffer. The second purification step
152 was conducted on a HiLoad 26/60 Superdex 200 pg column (GE healthcare, Freiburg,
153 Germany) using 50 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl as running buffer.

154

155 Reduction of MtrA_{His}:

156 Purified MtrA_{His} was reduced with sodium dithionite (DTT). The *c*-type cytochrome content
157 of the purified MtrA was quantified in order to avoid of DTT in the reaction. Quantification
158 was conducted as described previously (Sturm *et al.*, 2015). The amount of DTT added was
159 sufficient for the reduction of 90% of all heme groups in the MtrA fraction.

160

161 Detection of the dynamics of MtrA from the periplasm to the outer membrane:

162 The outer membrane of the $\Delta mtrA$ pBAD_{onestrep}*mtrA* cells was purified as described by
163 Leisman *et al.* (Leisman *et al.*, 1995). The outer membrane pellet was washed once with
164 buffer (50 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7.5) and then resuspended in the same buffer to
165 produce outer membrane liposomes. The purified MtrA_{His} was reduced with DTT and added

166 to the membrane fraction under anoxic conditions. Membrane fraction and supernatant
167 were separated at 208000 g, 4°C for 1 h after 5 and 15 minutes of incubation. The pellet
168 containing the outer membrane was then washed once with buffer. The localization of MtrA
169 was detected using a western blot.

170

171

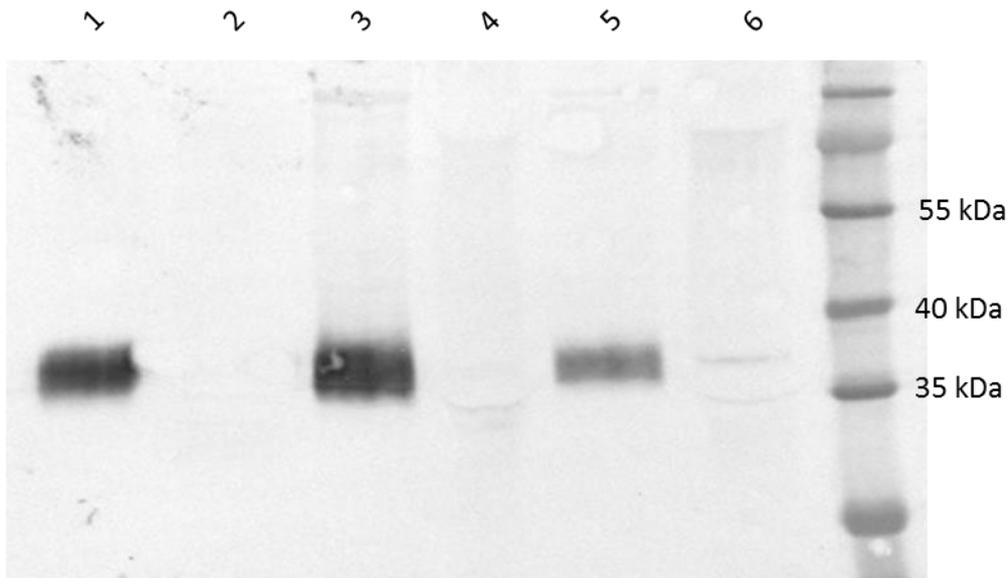
172 **Results:**

173

174 **Dynamics of MtrA from the periplasmic space to the outer membrane:**

175 The *c*-type cytochrome MtrA is localized in the periplasm but is also detectable in the
176 purified membrane fraction because of the binding of MtrA to MtrB that is localized in the
177 outer membrane (Hartshorne *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2009). While MtrC has
178 a lipid anchor for the integration into the membrane (Clarke *et al.*, 2011) MtrA has to bind
179 directly to MtrB to complete the complex. The question is whether MtrA binds covalently to
180 MtrB and therefore stays in the complex the whole time or if MtrA gets exchanged by a new
181 reduced MtrA from the periplasm after its oxidation. To address this we used the membrane
182 fraction of a $\Delta mtrA$ pBAD_{Onestrep}mtrA strain and, under anaerobic conditions, added purified
183 MtrA_{his} that is reduced with dithionite so that only the MtrA_{his} and not the membrane
184 fraction gets reduced. The membrane fraction was purified under aerobic conditions to
185 oxidize the cytochromes. After 5 and 15 minutes of incubation the membrane fraction was
186 separated from the supernatant by ultracentrifugation. The dynamic of MtrA was evaluated
187 by the detection and localization of MtrA_{His} via western blot. For the western-blot analyses
188 the whole sample was loaded on the SDS-PAGE (Fig. 1).

189



190
 191 Fig. 1: Western-blot with an anti-his antibody after separation of the membrane fraction and the soluble
 192 fraction. As positive control is purified MtrA_{His} loaded (1) as negative control is the periplasm from the Δ mtrA
 193 pBAD_{onestrep}mtrA loaded (2); 3 is the soluble fraction after 15 min incubation; 4 is the membrane fraction after
 194 15 min of incubation. 5 is the soluble fraction after 5 min; 6 is the membrane fraction after 5 min of incubation.

195

196 Influence of known chaperons and MtrA on MtrB production:

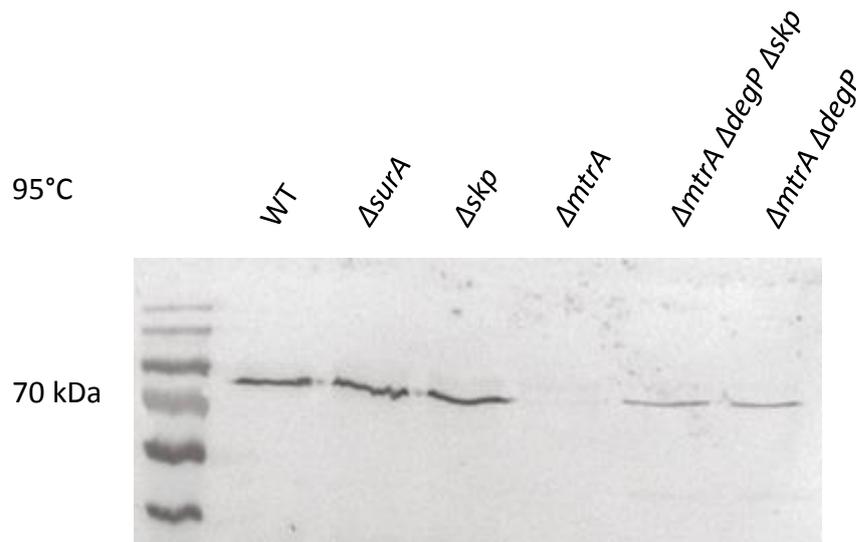
197 Usually, the three chaperons SurA, Skp and DegP are involved in the transport of unfolded β -
 198 barrel proteins through the periplasm of Gram-negative cells. Although the chaperons have
 199 overlapping functions, *E. coli surA* mutants show reduced amounts of β -barrel proteins in
 200 the outer membrane, which suggests a primary role for this specific protein. Hence, the
 201 influence of the known chaperones and the *c*-type cytochrome MtrA on the integration of
 202 the β -barrel protein MtrB was examined first.

203 *S. oneidensis* cells express the MtrABC complex under anoxic growth conditions irrespective
 204 of the presence of ferric iron (Beliaev *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2010; Sturm *et al.*, 2015).
 205 Therefore, it was possible to use fumarate as electron acceptor for mutant analysis.
 206 Membrane fractions of wild type and mutant cells were treated at 95°C prior to loading on
 207 SDS gels and subsequent MtrB detection in Western blotting experiments.

208 In agreement with previous results, MtrB is absent in membrane fractions of $\Delta mtrA$ strains
209 and is here most probably degraded by DegP since a $\Delta mtrA\Delta degP$ double deletion mutant
210 displays a less prominent but still visible MtrB signal. Signal strength is similar if the *skp* gene
211 is deleted additionally. Interestingly, there does not seem to be a decrease in the
212 concentration of MtrB in the outer membrane of either *surA* or *skp* mutants compared to
213 the wild type (Fig. 2).

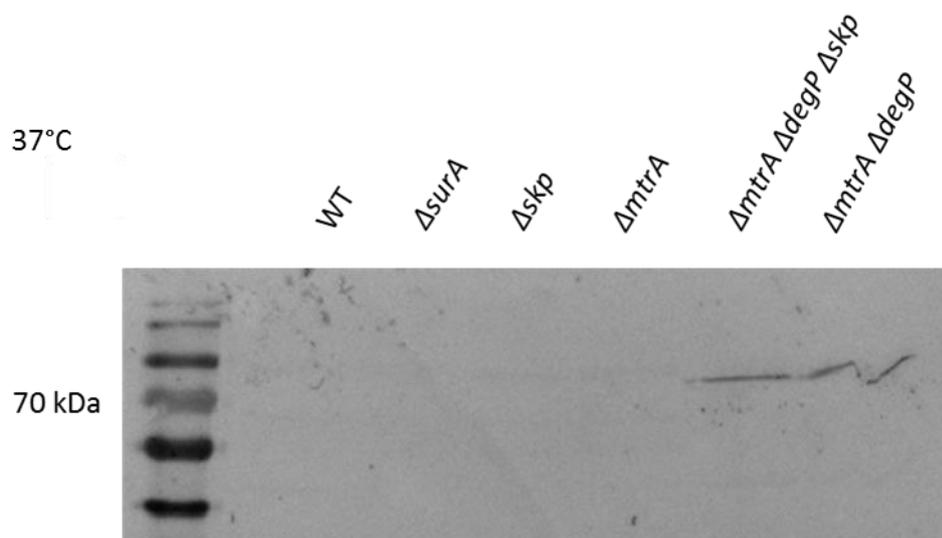
214 Next we were asking whether the fold of MtrB would be different in the single, double and
215 triple deletion mutants compared to the wild type. Previous reports showed that β -barrel
216 proteins would at least remain partly folded if only mildly treated by heat prior to loading
217 although the loading buffer and the gel contain SDS. Hence the same samples as can be seen
218 in figure 3 were treated only at 37 instead of 95°C and stained using the same procedure.
219 Surprisingly, the pattern of MtrB detection changed. We were not only unable to detect
220 MtrB in $\Delta mtrA$ strains but furthermore in the wild type and *skp* or *surA* strains. Hence, MtrB
221 was only detectable in strains with a $\Delta mtrA\Delta degP$ background irrespective of an additional
222 deletion in *skp* leading to the $\Delta skp\Delta mtrA\Delta degP$ triple mutant. Hence, it seems as if the MtrB-
223 antibody cannot access its epitope in membrane fractions of the wild type, and of *surA* or
224 *skp* mutants. In contrary, the inability to detect MtrB in $\Delta mtrA$ cells is most likely caused by
225 DegP catalyzed degradation.

226



227

228 Fig. 2: Western blotting based detection of MtrB with an anti-MtrB antibody in different
 229 chaperone mutants after denaturing the samples completely at 95°C. 25 μ g of protein were
 230 loaded per sample.



231

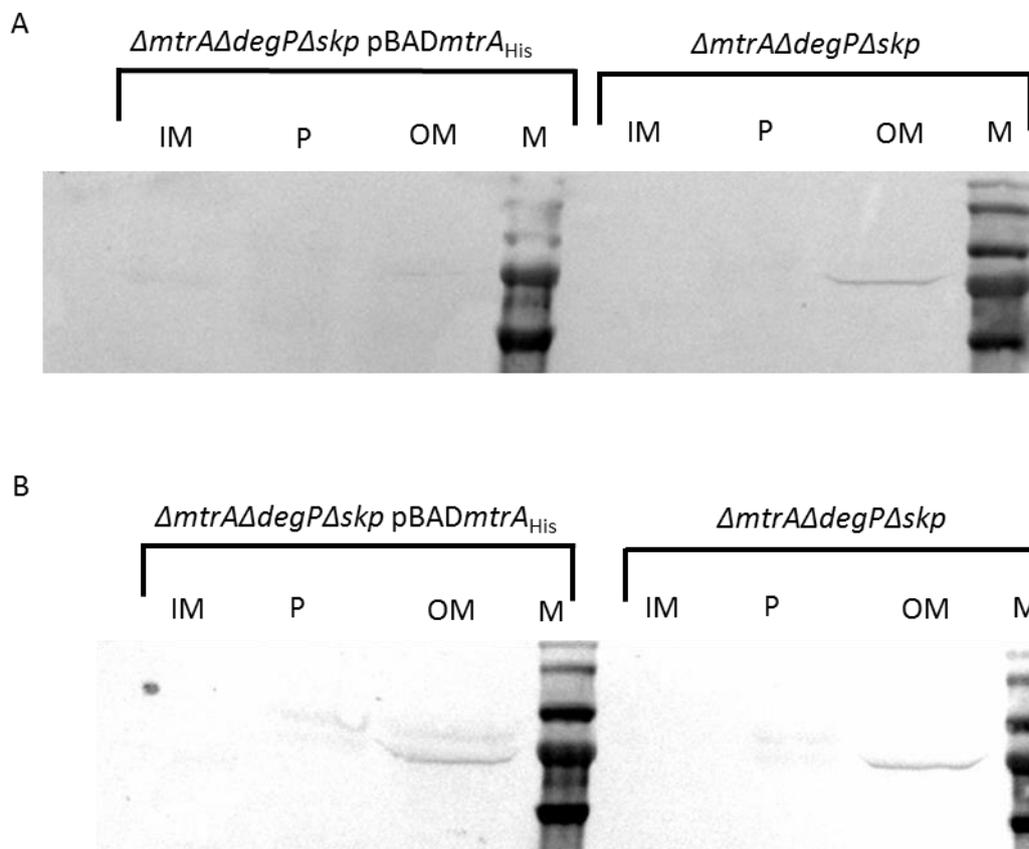
232 Fig. 3: Detection of the stability of MtrB in different chaperone mutants after denaturing the
 233 sample at 37°C, detected with an anti-MtrB antibody. 25 μ g Protein were loaded per sample.

234

235 MtrA is not involved in MtrB localization:

236 Since the previous experiments suggested a role of MtrA in folding of MtrB in the membrane
 237 it was asked whether the deletion of this c-type cytochrome would furthermore affect the

238 localization of MtrB. Hence, cells of a $\Delta mtrA\Delta degP\Delta skp$ triple mutant were fractionated into
 239 inner membrane, outer membrane and periplasm fraction. The same experiment was also
 240 conducted with an isogenetic strain that was complemented with a plasmid encoded copy of
 241 the *mtrA* gene. Prior to loading on the SDS gel, the fractions were again treated either at 95
 242 or 37°C. As depicted in figure 3 MtrA does not seem to influence the localization of MtrB.
 243 Nevertheless, the influence of MtrA on epitope availability could be reproduced even with
 244 expression of MtrA in trans (Fig. 4).
 245



246
 247 Fig. 4: Localization of MtrB in the $\Delta mtrA\Delta degP\Delta skp$ mutant with or without MtrA_{His}. Detected with an anti
 248 MtrB antibody. 25 μ g protein were loaded per sample. The protein is one time denatured at 37°C (A) and one
 249 time at 95°C (B). In both Gels from left to right Lane 1 shows the marker (M), lane 2 the outer membrane (OM),
 250 lane 3 the periplasm (P) and lane 4 the inner membrane (IM).

251

252

253 In vitro Protein syntheses:

254 The design of an MtrA construct that is N-terminally marked with an onestrep-tag facilitates
 255 the purification of the _{onestrep}MtrA protein from the periplasm. The _{onestrep}MtrA is expressed
 256 from a pBAD plasmid and purified with a strep tactin column (Qiagen, Venlo, Netherlands).
 257 To evaluate the chaperon function of MtrA we used an in vitro protein synthesis kit (Live
 258 Technologies, Carlsbad, California). This protein synthesis kit contains a membrane that is
 259 integrated in a his-tagged protein to enable purification of the membrane fraction after
 260 protein expression. For the expression of MtrB we designed a DHFR*mtrB*_{V5} plasmid in which
 261 the secretion sequence of MtrB is missing. We tested the characteristics of MtrB on a
 262 western blot with an anti-V5 antibody after boiling the different fractions at 95°C and 37°C.
 263

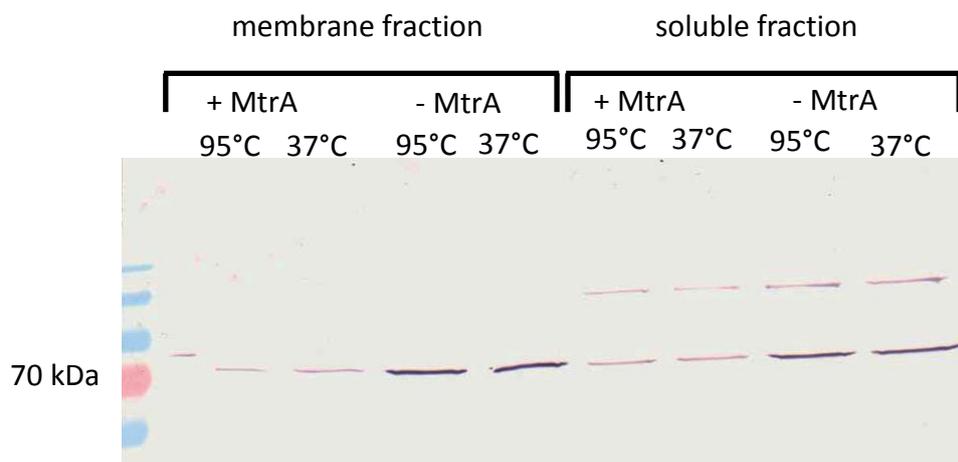


Fig. 5: Western-blot with anti-V5 antibody after in vitro protein synthesis and purification with a his tag column. MtrA is either added to the reaction (+ MtrA) or MtrB is expressed alone (- MtrA). The sample is denatured at 95°C or at 37°C.

264

265

266 In Fig. 5 we show that MtrB has the same characteristic when heated to 95°C and to 37°C
 267 respectively, either if MtrA is present or absent. The soluble fraction shows an aggregation of
 268 MtrB at 120 kDa for both cases. The membrane fraction shows that MtrB alone is still

269 integrated into the membrane. However, you can detect MtrB in the membrane at 37°C still

270 with the addition of MtrA.

271

272

273 **Discussion:**

274

275 **Binding of MtrA to MtrB at the outer membrane:**

276 MtrA is localized in the periplasm and can also be detected in the outer membrane as part of
277 the MtrABC complex. MtrA is necessary for the integration of MtrB and also for the
278 transport of electrons through the outer membrane to the final reductase MtrC. Sturm et al.
279 could show that a $\Delta fccA\Delta stc$ double mutant has a marked decrease in iron reduction rates
280 (Sturm *et al.*, 2015). This means that MtrA is not getting the electrons directly from CymA
281 that is localized in the inner membrane. The question is if in the first case MtrA is getting
282 exchanged in the MtrABC complex from a reduced MtrA out of the periplasm after the MtrA
283 in the complex is oxidized. The second case would be that only the electrons are transferred
284 to the MtrA that is localized in the complex and is bound to MtrB. Interestingly, in this
285 experiment we could show that the oxidized MtrA is not getting exchanged from a reduced
286 MtrA in the complex. If MtrA is localized in the outer membrane via binding to MtrB it is not
287 diffusing back into the periplasm. This correlated with the effect of a $\Delta fccA\Delta stc$ double
288 mutant.

289 The question is the effect of MtrA to the folding of MtrB if the connection between MtrA
290 and MtrB is in the periplasm.

291

292 **Influence of MtrA on the stability of MtrB:**

293 Schicklberger *et al.* could show that MtrA protects MtrB against the degradation via DegP
294 (Schicklberger *et al.*, 2011) what could be confirmed in this work (Fig. 2). We could further
295 show that the stability of MtrB on a SDS-PAGE is different if MtrA is present or absent. It
296 seems that MtrA has an important influence on the folding of MtrB whereby MtrB is more

297 stable with MtrA than without MtrA. In a $\Delta degP\Delta mtrA$ or a $\Delta degP\Delta mtrA\Delta skp$ mutant MtrB is
298 detectable in an unfolded stage (Fig. 3). When MtrA is present also in the $\Delta degP\Delta mtrA$ or
299 $\Delta degP\Delta mtrA\Delta skp$ mutants MtrB is detectable in the stable stage. The localization of MtrB
300 depends on itself but the stability depends on MtrA (Fig. 4). This result shows that the
301 stability of MtrB is the reason of a different characteristic on a SDS-PAGE after heating the
302 protein at 37°C and 95°C.

303 To examine if MtrA has a chaperon function for MtrB we used the in vitro protein synthesis.
304 Surprisingly the western blot analysis of the in vitro protein expression of MtrB has the same
305 characteristic if MtrA is added or not after denaturing MtrB at 95°C and at 37°C respectively.
306 Interestingly, an aggregation of MtrB in the soluble fraction could be detected also in the
307 presence or absence of MtrA. No signal after heating at 37°C should be detectable if the
308 stability of MtrB in the in vitro experiments is similar to its stability in the in vivo experiments
309 in the wild-type or the two $\Delta surA$ and Δskp single mutants. MtrA is incapable to prevent an
310 aggregation of MtrB and influences the correct folding of MtrB if MtrA is correctly folded
311 and matured by itself in in vitro experiments. The hypothesis is that MtrA interacts with
312 MtrB before MtrA is folded and matured itself.

313

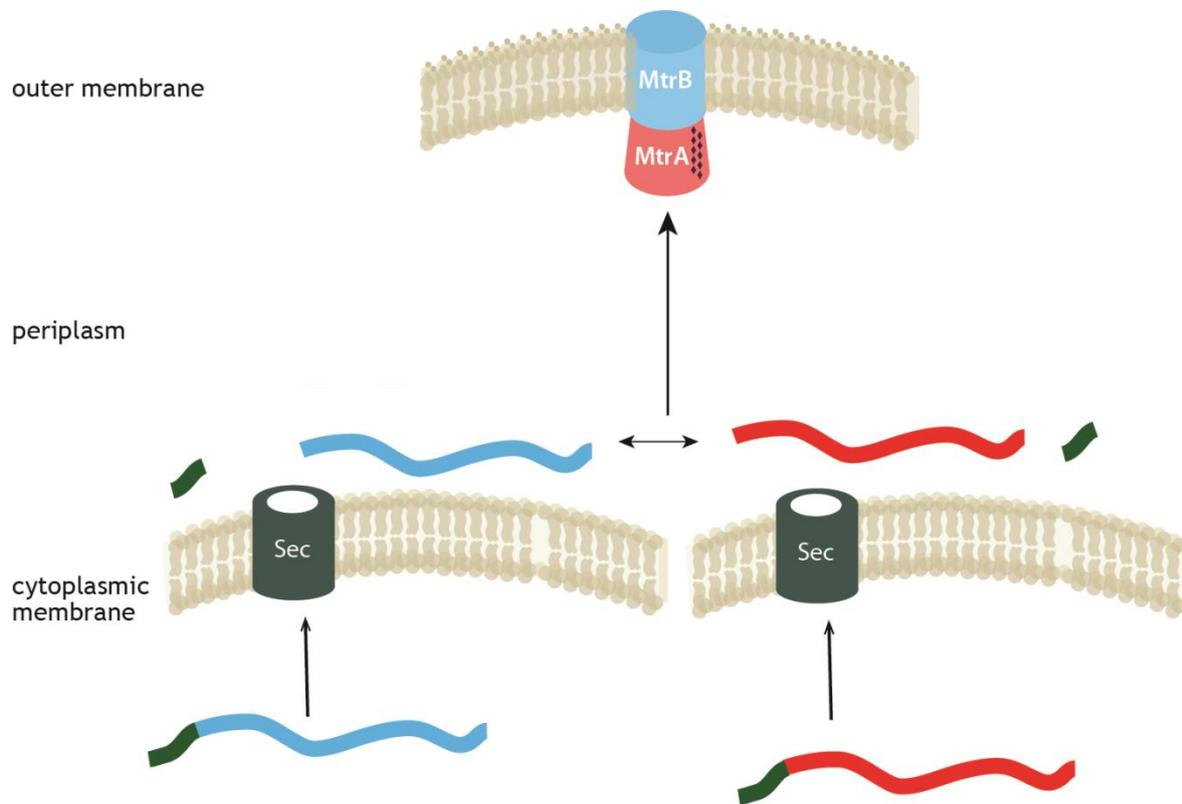
314 MtrA and MtrB form an autotransporter.

315 Our results lead to the assumption that MtrA interacts with MtrB in the periplasm in an
316 unfolded state before the complex is integrated into the outer membrane. In the absence of
317 an interaction between MtrB and MtrA in the periplasm MtrB is recognized by DegP as a
318 misfolded protein and therefore is subsequently degraded (Schicklberger *et al.*, 2011). The
319 MtrA that is connected to MtrB in the periplasm and that is necessary for the correct folding
320 of MtrB stays part of the complex still after the integration into the outer membrane that we

321 could show. The interaction of an unfolded MtrA is important for the correct folding of MtrB.
322 The maximum size of a protein for the folding via Skp is 89 kDa (Qu *et al.*, 2007). We could
323 show that MtrA form a stable complex with MtrB and that this complex must be formed in
324 the periplasm. This means that the complex is too big for Skp and SurA could be the
325 chaperone for the folding of the MtrAB-complex. But in a $\Delta surA$ mutant MtrB is folded
326 correctly. The results of this work show that Skp and SurA are not necessary for the folding
327 of MtrB. But there are more differences between MtrB and a regular β -barrel Protein. The
328 localization of the N-terminus of MtrB is to the surface of the cell. Also the short loops are
329 localized to the surface of the cell (White *et al.*, 2013). The localization of the N-Terminus
330 and the short loops in a normal β -barrel protein is both localized to the periplasm (Fairman
331 *et al.*, 2011; Iordanov *et al.*, 2012; Pautsch & Schulz, 1998). The two chaperons Skp and SurA
332 have no function for MtrB. In the in vitro protein expression it could show that no
333 Bam-complex is necessary for the integration of MtrB into the membrane. The results of this
334 work that SurA, Skp and also the Bam-complex have no influence of the folding and
335 integration of MtrB into the outer membrane in combination of the differences of MtrB to a
336 normal β -barrel protein that are known before lead to assume that MtrAB is kind of
337 autotransporter. In the case of an autotransporter with MtrB as the transporter domain and
338 MtrA as the passenger domain no Chaperon or Bam-complex is necessary for the folding of
339 MtrB (Fig. 6). The only difference between normal autotransporter and the MtrAB-complex
340 is the localization of passenger domain MtrA that is localized in regular autotransporters to
341 the surface of the cell (Henderson *et al.*, 2004) in the case of MtrA into the periplasm. The
342 c-type cytochrome MtrA would be a very interesting and a new type of a passenger domain
343 because of the costly folding mechanism of the cytochromes.

344

345



346

347 Fig. 6: Possibility for the chaperon function of MtrA for the correct folding of MtrB. MtrA and MtrB transfer
 348 independently the inner membrane via the sec system whereby the secretion sequence (green) is cut off. MtrA
 349 (red) and MtrB (blue) interact together in the periplasm in the unfolded state and transfer to the outer
 350 membrane together.

351

352

353 **References:**

354

355 **Beliaev, A. S. & Saffarini, D. A. (1998).** Shewanella putrefaciens mtrB encodes an outer
356 membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J Bacteriol* **180**, 6292-6297.

357

358 **Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L. & Hunnicutt, D. (2001).** MtrC, an outer
359 membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in Shewanella putrefaciens
360 MR-1. *Molecular microbiology* **39**, 722-730.

361

362 **Beliaev, A. S., Klingeman, D. M., Klappenbach, J. A., Wu, L., Romine, M. F., Tiedje, J. M.,
363 Neilson, K. H., Fredrickson, J. K. & Zhou, J. (2005).** Global transcriptome analysis of
364 Shewanella oneidensis MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *Journal of*
365 *Bacteriology* **187**, 7138-7145.

366

367 **Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. & Lovley, D. R. (2002).** Electrode-reducing
368 microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295**, 483-485.

369

370 **Bouhenni, R., Gehrke, A. & Saffarini, D. (2005).** Identification of genes involved in
371 cytochrome c biogenesis in Shewanella oneidensis, using a modified mariner transposon.
372 *Appl Environ Microbiol* **71**, 4935-4937.

373

374 **Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
375 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

376

377 **Braunschweig, J., Bosch, J. & Meckenstock, R. U. (2013).** Iron oxide nanoparticles in
378 geomicrobiology: from biogeochemistry to bioremediation. *N Biotechnol* **30**, 793-802.

379

380 **Brutinel, E. D. & Gralnick, J. A. (2012).** Anomalies of the anaerobic tricarboxylic acid cycle in
381 Shewanella oneidensis revealed by Tn-seq. *Molecular microbiology* **86**, 273-283.

382

383 **Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty,
384 R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (1999).** Crystal structure of the outer membrane
385 active transporter FepA from Escherichia coli. *Nat Struct Biol* **6**, 56-63.

386

387 **Bucking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S. & Gescher, J. (2010).** Involvement and specificity of
388 Shewanella oneidensis outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-
389 phase terminal electron acceptors. *FEMS microbiology letters* **306**, 144-151.

390

391 **Burgess, N. K., Dao, T. P., Stanley, A. M. & Fleming, K. G. (2008).** Beta-barrel proteins that
392 reside in the Escherichia coli outer membrane in vivo demonstrate varied folding behavior in
393 vitro. *The Journal of biological chemistry* **283**, 26748-26758.

394

- 395 **Burnette, W. N. (1981).** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from
396 sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic
397 detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
398
- 399 **Burns, J. L. & DiChristina, T. J. (2009).** Anaerobic respiration of elemental sulfur and
400 thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *phsA* gene of
401 *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5209-5217.
402
- 403 **Cerny, G. & Teuber, M. (1971).** Differential release of periplasmic versus cytoplasmic
404 enzymes from *Escherichia coli* B by polymixin B. *Arch Mikrobiol* **78**, 166-179.
405
- 406 **Chaudhuri, S. K. & Lovley, D. R. (2003).** Electricity generation by direct oxidation of glucose
407 in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* **21**, 1229-1232.
408
- 409 **Chen, R. & Henning, U. (1996).** A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively
410 binds a class of outer membrane proteins. *Molecular microbiology* **19**, 1287-1294.
411
- 412 **Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J. & other authors (2011).** Structure of a bacterial cell
413 surface decaheme electron conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
414 *United States of America* **108**, 9384-9389.
415
- 416 **Coursolle, D. & Gralnick, J. A. (2010).** Modularity of the Mtr respiratory pathway of
417 *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Molecular microbiology*.
418
- 419 **Coursolle, D. & Gralnick, J. A. (2012).** Reconstruction of Extracellular Respiratory Pathways
420 for Iron(III) Reduction in *Shewanella Oneidensis* Strain MR-1. *Front Microbiol* **3**, 56.
421
- 422 **Cowles, C. E., Li, Y., Semmelhack, M. F., Cristea, I. M. & Silhavy, T. J. (2011).** The free and
423 bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Molecular*
424 *microbiology* **79**, 1168-1181.
425
- 426 **Dale, J. R., Wade, R., Jr. & Dichristina, T. J. (2007).** A conserved histidine in cytochrome c
427 maturation permease CcmB of *Shewanella putrefaciens* is required for anaerobic growth
428 below a threshold standard redox potential. *Journal of Bacteriology* **189**, 1036-1043.
429
- 430 **de Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T. & Tommassen, J. (1997).** Role of
431 the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of
432 *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **269**, 473-478.
433
- 434 **Drummelsmith, J. & Whitfield, C. (2000).** Translocation of group 1 capsular polysaccharide
435 to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane.
436 *EMBO J* **19**, 57-66.
437
- 438 **Duguay, A. R. & Silhavy, T. J. (2004).** Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim*
439 *Biophys Acta* **1694**, 121-134.
440
- 441 **El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., Lau, W.**
442 **M., Neilson, K. H. & Gorby, Y. A. (2010).** Electrical transport along bacterial nanowires from

- 443 *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*
444 *States of America* **107**, 18127-18131.
- 445
- 446 **Fairman, J. W., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. (2011).** The structural biology of beta-barrel
447 membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 523-531.
- 448
- 449 **Flynn, C. M., Hunt, K. A., Gralnick, J. A. & Sreenc, F. (2012).** Construction and elementary
450 mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bio Systems* **107**, 120-
451 128.
- 452
- 453 **Francetic, O. & Pugsley, A. P. (2005).** Towards the identification of type II secretion signals in
454 a nonacylated variant of pullulanase from *Klebsiella oxytoca*. *J Bacteriol* **187**, 7045-7055.
- 455
- 456 **Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S. & other authors (2008).** Towards
457 environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature reviews Microbiology* **6**, 592-603.
- 458
- 459 **Fuchs, G., T. Eitinger, J. Heider, B. Kemper, E. Kothe, B. Schink, E. Schneider & G. Uden,**
460 **(2014).** Allgemeine Mikrobiologie.: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 461
- 462 **Gao, H., Barua, S., Liang, Y. & other authors (2010).** Impacts of *Shewanella oneidensis* c-
463 type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microbial biotechnology* **3**, 455-466.
- 464
- 465 **Gennity, J. M. & Inouye, M. (1991).** The protein sequence responsible for lipoprotein
466 membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity. *The Journal of*
467 *biological chemistry* **266**, 16458-16464.
- 468
- 469 **Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd & Smith, H. O.**
470 **(2009).** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature*
471 *methods* **6**, 343-345.
- 472
- 473 **Gralnick, J. A., Vali, H., Lies, D. P. & Newman, D. K. (2006).** Extracellular respiration of
474 dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proceedings of the National*
475 *Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4669-4674.
- 476
- 477 **Gralnick, J. A. & Newman, D. K. (2007).** Extracellular respiration. *Molecular microbiology* **65**,
478 1-11.
- 479
- 480 **Hagan, C. L., Kim, S. & Kahne, D. (2010).** Reconstitution of outer membrane protein
481 assembly from purified components. *Science* **328**, 890-892.
- 482
- 483 **Hartshorne, R. S., Reardon, C. L., Ross, D. & other authors (2009).** Characterization of an
484 electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proceedings of the*
485 *National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 22169-22174.
- 486
- 487 **Henderson, I. R., Cappello, R. & Nataro, J. P. (2000).** Autotransporter proteins, evolution
488 and redefining protein secretion. *Trends in microbiology* **8**, 529-532.
- 489

- 490 **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004).**
491 Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-
492 744.
- 493
494 **Holmes, D. E., Bond, D. R., O'Neil, R. A., Reimers, C. E., Tender, L. R. & Lovley, D. R. (2004).**
495 Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of
496 aquatic sediments. *Microb Ecol* **48**, 178-190.
- 497
498 **Hoyle, B. & Beveridge, T. J. (1983).** Binding of metallic ions to the outer membrane of
499 *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **46**, 749-752.
- 500
501 **Hunt, K. A., Flynn, J. M., Naranjo, B., Shikhare, I. D. & Gralnick, J. A. (2010).** Substrate-level
502 phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration
503 of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Journal of Bacteriology* **192**, 3345-3351.
- 504
505 **Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halegoua, S. & Inouye, M. (1977).** Amino acid sequence
506 for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane.
507 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 1004-
508 1008.
- 509
510 **Iordanov, I., Renault, M., Reat, V., Bosshart, P. D., Engel, A., Saurel, O. & Milon, A. (2012).**
511 Dynamics of *Klebsiella pneumoniae* OmpA transmembrane domain: the four extracellular
512 loops display restricted motion behavior in micelles and in lipid bilayers. *Biochim Biophys*
513 *Acta* **1818**, 2344-2353.
- 514
515 **Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Antoine, R. (2001).** Two-partner secretion in Gram-negative
516 bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Molecular microbiology* **40**,
517 306-313.
- 518
519 **Jones, M. E., Fennessey, C. M., DiChristina, T. J. & Taillefert, M. (2010).** *Shewanella*
520 *oneidensis* MR-1 mutants selected for their inability to produce soluble organic-Fe(III)
521 complexes are unable to respire Fe(III) as anaerobic electron acceptor. *Environmental*
522 *microbiology* **12**, 938-950.
- 523
524 **Kim, S., Malinverni, J. C., Sliz, P., Silhavy, T. J., Harrison, S. C. & Kahne, D. (2007).** Structure
525 and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine.
526 *Science* **317**, 961-964.
- 527
528 **Kotloski, N. J. & Gralnick, J. A. (2013).** Flavin electron shuttles dominate extracellular
529 electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio* **4**.
- 530
531 **Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
532 bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 533
534 **Leisman, G. B., Waukau, J. & Forst, S. A. (1995).** Characterization and environmental
535 regulation of outer membrane proteins in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl Environ*
536 *Microbiol* **61**, 200-204.
- 537

- 538 **Leys, D., Tsapin, A. S., Nealson, K. H., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. & Van Beeumen, J. J.**
539 **(1999).** Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of
540 *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Nat Struct Biol* **6**, 1113-1117.
- 541
- 542 **Lies, D. P., Hernandez, M. E., Kappler, A., Mielke, R. E., Gralnick, J. A. & Newman, D. K.**
543 **(2005).** *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a
544 distance and by direct contact under conditions relevant for Biofilms. *Appl Environ Microbiol*
545 **71**, 4414-4426.
- 546
- 547 **Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P.,**
548 **Verstraete, W. & Rabaey, K. (2006).** Microbial fuel cells: methodology and technology.
549 *Environ Sci Technol* **40**, 5181-5192.
- 550
- 551 **Lovley, D. R. (1995).** Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory
552 metal reduction. *J Ind Microbiol* **14**, 85-93.
- 553
- 554 **Lovley, D. R. & Coates, J. D. (1997).** Bioremediation of metal contamination. *Curr Opin*
555 *Biotechnol* **8**, 285-289.
- 556
- 557 **Lovley, D. R., Holmes, D. E. & Nevin, K. P. (2004).** Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction.
558 **49**, 219-286.
- 559
- 560 **Lutz, R. & Bujard, H. (1997).** Independent and tight regulation of transcriptional units in
561 *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids*
562 *Res* **25**, 1203-1210.
- 563
- 564 **Maier, T. M., Myers, J. M. & Myers, C. R. (2003).** Identification of the gene encoding the sole
565 physiological fumarate reductase in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Basic Microbiol* **43**, 312-
566 327.
- 567
- 568 **Majzlan, J. (2013).** Minerals and aqueous species of iron and manganese as reactants and
569 products of microbial metal respiration. In: *Microbial Metal Respiration: Heidelberg:*
570 Springer-Verlag.
- 571
- 572 **Manning, P. A., Beutin, L. & Achtman, M. (1980).** Outer membrane of *Escherichia coli*:
573 properties of the F sex factor traT protein which is involved in surface exclusion. *J Bacteriol*
574 **142**, 285-294.
- 575
- 576 **Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2008).**
577 *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the*
578 *National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3968-3973.
- 579
- 580 **Matsuyama, S., Tajima, T. & Tokuda, H. (1995).** A novel periplasmic carrier protein involved
581 in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer
582 membrane. *EMBO J* **14**, 3365-3372.
- 583

- 584 **McCormick, M. L., Bouwer, E. J. & Adriaens, P. (2002).** Carbon tetrachloride transformation
585 in a model iron-reducing culture: relative kinetics of biotic and abiotic reactions. *Environ Sci*
586 *Technol* **36**, 403-410.
- 587
588 **Meyer, T. E., Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., de Smet, L., Frishman, D., Nealson, K. H.,**
589 **Cusanovich, M. A. & van Beeumen, J. J. (2004).** Identification of 42 possible cytochrome C
590 genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes.
591 *OMICS* **8**, 57-77.
- 592
593 **Missiakas, D., Betton, J. M. & Raina, S. (1996).** New components of protein folding in
594 extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Molecular*
595 *microbiology* **21**, 871-884.
- 596
597 **Murphy, J. N. & Saltikov, C. W. (2007).** The *cymA* gene, encoding a tetraheme c-type
598 cytochrome, is required for arsenate respiration in *Shewanella* species. *J Bacteriol* **189**, 2283-
599 2290.
- 600
601 **Myers, C. R. & Nealson, K. H. (1988).** Bacterial manganese reduction and growth with
602 manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* **240**, 1319-1321.
- 603
604 **Myers, C. R. & Myers, J. M. (1997).** Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a
605 tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by
606 *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **179**, 1143-1152.
- 607
608 **Myers, C. R. & Myers, J. M. (2002a).** MtrB is required for proper incorporation of the
609 cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1.
610 *Appl Environ Microbiol* **68**, 5585-5594.
- 611
612 **Myers, J. M. & Myers, C. R. (2002b).** Genetic complementation of an outer membrane
613 cytochrome *omcB* mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 requires *omcB* plus downstream
614 DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2781-2793.
- 615
616 **Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. & Fernandez, R. C. (2003).** A conserved
617 region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its
618 passenger domain. *Molecular microbiology* **47**, 1367-1383.
- 619
620 **Pautsch, A. & Schulz, G. E. (1998).** Structure of the outer membrane protein A
621 transmembrane domain. *Nat Struct Biol* **5**, 1013-1017.
- 622
623 **Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M. & other authors (2014).** *Shewanella oneidensis*
624 MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular
625 electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
626 *United States of America* **111**, 12883-12888.
- 627
628 **Pitts, K. E., Dobbin, P. S., Reyes-Ramirez, F., Thomson, A. J., Richardson, D. J. & Seward, H.**
629 **E. (2003).** Characterization of the *Shewanella oneidensis* MR-1 decaheme cytochrome MtrA:
630 expression in *Escherichia coli* confers the ability to reduce soluble Fe(III) chelates. *The*
631 *Journal of biological chemistry* **278**, 27758-27765.

- 632
633 **Press, F. R. S. (2008).** Allgemeine Geologie.
634
- 635 **Pugsley, A. P., Poquet, I. & Kornacker, M. G. (1991).** Two distinct steps in pullulanase
636 secretion by *Escherichia coli* K12. *Molecular microbiology* **5**, 865-873.
637
- 638 **Qu, J., Mayer, C., Behrens, S., Holst, O. & Kleinschmidt, J. H. (2007).** The trimeric
639 periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane
640 proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J Mol Biol* **374**, 91-105.
641
- 642 **Ricci, D. P. & Silhavy, T. J. (2012).** The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim Biophys*
643 *Acta* **1818**, 1067-1084.
644
- 645 **Richardson, D. J., Edwards, M. J., White, G. F. & other authors (2012).** Exploring the
646 biochemistry at the extracellular redox frontier of bacterial mineral Fe(III) respiration.
647 *Biochem Soc Trans* **40**, 493-500.
648
- 649 **Richter, K., Schicklberger, M. & Gescher, J. (2012).** Dissimilatory reduction of extracellular
650 electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**, 913-921.
651
- 652 **Rigel, N. W. & Silhavy, T. J. (2012).** Making a beta-barrel: assembly of outer membrane
653 proteins in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **15**, 189-193.
654
- 655 **Rizzitello, A. E., Harper, J. R. & Silhavy, T. J. (2001).** Genetic evidence for parallel pathways
656 of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 6794-6800.
657
- 658 **Robinson, L. S., Ashman, E. M., Hultgren, S. J. & Chapman, M. R. (2006).** Secretion of curli
659 fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Molecular*
660 *microbiology* **59**, 870-881.
661
- 662 **Romine, M. F., Carlson, T. S., Norbeck, A. D., McCue, L. A. & Lipton, M. S. (2008).**
663 Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1
664 genome. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3257-3265.
665
- 666 **Ross, D. E., Ruebush, S. S., Brantley, S. L., Hartshorne, R. S., Clarke, T. A., Richardson, D. J.**
667 **& Tien, M. (2007).** Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction
668 by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5797-5808.
669
- 670 **Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2011).** Towards
671 electrosynthesis in shewanella: energetics of reversing the mtr pathway for reductive
672 metabolism. *PLoS One* **6**, e16649.
673
- 674 **Rouviere, P. E. & Gross, C. A. (1996).** SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl
675 isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* **10**,
676 3170-3182.
677

- 678 **Ruebush, S. S., Brantley, S. L. & Tien, M. (2006).** Reduction of soluble and insoluble iron
679 forms by membrane fractions of *Shewanella oneidensis* grown under aerobic and anaerobic
680 conditions. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2925-2935.
- 681
- 682 **Saltikov, C. W. & Newman, D. K. (2003).** Genetic identification of a respiratory arsenate
683 reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
684 **100**, 10983-10988.
- 685
- 686 **Scherer, M. M., Richter, S., Valentine, R. L. & Alvarez, P. J. (2000).** Chemistry and
687 microbiology of permeable reactive barriers for in situ groundwater clean up. *Crit Rev*
688 *Microbiol* **26**, 221-264.
- 689
- 690 **Schicklberger, M., Bucking, C., Schuetz, B., Heide, H. & Gescher, J. (2011).** Involvement of
691 the *Shewanella oneidensis* decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the
692 beta-barrel protein MtrB. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1520-1523.
- 693
- 694 **Schicklberger, M., Sturm, G. & Gescher, J. (2013).** Genomic plasticity enables a secondary
695 electron transport pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 1150-1159.
- 696
- 697 **Schnaitman, C. A. (1971).** Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by
698 Triton X-100. *J Bacteriol* **108**, 545-552.
- 699
- 700 **Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A. M. & Gescher, J. (2009).**
701 Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella*
702 *oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7789-7796.
- 703
- 704 **Schwalb, C., Chapman, S. K. & Reid, G. A. (2003).** The tetraheme cytochrome CymA is
705 required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella*
706 *oneidensis*. *Biochemistry* **42**, 9491-9497.
- 707
- 708 **Seydel, A., Gounon, P. & Pugsley, A. P. (1999).** Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in
709 the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Molecular microbiology* **34**,
710 810-821.
- 711
- 712 **Shanks, R. M., Caiazza, N. C., Hinsa, S. M., Toutain, C. M. & O'Toole, G. A. (2006).**
713 *Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-
714 negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5027-5036.
- 715
- 716 **Shi, L., Deng, S., Marshall, M. J. & other authors (2008).** Direct involvement of type II
717 secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane
718 cytochromes MtrC and OmcA. *J Bacteriol* **190**, 5512-5516.
- 719
- 720 **Shi, L., Richardson, D. J., Wang, Z., Kerisit, S. N., Rosso, K. M., Zachara, J. M. & Fredrickson,
721 J. K. (2009).** The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in
722 extracellular electron transfer. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 220-227.
- 723

- 724 **Shi, L., Rosso, K. M., Clarke, T. A., Richardson, D. J., Zachara, J. M. & Fredrickson, J. K.**
725 **(2012).** Molecular Underpinnings of Fe(III) Oxide Reduction by *Shewanella Oneidensis* MR-1.
726 *Front Microbiol* **3**, 50.
- 727
- 728 **Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010).** The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb*
729 *Perspect Biol* **2**, a000414.
- 730
- 731 **Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2007).** Defining the roles of the periplasmic
732 chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**, 2473-2484.
- 733
- 734 **Spath, P. J. & Koblet, H. (1979).** Properties of SDS-polyacrylamide gels highly cross-linked
735 with N,N'-diallyltartardiamide and the rapid isolation of macromolecules from the gel matrix.
736 *Anal Biochem* **93**, 275-285.
- 737
- 738 **Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999).** A temperature-dependent switch from chaperone
739 to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339-347.
- 740
- 741 **Straub, K. L., Benz, M. & Schink, B. (2001).** Iron metabolism in anoxic environments at near
742 neutral pH. *FEMS Microbiol Ecol* **34**, 181-186.
- 743
- 744 **Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O. & Gescher, J. (2015).** A dynamic
745 periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a
746 thermodynamic regulatory regime. *The ISME journal*.
- 747
- 748 **Styvold, O. B. & Strom, A. R. (1984).** Dimethylsulphoxide and trimethylamine oxide
749 respiration of *Proteus vulgaris*. Evidence for a common terminal reductase system. *Arch*
750 *Microbiol* **140**, 74-78.
- 751
- 752 **Sugai, M. & Wu, H. C. (1992).** Export of the outer membrane lipoprotein is defective in secD,
753 secE, and secF mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 2511-2516.
- 754
- 755 **Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S. I. & Tokuda, H. (2001).** Lipoprotein sorting signals
756 evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of
757 *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **276**, 47690-47694.
- 758
- 759 **Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic
760 anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**, 100-180.
- 761
- 762 **Thomas, P. E., Ryan, D. & Levin, W. (1976).** An improved staining procedure for the
763 detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate
764 polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **75**, 168-176.
- 765
- 766 **Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., Nealson, K. H. & other authors (2001).** Identification of a
767 small tetraheme cytochrome c and a flavocytochrome c as two of the principal soluble
768 cytochromes c in *Shewanella oneidensis* strain MR1. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3236-3244.
- 769
- 770 **Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L. & Lovley, D. R. (1998).** Microbiological evidence
771 for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* **395**, 65-67.

772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794

Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T. J. & Collet, J. F. (2009). Characterization of the role of the Escherichia coli periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics* **9**, 2432-2443.

Walton, T. A. & Sousa, M. C. (2004). Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* **15**, 367-374.

Wee, S. K., Burns, J. L. & DiChristina, T. J. (2014). Identification of a molecular signature unique to metal-reducing Gammaproteobacteria. *FEMS microbiology letters* **350**, 90-99.

White, G. F., Shi, Z., Shi, L. & other authors (2013). Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 6346-6351.

Yang, C., Rodionov, D. A., Li, X. & other authors (2006). Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *The Journal of biological chemistry* **281**, 29872-29885.

Zehr, B. D., Savin, T. J. & Hall, R. E. (1989). A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **182**, 157-159.

795

796 Table 1: Bacterial strains used in this study

No.	Strain	Reference
1	<i>S. oneidensis</i> MR-1 wild-type strain	(Myers & Neilson, 1988)
2	<i>S. oneidensis</i> $\Delta surA$	this work
3	<i>S. oneidensis</i> Δskp	this work
4	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA \Delta degP$	this work
5	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$	this work
6	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA \Delta degP \Delta skp$ pBAD $mtrA_{His}$	this work
7	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$	(Schuetz <i>et al.</i> , 2009)
8	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$ pBAD $_{onestrep} mtrA$	this work
9	<i>S. oneidensis</i> $\Delta mtrA$ pBAD $mtrA_{His}$	this work
10	<i>E. coli</i> DH5 α Z1 DHFR $mtrB_{V5}$	this work

797

798 Table 2: Primers used in this work.

799

1	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG_ATGGGTTGTTACCAGTGCTA
2	TGACCTTAGAACGTGCCAAGGATTTGTGG_GCTAAATTGACCACTAAACG
3	CCACAAAATCCTTGGCACGT
4	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG_GGTACTATGACCTTAATGAG
5	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG_AGTGAACATTATGATACAGG
6	GAATATAACAAAGGTAACAAGGAGTCTATT_AGCCTTAAGCAAAGGCAAG
7	AATAGACTCCTTGTTACCTT

8	ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG_TCCGTGGTAGTGAACCGT
9	ACAGACATAAATCTTAGGTGA
10	AGTTCAGCTACCGTTATGTA
11	GACTCTATCACCAATACGC
12	AACGGTTATGGTCAATATAA
13	CTGGCGAAAGGGGGATGTG
14	CATTAGGCACCCAGGCTTTAC
15	TTTGGGCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGAAGAAGTGCCT AAAAATG
16	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTAGTGATGGTGATG GTGATGGCGCTGTAATAGCTTGCCAG
17	GGGAATTCCATATGGCTGATGGTTATGGTCTAGC
18	CCGGGATCCTTATTACGTAGAATCGAGAC

800

801