
Charakterisierung des β -Fass-Proteins MtrB

Characterization of the β -barrel protein MtrB

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

Lucas Marin

Dekan: Professor Dr. Manfred Wilhelm
Referent: Professor Dr. Johannes Gescher
Koreferent: Professor Dr. Ann-Kristin Kaster
Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2020

Zusammenfassung

Shewanella oneidensis MR-1 als exoelektrogener Mikroorganismus aus der Gruppe der γ -Proteobakterien bildet zusammen mit der *Geobacter* Spezies die Basis der Modellorganismen zur Erforschung von extrazellulärem Elektronentransport (EET). Zum EET befähigte Organismen sind in der Lage, die respiratorischen Elektronen über die Zelloberfläche auf unlösliche Elektronenakzeptoren zu übertragen. Dabei werden die Elektronen durch die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran mit Hilfe verschiedener Proteinkomplexe transportiert. Diese Elektronen können über Elektroden in einen Stromkreis eingespeist werden. In dieser Arbeit sollte die Funktion der an diesem Transport beteiligten Proteine von *S. oneidensis* näher charakterisiert werden. Als größte Herausforderung stellte sich dabei der Mechanismus der Integration von MtrB heraus. MtrB als β -Fass-Protein in der äußeren Zellmembran fungiert als Interaktionskanal für das periplasmatische Cytochrom MtrA und die terminale Reduktase MtrC. Der detaillierte Maturationsprozess, der zur Faltung und Insertion von MtrB in die Membran führt, ist bisher nicht verstanden. Durch die Herstellung und Untersuchung verschiedener Deletionsmutanten in *S. oneidensis* sollten Schlüsselproteine für den Einbau identifiziert werden. Zusätzlich sollte die heterologe Expression von verschiedenen Proteinen in *E. coli* Aufschluss über die Wirkungsweise und die Integration von MtrB in diesem Organismus liefern. Mit diesem Ansatz sollte schlussendlich ein zum EET befähigter *E. coli* Stamm generiert werden, um diesen weiter für bioelektrische Systeme nutzen zu können. Die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse deuten auf eine Beteiligung der Chaperone Skp und DegP bei der Faltung von MtrB in *E. coli* K12. Ebenfalls konnte die Funktion der Protease DegQ näher verstanden und Indizien aufgedeckt werden, die auf die Rolle einer weiteren Protease mit vergleichbarer Funktion hindeuten. Des Weiteren wurde ein konserviertes Motiv in MtrB und seinen homologen Proteinen gefunden, welches auf die Bildung einer Disulfidbrücke hindeutet. Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Interaktionsstelle mit dem Cytochrom MtrA hin und könnten die Fehlfaltung von MtrB in *E. coli* sowie in einer *S. oneidensis mtrA*-Deletionsmutante erklären. Auf Grundlage dieser

Erkenntnisse konnte ein aktuelles Modell der Integration in beiden Organismen erarbeitet werden.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die folgende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Teile, die wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KITs beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt. Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2016 bis Juni 2020 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Ort, Datum

Unterschrift

Abkürzungen und Fachbegriffe

| | |
|----------------------|--|
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AHT | Anhydrotetrazyklin |
| DAP | 2,6-Diaminopimelinsäure |
| DIR | dissimilatorische Eisenreduktion |
| DMR | dissimilatorische Metallreduktion |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EET | extrazellulärer Elektronentransport |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| MFC | mikrobielle Brennstoffzelle, engl. microbial fuel cell |
| MQ-Pool | Menaquinonpool |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| OM | äußere Membran, engl. outer membrane |
| OMC | äußeres Membrancytochrom, engl. outer membrane cytochromes |
| OMP | äußeres Membranprotein, engl.: outer membrane protein |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| <i>S. oneidensis</i> | <i>Shewanella oneidensis MR-1</i> |
| TEA | terminaler Elektronenakzeptor |
| T2SS | Typ-2-Sekretions System |
| TMAO | Trimethylaminoxid |
| WT | Wildtyp |
| % (v/v) | Volumenprozent pro Volumen |
| % (w/v) | Gewichtsprozent pro Volumen |
| Δ | Deletion |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1. | <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 | 3 |
| 1.1.1. | Verlängerte Elektronentransportkette..... | 7 |
| 1.1.2. | Der MtrABC-Komplex..... | 10 |
| 1.2. | MtrB - ein atypisches β -Fass-Protein..... | 17 |
| 1.3. | Einbau von äußeren Membranproteinen in Gram-negativen Bakterien..... | 19 |
| 1.3.1. | Translokation durch die innere Membran..... | 19 |
| 1.3.2. | Transport durch das Periplasma und Integration in die äußere Membran..... | 21 |
| 1.4. | Zielsetzung | 31 |
| 2 | Material und Methoden..... | 32 |
| 2.1. | Chemikalien und Enzyme..... | 32 |
| 2.2. | Verwendete Stämme..... | 32 |
| 2.3. | Plasmide..... | 36 |
| 2.4. | Sterilisation..... | 37 |
| 2.5. | Kultivierung und Anzucht der Stämme | 37 |
| 2.6. | Stammkonservierung | 39 |
| 2.7. | Fe ²⁺ Konzentrationsbestimmung | 40 |
| 2.8. | Molekularbiologische Methoden | 41 |
| 2.8.1 | Isolierung von Plasmiden..... | 41 |
| 2.8.2. | Primer | 41 |
| 2.8.3. | Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) | 43 |
| 2.8.4. | Agarose-Gelelektrophorese | 44 |
| 2.8.5. | DNA Kozenzentrationsbestimmung..... | 45 |

| | |
|---|----|
| 2.8.6. Isothermale <i>in vitro</i> Ligation | 45 |
| 2.8.7. Herstellung von elektrisch kompetenten Zellen | 47 |
| 2.8.8. Transformation der elektrisch kompetenten Zellen | 47 |
| 2.8.9. Sequenzierung..... | 48 |
| 2.8.10. Konjugation mit <i>E. coli</i> WM 3064 | 48 |
| 2.9. Protein-biochemische Methoden | 51 |
| 2.9.1. Fraktionierung der Zelle in ihre einzelnen Bestandteile | 51 |
| 2.9.2. Proteinbestimmung..... | 52 |
| 2.9.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 52 |
| 2.9.4. Häm-Färbung..... | 55 |
| 2.9.5. Western-Blot | 56 |
| 2.9.6. Immunodetektion | 57 |
| 3 Ergebnisse..... | 59 |
| 3.1. Integrationsmechanismen von MtrB in <i>S. oneidensis</i> und <i>E. coli</i> in Abhängigkeit von MtrA und maskierter C-terminalen Sequenz | 59 |
| 3.1.1. Einbau von MtrB und MtrB _{strep} in <i>S. oneidensis</i> und <i>E. coli</i> unter der Kontrolle von DegQ/P | 60 |
| 3.1.2. Faltung von MtrB in Abhängigkeit von MtrA..... | 63 |
| 3.2. Untersuchung der Chaparone und Proteasen des BAM-Komplexes in <i>S. oneidensis</i> für die Integration von MtrB..... | 66 |
| 3.2.1. Untersuchung eines Faltungsdefiziets in Deletionsmutanten des BAM-Komplexes von <i>S. oneidensis</i> und <i>E. coli</i> | 66 |
| 3.2.2. Untersuchung der Funktionalität von MtrB in den verschiedenen Deletionsmutanten von <i>S. oneidensis</i> | 69 |
| 3.3. Entwicklung eines <i>E. coli</i> Stammes zur Kontrolle der Integration von MtrB über die periplasmatischen Proteasen von <i>S. oneidensis</i> | 74 |
| 3.3.1. Versuchsaufbau..... | 75 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2. Überprüfung der Kontrollfunktion der Proteasen aus <i>S. oneidensis</i> | 75 |
| 3.4. Koexpression von <i>S. oneidensis</i> Chaperonen in <i>E. coli</i> als Faltungshilfe von MtrB..... | 81 |
| 3.4.1. Versuchsaufbau..... | 81 |
| 3.4.2. Überprüfung der Integration und Faltung von MtrB in <i>E. coli</i> durch Chaperone von <i>S. oneidensis</i> | 82 |
| 3.5. Untersuchung des Faltungsdefizits von MtrB in <i>E. coli</i> und <i>S. oneidensis</i> | 84 |
| 3.5.1. Versuchsaufbau..... | 85 |
| 3.5.2. Disulfidbrücken Ausbildung von MtrB in <i>E. coli</i> | 86 |
| 4 Diskussion | 89 |
| 4.1. Korrektur des alten Modells der Integration von MtrB in die äußere Membran | 89 |
| 4.1.1. Funktionale Einordnung der Proteasen DegQ und DegP bei der Integration von MtrB und MtrB _{strep} | 92 |
| 4.1.2. Unbekannte Protease | 96 |
| 4.2. Integration von MtrB in <i>E. coli</i> | 100 |
| 4.3. Integration von MtrB in <i>S. oneidensis</i> | 106 |
| 4.4. Ausblick..... | 115 |
| Danksagung..... | 117 |
| 5 Literatur..... | 118 |

1 Einleitung

Die angestrebte Energiewende in Deutschland lenkt einen Forschungsfaktor auf die Erschließung bisher ungenutzter Energiequellen. Diese sollten geringere oder im besten Fall keine umweltschädlichen Nebenprodukten mit sich bringen. Das gesteigerte Umweltbewusstsein und die sich darauf beziehenden Forschungsrichtungen begrenzen sich dabei nicht nur auf die Energieproduktion der Zukunft, sondern beziehen sich auch auf die Behebung von vergangenen Umweltverschmutzungen und einem effektiveren Schutz der Natur für die Gegenwart. Eine große Ressource für die umweltschonende Energieherstellung stellen bisherige Abfallprodukte wie Abwasser oder Haushalts- bzw. Biomüll mit einem großen Anteil an chemisch gebundener Energie dar. Für diese Ziele der geringeren Umweltbelastung bei der Energiegewinnung, des Aufarbeitens von Altschäden und Vermeiden von weiteren Umweltverschmutzungen kann der Einsatz von Bakterien, die zum extrazellulären Elektronentransport (EET) befähigt sind, ein relevanter Fortschritt sein.

Diese Organismen sind in der Lage, die durch die Oxidation von organischem Substrat freigesetzten Elektronen aus dem Cytoplasma auf die Zelloberfläche und anschließend auf einen unlöslichen, terminalen Elektronenakzeptor zu übertragen. Diese sogenannte dissimilatorischen Metallreduktion (DMR) kann in einer mikrobiellen Brennstoffzelle (engl.: *microbial fuel cell* (MFC)) genutzt werden. Dabei werden die freigesetzten Elektronen auf eine Elektrode übertragen und als Stromfluss nutzbar gemacht (Bond *et al.*, 2002; Han'guk Sanöp Misaengmul Hakhoe. *et al.*, 1999; Logan *et al.*, 2006). Die bisher aufwendig wiederaufzubereitenden Abwässer oder Abfälle könnten nicht nur durch den Einsatz der MFC kostengünstiger verwertet werden, sondern auch für die parallele Produktion von Energie oder Chemikalien die Basis bilden (Logan & Rabaey, 2012).

Eine andere ökologische technische Anwendung auf Grundlage der EET stellt die Bioremediation dar. Dabei können die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen genutzt werden, um lösliche Schwermetallverbindungen durch Reduktion zu fällen. Diese gezielte Reduktion ermöglicht es

Schwermetallverunreinigungen aus dem Erdreich abzutrennen, um bis dato nicht mehr nutzbare Fläche für den Menschen und die Umwelt erneut zu erschließen.

Eine weitere Anwendung stellt die DMR basierte Biosensorik dar. Hierbei fungieren Organismen ausgestattet mit spezifischen Rezeptoren als Detektoren für verschiedene Stoffe. Die genetisch designten Organismen beginnen nach der Detektion eines spezifischen Reizes, mit der Expression der für die DMR essenziellen Gene und übertragen ein messbares elektrisches Signal (Zhou *et al.*, 2017). Diese Biosensoren bieten die Möglichkeit einer direkten Überwachung von Gewässern oder einer schnellen Überprüfung von Proben ohne aufwendige Verfahren im Labor.

All diese Anwendungsgebiete basieren auf dem extrazellulären Elektronentransport und der Übertragung auf einen terminalen Elektronenakzeptor. Die genauen Abläufe der Übertragung und der Integration der beteiligten Proteine sind noch nicht aufgeklärt und erfordert neben einer weiteren Erforschung auch die Optimierung. Für dieses Forschungsgebiet stellt *S. oneidensis* MR-1 den am besten erforschten Modellorganismus dar.

1.1. *Shewanella oneidensis* MR-1

1988 wurde das Gram-negative γ -Proteobakterium *S. oneidensis* MR-1 aus dem See Oneida, im Staat New York in den USA isoliert (Myers & Nealson, 1988).

Bei der Charakterisierung des Organismus konnten unter anaeroben Bedingungen 20 verschiedene nutzbare terminale Elektronenakzeptoren identifiziert werden. Zu ihnen gehören sowohl lösliche Stoffe wie DMSO, TMAO, Fumarat und Nitrat als auch Metalle wie Fe^{3+} , Mn^{4+} , As^{5+} und U^{6+} bzw. deren (Oxy-)hydroxide (Burns & DiChristina, 2009; Goh *et al.*, 2005; Gralnick *et al.*, 2006; Myers & Nealson, 1988; Yang *et al.*, 2006).

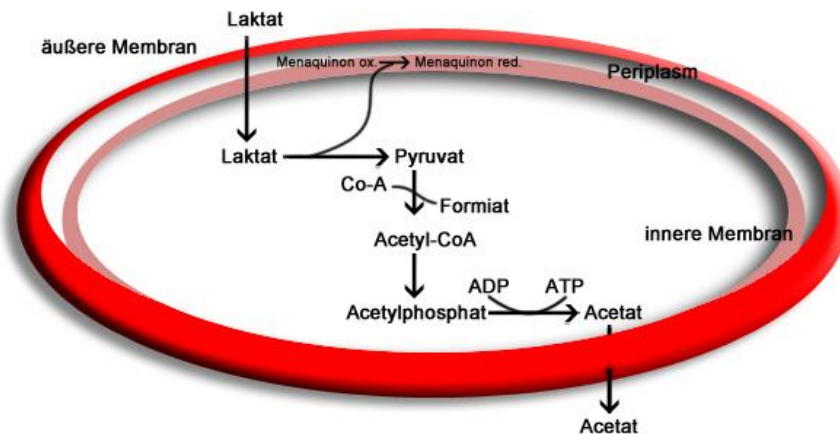


Abbildung 1: Schematische Darstellung der anaeroben Energiegewinnung von *S. oneidensis* mit Laktat als Elektronendonator (Abb. verändert nach Flynn *et al.*, 2012).

Für die anaerobe Energiegewinnung ist *S. oneidensis* auf Laktat und N-Acetylglucosamin als Elektronendonoren angewiesen (Yang *et al.*, 2006). Für die Produktion von ATP nutzt *S. oneidensis* überwiegend die Substratstufenphosphorylierung, bei der Acetylphosphat zu Acetat metabolisiert wird (Abbildung 1), da die Zellen nicht zur Gärung befähigt sind (Flynn *et al.*, 2012). Bei der Umsetzung von Lactat zu Pyruvat bzw. zu Formiat/ CO_2 und Acetat werden die freiwerdenden Elektronen auf den Menaquinonpool (MQ-Pool) übertragen. Der MQ-Pool ist in der inneren Membran lokalisiert und überträgt die Elektronen weiter auf das integrale Membranprotein CymA (**cytoplasmic membrane protein A**), welches an der inneren Membran im Periplasma lokalisiert ist. Im weiteren Schritt überträgt

CymA die Elektronen aus dem Menaquinonpool auf verschiedene Cytochrome im Periplasma.

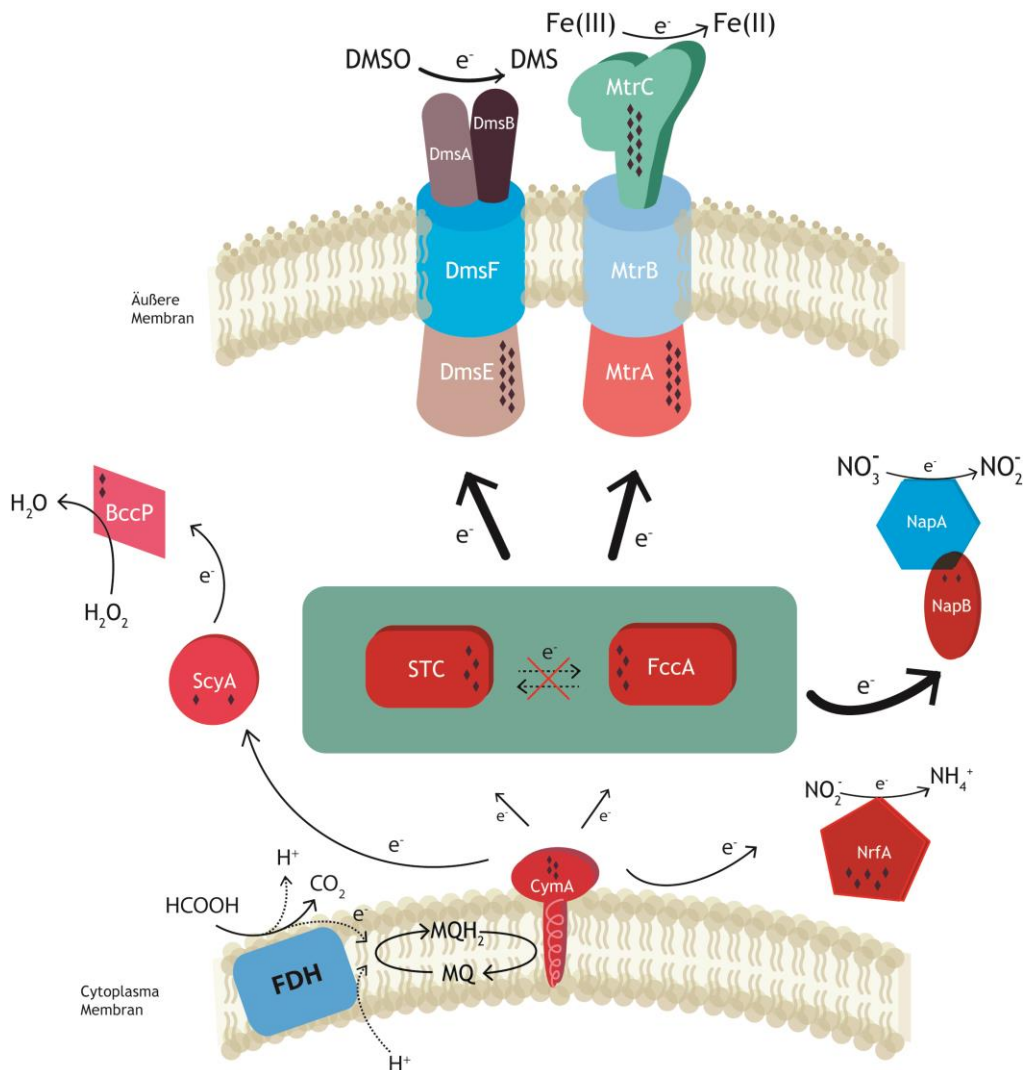


Abbildung 2.: Schematische Darstellung der Elektronenübertragung von der inneren Membran von *S. oneidensis* durch das Periplasma und die äußere Membran, bis hin zum extrazellulären Elektronenakzeptor. Über CymA in der cytoplasmatischen Membran werden die Elektronen aus dem Menaquinonpool auf STC oder FccA im Periplasma übertragen. Diese Cytochrome fungieren als Shuttle und übertragen so die Elektronen zu äußeren Membrankomplexen, welche die Elektronen auf einen extrazellulären, terminalen Elektronenakzeptor übertragen.

Das Tetrahäm-Cytochrom STC (*engl.*: **s**mall **t**etra**h**eme **c**ytochrome) scheint zusammen mit FccA eine wichtige Rolle für den EET zu besitzen, da durch die Arbeit von (Sturm *et al.*, 2015) gezeigt wurde, dass die Deletion beider Gene zum funktionalen Verlust der Elektronenübertragung auf die terminalen Reduktasen MtrC (Fe³⁺), DmsAB (DMSO) oder NapA (Nitrat) führt. Dagegen

scheint der Elektronentransport auf die Nitrit-Reduktase NrfA oder über das Dihäm ScyA (*engl.: monoheme cytochrome c5*) direkt erfolgen zu können. Letzteres ist wichtig für die Reduktion der Peroxidase BCCP (*engl.: Bacterial diheme c-type cytochrome peroxidases*) (Miao Jin *et al.*, 2013; Schütz *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2015). Die wichtige Rolle von STC und FccA (*engl.: flavocytochrome c A*) wird ferner dadurch unterstrichen, dass sie ca. 40% des gesamten periplasmatischen Häme bilden. Des Weiteren unterstützen FccA und STC den Elektronentransport durch das Periplasma. FccA fungiert dabei zusätzlich als Reduktase für Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor. In diesem Fall, so wie bei anderen löslichen Elektronenakzeptoren, können sich die Zellen schon im Periplasma ihrer überschüssigen Elektronen entledigen. Für unlösliche Elektronenakzeptoren wie Fe^{3+} , die nicht in die Zelle eindringen können müssen die Elektronen durch die äußere Membran transportiert werden. Diese Elektronen aus dem Periplasma werden dafür an den MtrABC-Komplex in der äußeren Membran transportiert, um durch den Komplex an die Zelloberfläche zu gelangen (Brutinel & Gralnick, 2012; Flynn *et al.*, 2012; Hunt *et al.*, 2010).

Es wird angenommen, dass die dissimilatorische Eisenreduktion zu den ursprünglichsten Formen der Atmung gehört, da Organismen an der Basis des Stammbaum des Lebens in der Lage sind, Fe^{3+} zu reduzieren (Richter *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 1998). In der Erdkruste ist Eisen eines der häufigsten vorkommenden Metalle und somit unter anaeroben Bedingungen ein gut verfügbarer terminaler Elektronenakzeptor (TEA) (Weber *et al.*, 2006).

Die Reduktion von Eisen ist hierbei nicht nur durch den bisherig beschriebenen **direkten Kontakt** an der Zelloberfläche möglich, sondern auch bei sich abseits der Zelle befindenden Eisenatomen (Abbildung 3 A) (Lies *et al.*, 2005).

Ist der direkte Kontakt nicht möglich, kann eine Distanz zu dem Elektronenakzeptor mittels **Nanowires** überbrückt werden (Abbildung 3 B). Dafür wird die äußere Membran ausgestülpt und somit ein extrazelluläres Filament, der Nanowire, gebildet. Der die äußere Membran durchspannende MtrABC-Komplex, kann durch dieses Filament eine Distanz von bis zu 600 nm zu einem unlöslichen, terminalen Elektronenakzeptor zurücklegen und so eine

Übertragung der Elektronen ermöglichen (El-Naggar *et al.*, 2010; Pirbadian *et al.*, 2014; Subramanian *et al.*, 2018).

Des Weiteren können endogene **Elektronenshuttles** den Transport der Elektronen übernehmen (Abbildung 3 C). Bei diesen Shuttles kann zwischen zwei Varianten unterschieden werden. Die Substanzen können entweder vor der Sekretion reduziert werden oder oxidiert sekretiert werden, um anschließend an der Zelloberfläche reduziert zu werden. In beiden Fällen diffundieren sie zum extrazellulären Elektronenakzeptor, der die Shuttles oxidiert. In diesem Fall ist eine Reduktion eines terminalen Elektronenakzeptors ohne Zellkontakt möglich. Durch Diffusion, zwischen dem TEA und der Zelle können diese Shuttles mehrere Redoxzyklen durchlaufen. *S. oneidensis* nutzt dafür vor allem Flavine als Elektronenshuttle (Coursolle & Gralnick, 2010; Kotloski & Gralnick, 2013; Marsili *et al.*, 2008).

Durch Komplexbildner, sog. **Chelatoren**, können unlösliche Elektronenakzeptoren in Lösung gebracht werden (Abbildung 3 D). Diese gelangen durch Diffusion als Chelator-Akzeptor-Komplex zur Zelle und können an der Zelloberfläche die Elektronen aufnehmen. Durch diese Reduktion löst sich der Elektronenakzeptor vom Chelator und steht für den nächsten Zyklus wieder bereit (Jones *et al.*, 2010; Pitts *et al.*, 2003).

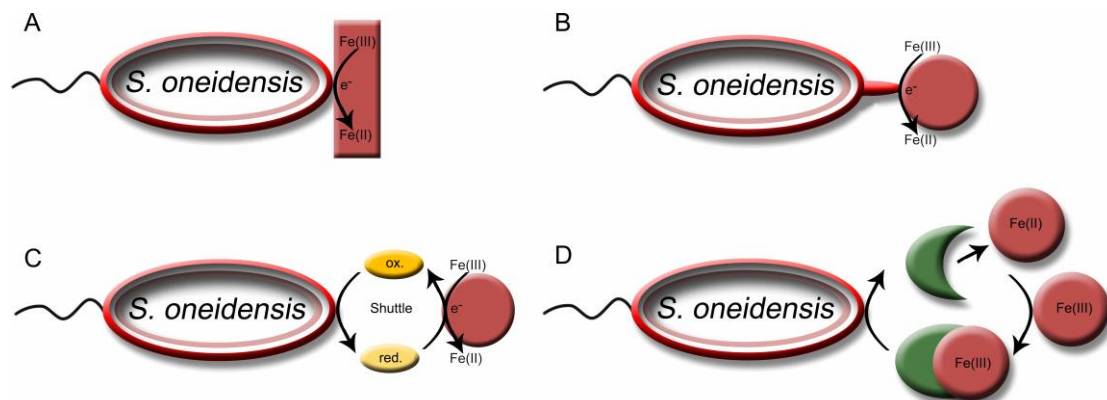


Abbildung 3.: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten zur Übertragung der Elektronen auf unlösliche Eisenspezies. A: Übertragung der Elektronen durch den direkten Kontakt. B: Übertragung der Elektronen über Nanowires. Die „Verlängerung“ der Zellmembran ermöglicht eine Elektronenübertragung auf Akzeptoren in einem größeren Radius. C: Elektronenübertragung durch ein Shuttle. Ein zwischen der Zelle und dem Elektronenakzeptor diffundierendes Shuttle kann mehrere Redoxzyklen durchlaufen. Bei jedem Zyklus können Elektronen auf die TEAs übertragen werden und das Shuttle regeneriert. D: Transport zur Zelle mit Hilfe eines Chelators. Durch Chelatierung des Fe^{3+} können Ionen in einem Komplex in Lösung gebracht und zur Zelle transportiert werden, wo die Reduktion erfolgt und anschließend die Freisetzung des chelatierten Ions (Abb. verändert nach Gralnick & Newman, 2007).

Für alle vier Varianten stellt die äußere Membran eine Barriere für die Elektronen dar, welche im Falle des direkten Kontakts und der Nanowires mittels der verlängerten Elektronentransportkette überwunden wird.

1.1.1. Verlängerte Elektronentransportkette

Durch die Oxidation des Elektronendonors fallen im Cytoplasma der Zellen Elektronen an, die bei der Übertragung auf den TEA die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran durchqueren müssen. Diese Aufgabe bewältigen in *S. oneidensis* unterschiedliche *c*-Typ Cytochrome. Von 41 Genen, die für Cytochrome kodieren, konnten 12 periplasmatische Cytochrome identifiziert werden, welche unter Eisen-reduzierenden Bedingungen exprimiert werden (Miao Jin *et al.*, 2013). Diese Cytochrome bilden ein Elektronentransfernetzwerk aus, innerhalb dessen sie auf Grund ihrer überlappenden Redoxpotentiale in der Lage sind, Elektronen von der inneren Membran, durch das Periplasma bis zur äußeren Membran zu transportieren (Abbildung 4) (Firer-Sherwood *et al.*, 2011; Sturm *et al.*, 2015).

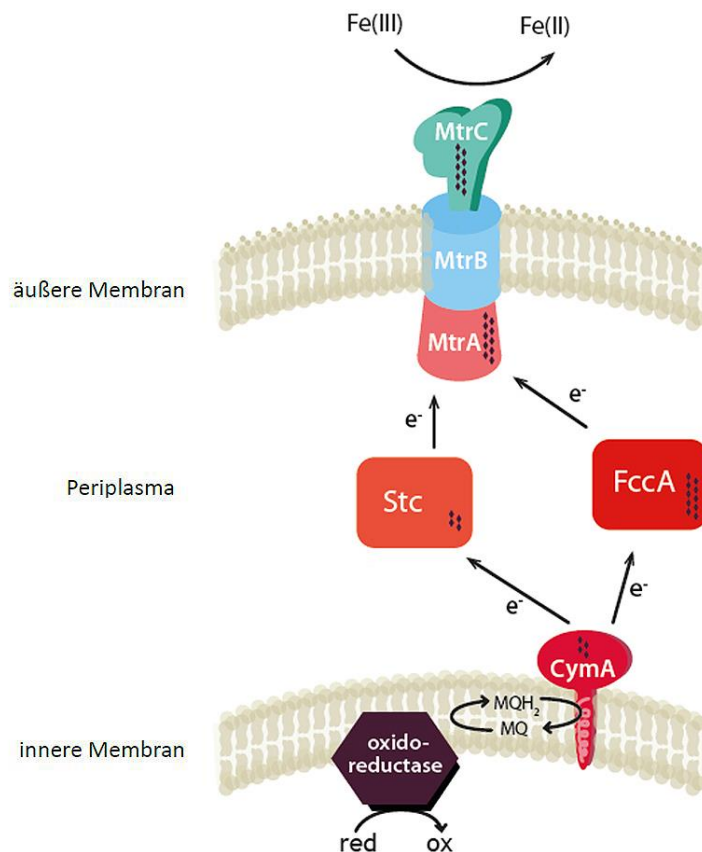


Abbildung 4.: Schematische Darstellung des Elektronentransports von der Oxidoreduktase bis zum terminalen Elektronenakzeptor. CymA überträgt die Elektronen aus dem Menaquinonpool in das Periplasma, dort werden sie von Stc und FccA auf MtrA übertragen. Der MtrABC-Komplex transportiert die Elektronen durch die äußere Membran und ist dann in der Lage Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren. Die schwarzen Rauten innerhalb der Proteine symbolisieren die Anzahl der Häm-Gruppen des jeweiligen Proteins (Abb. verändert nach Stephan, 2015).

Der Elektronentransport in *S. oneidensis* auf Fe^{3+} ist ausschließlich auf c-Typ Cytochrome limitiert. Cytochrome besitzen eine prosthetische Häm-Gruppe, welche kovalent an das Apoprotein gebunden ist. Die Hämgruppe wird an das Bindemotiv CXXCH geknüpft, indem die beiden Cysteine durch Thioetherbindungen kovalent mit dem Protein verbunden werden (Bouhenni *et al.*, 2005; Dale *et al.*, 2007).

Im folgenden Abschnitt werden die relevanten, direkt involvierten Proteine der Eisenreduktion näher beschrieben.

CymA (engl.: *cytoplasmic membrane protein A*):

Das 21 kDa große Tetra-häm-Protein ist im Periplasma der inneren Membran lokalisiert. Die Deletion von CymA führt zum Verlust der Fähigkeit zur

Reduktion von Eisen sowie Mangan, Nitrat, Nitrit, Fumarat und DMSO (Myers & Myers, 1997). Es ist für die Aufnahme der Elektronen aus dem Menaquinonpool und die Verteilung auf die Cytochrome im Periplasma verantwortlich (Myers & Myers, 1997).

FccA (engl.: flavocytochrome c A):

Das Tetrahäm-Cytochrom FccA stellt die physiologische Fumaratreduktase in *S. oneidensis* dar (Beeumen *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2003). FccA in Kombination mit STC bildet den Transportweg zur Elektronenübertragung von CymA durch das Periplasma. Dabei ist FccA in der Lage, Elektronen von CymA aufzunehmen und auf MtrA zu übertragen, um so die weitere Eisenreduktion zu ermöglichen. Ein Austausch von Elektronen zwischen FccA und STC ist nicht möglich (Schuetz *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2015).

STC (engl.: small tetraheme cytochrome):

Das 12 kDa schwere Tetrahäm-Protein STC bildet zusammen mit FccA den Hauptanteil an periplasmatischem c-Typ Cytochrom (Meyer *et al.*, 2004; Tsapin *et al.*, 2001). Die Deletion beider Proteine führt zu einer verminderten anaeroben Wachstumsrate auf Eisen, DMSO und Nitrat (Sturm *et al.*, 2015).

Nach der Übertragung der Elektronen vom Menaquinonpool auf CymA im Periplasma übernehmen FccA oder STC den Transport durch das Periplasma zur äußeren Membran. Dort können die Elektronen auf den MtrABC-Komplex übergeben werden. Dieser die äußere Membran durchspannende Komplex ist in der Lage die Elektronen durch die Membran auf einen TEA zu übertragen.

1.1.2. Der MtrABC-Komplex

Der in der äußeren Membran lokalisierte MtrABC-Komplex (engl.: *metal reducing protein ABC complex*) transportiert die Elektronen aus dem Periplasma auf den TEA. Der Komplex wird aus drei Proteinen gebildet, die in einer 1:1:1 Stöchiometrie vorliegen (Abbildung 5) (Ross *et al.*, 2007). Die beiden *c*-Typ Cytochrome MtrA und MtrC sind für die Übertragung der Elektronen zuständig. Dabei ist MtrA im Periplasma positioniert und für die Elektronenaufnahme verantwortlich. MtrC liegt auf der Zelloberfläche und dient als terminale Reduktase. Durch MtrB als β -Fass-Protein wird eine Proteinpore gebildet. Diese Pore ermöglicht die Interaktion von MtrA und MtrC für die Elektronenübertragung. Die auf MtrC übergebenen Elektronen können anschließend auf einen extrazellulären Elektronenakzeptor wie z.B. Eisen oder Mangan übertragen werden (Bücking *et al.*, 2010; Coursolle & Gralnick, 2012). Der Komplex kann so eine Elektronenübertragungsrate von über $8.500 \text{ e}^- \text{ s}^{-1}$ erreichen (White *et al.*, 2013).

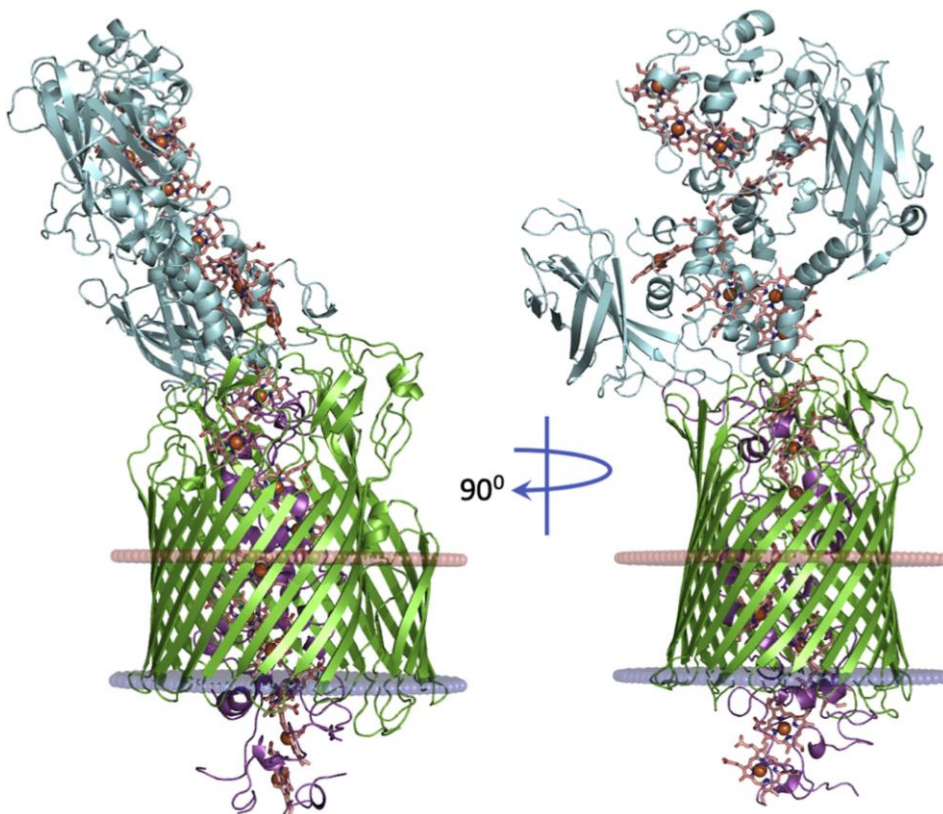


Abbildung 5.: Darstellung des MtrABC-Komplexes von zwei Seiten, mit MtrB (grün) als Interaktionskanal für MtrA (violett), auf der periplasmatischen Seite der äußeren Membran (blau transparent) und MtrC (grau), auf der Zelloberfläche (rot transparent) (Abb. verändert nach Edwards *et al.*, 2020).

Durch eine Interaktion von MtrC mit der terminalen Reduktase OmcA auf der Zelloberfläche, können die Elektronen auf ein erweitertes Spektrum an TEA übertragen werden. Die Gene *mtrA*, *-B* und *-C* sind in Reihe unter einem gemeinsamen Promotor geschaltet, während *omcA* separat unter einem eigenen Promotor lokalisiert ist (Abbildung 6) (Beliaev *et al.*, 2001). Der sich in *S. oneidensis* befindliche, homologe Protein-Komplex MtrDEF weist das selbe Schema für die Genlokalisierung auf (Pitts *et al.*, 2003).

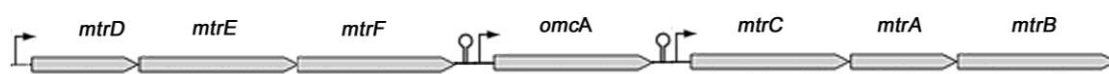


Abbildung 6: Gencluster des MtrABC Komplexes (rechts) und dem äußeren Membrancytochrom OmcA (mittig) in *S. oneidensis*. Die Pfeile oberhalb der Genabschnitte zeigen die Position und Orientierung der Promotoren an. Die Haarnadelschleifen symbolisieren den Terminator (Abb. verändert nach Pitts *et al.*, 2003).

Die Bedeutung des MtrABC-Komplexes für die zelleigene Energiegewinnung wird durch die Existenz von homologen Konstrukten gestützt. Diese sind wahrscheinlich durch Verdopplungs-Effekte der Gene entstanden und bieten somit einen Anpassungsspielraum unter veränderten Umwelteinflüssen. Es ist bekannt, dass *S. oneidensis* neben dem MtrABC-Komplex drei weitere Proteinkomplexe für den Transport der Elektronen aus der Zelle besitzt; den MtrDEF-Komplex, DmsEF sowie den bisher wenig erforschten Komplex, bestehend aus SO4360 und SO4359 (Coursolle & Gralnick, 2010).

OmcA (engl.: **outer membrane cytochrome A**):

Die Mangan-Reduktase ist ein Decahäm mit 79 kDa auf der äußeren Membran und gehört zu den drei homologen Reduktasen neben MtrF und MtrC auf der Zelloberfläche von *S. oneidensis* (Coursolle & Gralnick, 2010). Im Gegensatz zu den beiden Homologen scheint OmcA nicht hauptverantwortlich für die Reduktion von Eisen sondern für Mangan zu sein (Bücking *et al.*, 2010; Coursolle & Gralnick, 2012; Myers & Myers, 2002).

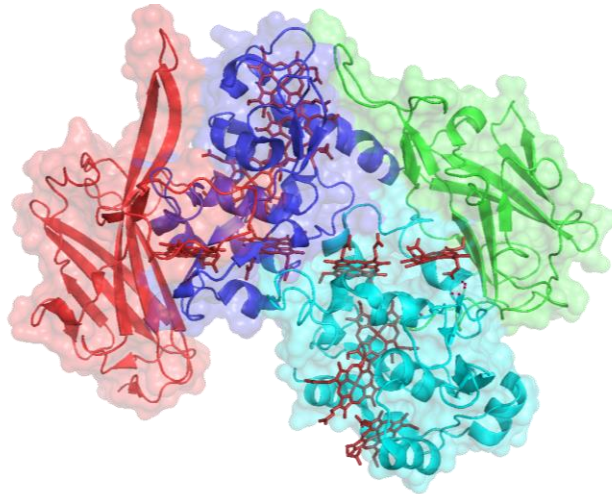


Abbildung 7: Darstellung der 3D-Struktur von OmcA. Die einzelnen Domänen sind einheitlich eingefärbt und die Häm-Gruppen in dunkelrot markiert. Die Flavinbindedomänen sind rot und grün dargestellt. Hellblau und dunkelblau sind die beiden Domänen, welche die Elektronenübertragung durch die Hämgruppen ermöglichen. Die Bearbeitung wurde mit PyMOL durchgeführt.

MtrC (engl.: **metal reducing protein C**):

Die Funktionsweise des 71 kDa schweren Decahäm, dass gleichzeitig als terminale Reduktase des MtrABC-Komplexes dient, konnte mittels des Vergleichs der Kristallstrukturen der homologen Proteine OmcA und MtrF hergeleitet werden. Auf Proteinebene zeigen die Kristallstrukturen von MtrC (Edwards *et al.*, 2015) und MtrF (Coursolle & Gralnick, 2010) eine Sequenzidentität von 31% und Homologie von 47% und weisen somit eine größere Ähnlichkeit auf als zu OmcA (Edwards *et al.*, 2012). In Abbildung 8 ist MtrF im direkten Vergleich zu MtrC abgebildet. Aus dieser Struktur lässt sich die fünfte Hämgruppe als Reduktionsstelle für das Fe³⁺ ermitteln, während die Hämgruppen zwei und sieben für die Reduktion der Flavine zuständig sind (Clarke *et al.*, 2011). Die Reduktion von Flavinen als Shuttles wird ausschließlich durch die OMCs (äußeren Membrancytochrome) in *S. oneidensis* durchgeführt und erfolgt an der Zelloberfläche (Richter *et al.*, 2012).

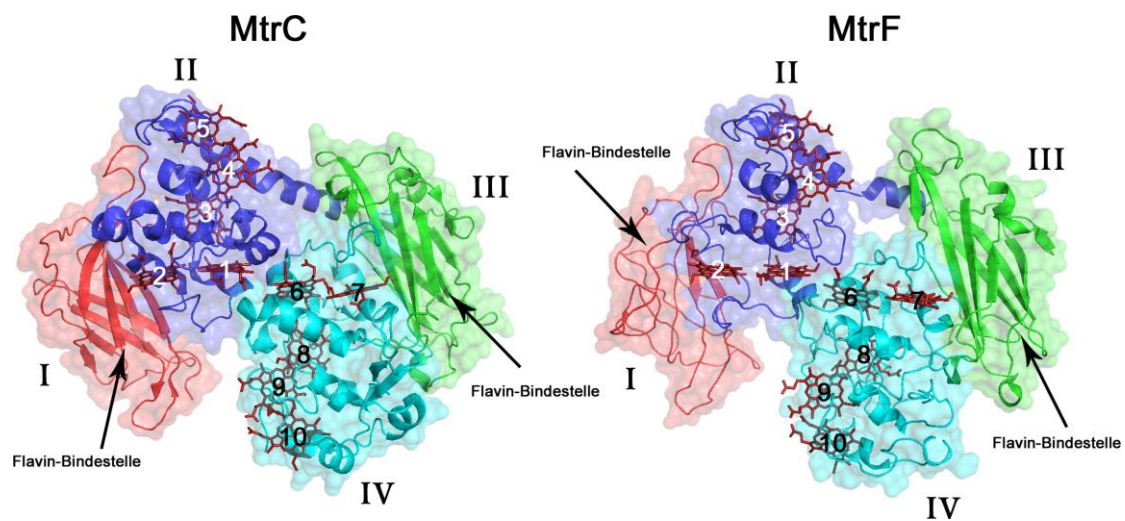


Abbildung 8: Kristallstruktur von MtrC im direkten Vergleich zu MtrF. Die funktionellen Bereiche des MtrF Moleküls sind gekennzeichnet und wurden auf MtrC übertragen. Alle 10 Hämgruppen sind durchnummeriert. Hämgruppe 5 ist für die Reduktion des Eisens durch direkten Kontakt verantwortlich, sowie die Hämgruppen 2 und 7 für die Reduktion von löslichen Molekülen zuständig sind. Diese Moleküle können als Shuttle dienen, wie z.B. Flavine. Durch die Übertragung der Elektronen von Häm 8 auf Häm 6 und von Häm 1 auf Häm 3 können die Flavin-Bindemotive umgangen werden. Der Bereich IV ist an der Pore von MtrB lokalisiert und nimmt die Elektronen aus dem Periplasma bzw. von periplasmatischen Cytochromen (MtrD/MtrA) auf (Abb. verändert nach Clarke et al., 2011).

Für diese Funktionsweise der terminalen Reduktasen ist ein Transport der Proteine an die Zelloberfläche erforderlich, wobei die im Cytoplasma produzierten Proteine durch die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran transportiert werden müssen. Dafür besitzt die Aminosäurekette von MtrC eine N-terminale Signalsequenz, die vom Sec-System erkannt wird und den Transport aus dem Cytoplasma in das Periplasma ermöglicht (Sugai & Wu, 1992). Dieses Signalpeptid wird nach dem Transport in das Periplasma von einer Peptidase abgetrennt (Cranford-Smith & Huber, 2018). Das bis dahin als Apoprotein vorliegende MtrC wird von den Ccm-Proteinen (engl.: **c**-type **cy**tochrome **m**aturation) erkannt und gefaltet, dabei übernehmen sie die besondere Aufgabe der Integration der Hämgruppen (Jin et al., 2013). Als vollständig gefaltetes Protein überwindet es die Barriere der äußeren Membran über das Typ-II-Sekretionssystem und wird so nach außen sekretiert (Richter et al., 2012; L. Shi et al., 2008). Über den Lipidanker (LTGC) wird MtrC an der Membran der Zelle gehalten (Stephan, 2015). Über die Kristallstruktur und die theoretische Größe von MtrB ist davon auszugehen,

dass MtrC auf MtrB aufliegt (Edwards *et al.*, 2015). Für die Übertragung der Elektronen scheint MtrA in MtrB einzudringen, um so mit MtrC in Interaktion treten zu können.

MtrA (engl.: *metal reducing protein A*):

Die Aufnahme der Elektronen aus dem Periplasma und der Transport durch die äußere Membran auf MtrC wird durch das 32 kDa schwere Decahäm Cytochrom MtrA durchgeführt (Beliaev *et al.*, 2001; Pitts *et al.*, 2003). Auf Grund des Redoxpotentials ist eine Reduktion von Eisen, in Form von Eisenchelaten, durch MtrA auch schon im Periplasma möglich (Pitts *et al.*, 2003). Auch wenn eine Übertragung der Elektronen von CymA an der inneren Membran auf MtrA möglich ist (Beliaev *et al.*, 2001), werden für gewöhnlich FccA und STC für den Transport durch das Periplasma reduziert (Schuetz *et al.*, 2009; Sturm *et al.*, 2015).

Die Struktur von MtrA weist nur für ca. 20% der Aminosäurekette Sekundärstrukturen auf. 80% des Proteins liegen somit frei beweglich vor. Jedoch bilden die C-Terminalen Hälfte von MtrA Wasserstoffbrücken mit dem ummantelnden MtrB aus, welche zu einer Fixierung des Cytochroms in MtrB führt (Abbildung 9).

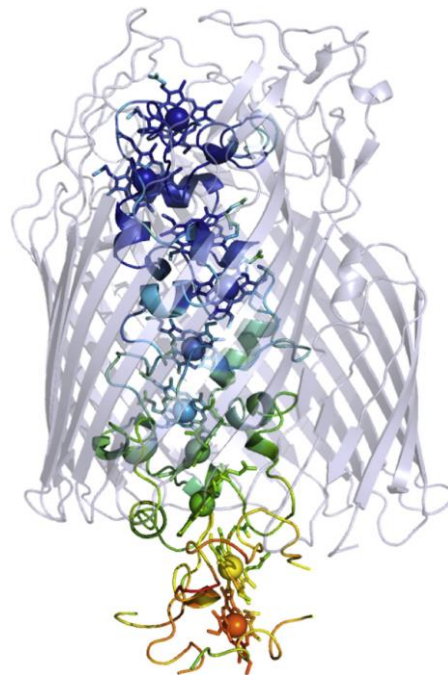


Abbildung 9.: Darstellung von MtrA (farbig) mit dessen Sekundärstrukturen, Hämgruppen (Kugeln) sowie den flexiblen N-Terminus (orange bis grün) und den fixierten C-Terminus (blau) verankert in MtrB (grau) (Abb. verändert nach Edwards *et al.*, 2020).

Der flexible, dem Periplasma zugewandte N-Terminus erleichtert die Übertragung der Elektronen von FccA und STC auf die erste Hämgruppe von MtrA. Der anschließende Transport der Elektronen durch MtrB ermöglicht die Übergabe auf MtrC an der 10. Hämgruppe (Clarke *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2020; Sturm *et al.*, 2015).

Jedoch zeigt MtrA nicht nur eine Funktion für den Elektronentransport auf, sondern auch für die Integration von MtrB in die äußere Membran. So führt die Expression von *mtrB* ohne MtrA zu einem Abbau von MtrB (Schicklberger *et al.*, 2011; Stephan, 2015). Über diese Interaktion und die anschließende Integration von MtrB in die Membran führt dies zu einer Lokalisation von MtrA in der äußeren Membran (White *et al.*, 2013). Daher ist von einer besonderen Interaktion von MtrA und MtrB auszugehen, die sich von MtrC zu unterscheiden scheint.

MtrB (engl.: *metal reducing protein B*):

Das mit 76 kDa schwerste der drei Komponenten ist das Transmembranprotein MtrB. Dieses sitzt in der äußeren Membran und dient so für den Elektronenaustausch von MtrA auf MtrC (Beliaev & Saffarini, 1998; Shi *et al.*, 2012). Ähnlich wie bei MtrA unterstützt es die Lokalisierung am Proteinkomplex (Myers & Myers, 2002).

Bioinformatische Untersuchungen identifizieren zwar einige strukturell sehr ähnliche Proteine wie z.B. AtlE aus *Staphylococcus epidermidis* (21% identisch und 53% ähnlich, über 351 Aminosäuren) (Heilmann *et al.*, 1997), OmpC aus *Salmonella typhimurium* (27% identisch und 41% ähnlich, über 235 Aminosäuren) (Negm & Pistole, 1999) und FepA aus *E. coli* (19% identisch und 40% ähnlich, über 252 Aminosäuren) (Lundrigan & Kadner, 1986). jedoch weisen alle drei dieser Proteine keine vergleichbaren Funktionen auf. So gehört AtlE zu der Gruppe der Autolysine, (Sivadon *et al.*, 2009) Wie auch schon aus den 3D-Modellen der Proteine in Abbildung 10 auf Grund der Struktur zu erkennen ist.

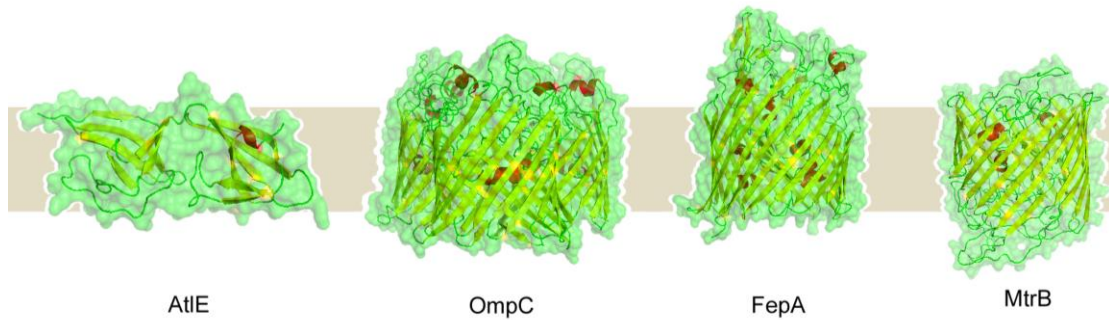


Abbildung 10: Darstellung der Proteine AtlE, OmpC und FepA, welche Ähnlichkeiten mit MtrB aus *S. oneidensis* aufweisen. Das MtrB 3D-Modell wurde mit Phyre² erstellt. Alle Modelle wurden mit PyMOL bearbeitet. Die gelben Bereiche stellen β -Faltblätter dar. Eine α -Helix wird in den Modellen rot markiert.

Die homologen Proteine von MtrB, MtrE, DmsF und SO4359 weisen zwar eine große Ähnlichkeit in ihrer Primärstruktur sowie Quartärstruktur mit MtrB auf, sind diese bisher aber noch weniger erforscht als MtrB selbst (Coursolle & Gralnick, 2010). Es konnte noch keine Kristallstruktur von MtrB aus *S. oneidensis* MR-1 hergestellt werden. Jedoch stehen die Kristallisationsdaten für das homologe Protein aus *Shewanella baltica* OS185 zur Verfügung (Abbildung 11) (Edwards *et al.*, 2020). Die beiden MtrB Proteine aus den Organismen *S. oneidensis* und *S. baltica* weisen einen hohen Vergleichbarkeit auf (BlasP: Max score: 1286; Total score: 1286; Query cover: 100%; E value: 0.0; Ident 88.09 %).



Abbildung 11: Darstellung der Kristallstruktur von MtrB aus dem Organismus *S. baltica* OS185. Als Standardfarbe wurde grün gewählt. Die β -Faltblätter sind durch Pfeile in N-Terminus zu C-Terminus Richtung dargestellt. Die α -Helices sind rot markiert und die Loops gelb. (Abb. verändert nach Edwards *et al.*, 2020)

Durch diese nahe Verwandtschaft der Organismen und die hohe Ähnlichkeit der MtrB Homologe bilden die Daten der Kristallisation eine Basis für die Klärung bisher umstrittene Fragen. Sicher ist jedoch, dass MtrB aus der Familie der β -Fass-Proteine, mit seinen Eigenschaften im Besonderen hervorsteicht.

1.2. MtrB - ein atypisches β -Fass-Protein

β -Fass-Proteine zeigen für gewöhnlich eine ähnliche Struktur im Aufbau. Dabei kann die Anzahl der strukturgebenden β -Faltblätter zwischen 8 wie bei OmpA (Pautsch & Schulz, 1998) und 22 bei FepA (Deisenhofer *et al.*, 1999) liegen. Bei MtrB sind jedoch mit 28 theoretische β -Faltblättern überdurchschnittlich viele identifiziert worden (Beliaev & Saffarini, 1998). Durch die Kristallisation von MtrB aus *S. baltica* konnte festgestellt werden, dass 26 dieser β -Faltblättern die äußere Membran durchspannen und zwei sich im inneren Hohlraum des β -Fass-Proteins befinden (Edwards *et al.*, 2020). Es ist dabei nicht geklärt, welche Funktion dieser Teil des Proteins übernimmt.

Die Struktur eines β -Fass-Proteins weist eine Orientierung in der Membran auf. Wie anhand von OmpC in Abbildung 12 zu sehen, durchspannen die antiparallelen β -Faltblätter die Lipiddoppelschicht. An der Zelloberfläche ermöglicht eine Aminosäuresequenz eine Schleife, auch als Loop bezeichnet, durch die das nächste β -Faltblatt zurück durch die Membran geführt wird. Die β -Faltblätter sind gegenläufig orientiert. Sie führen abwechselnd von außen nach innen und von innen nach außen, bis der C-Terminus wieder mit dem N-Terminus im Periplasma interagiert und sich so die namensgebende Fass-Struktur bildet. β -Fass-Proteine weisen im Gegensatz zu MtrB eine Orientierung auf, bei der die Loops zwischen den β -Faltblättern auf der Zelloberfläche größer sind als im Zellinneren, somit scheint MtrB um 180° gedreht in der Membran zu sitzen (Fairman *et al.*, 2011; Jordanov *et al.*, 2012; Pautsch & Schulz, 1998).

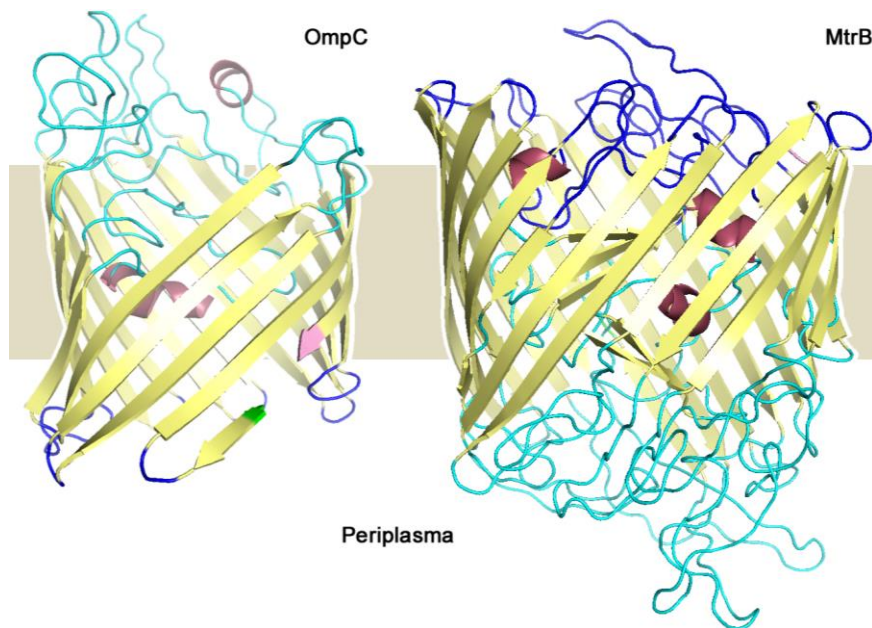


Abbildung 12: Darstellung der β -Fass-Proteinen OmpC und MtrB und ihrer Lokalisation in der Membran. In dieser Abbildung sind die kleinen Loops blau, die großen Loops türkis, die β -Faltblätter gelb, die α -Helix rot, der N-Terminus grün und der C-Terminus Pink gefärbt.

Dieser Annahme widersprechen jedoch die neuen Erkenntnisse der Kristallstruktur von Edwards *et al.*, (2020). Ein Aspekt der Stabilität, der meisten β -Fass-Proteinen, ist die Interaktion des N- und C-Terminus im Zellinneren. Dadurch wird ein Ringschluss gebildet, der dem Entfallen des Proteins entgegenwirkt. Diese Eigenschaft konnte bei MtrB nicht beobachtet werden, da der N-Terminus auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, während der C-Terminus nach innen gerichtet ist (White *et al.*, 2013). Daher ist davon auszugehen, dass die Struktur eine höhere Flexibilität aufweist als bei einer geschlossenen Struktur. Der Einbau von OMPs wird in Gram-negativen Organismen hauptsächlich durch den BAM-Komplex durchgeführt. Hierfür existiert ein ausgeprägtes Netzwerk an Chaperonen im Periplasma, die für den Schutz und den Transport der OMP-Apoproteine zum BAM-Komplex verantwortlich sind. Diese Chaperone unterstützen jeweils die Integration bestimmter Gruppen von β -Fass-Proteinen, können aber auch überschneidende Aufgabengebiete haben (Knowles, Scott-Tucker, *et al.*, 2009). Insgesamt konnten noch keine spezifischen Chaperone gefunden werden, die nur für den Einbau eines einzigen Proteins verantwortlich sind. Bei MtrA und -B scheint MtrA jedoch ein zusätzliches Chaperon darzustellen, das ausschließlich für MtrB zuständig ist (Stephan, 2015).

1.3. Einbau von äußeren Membranproteinen in Gram-negativen Bakterien

Gram-negative Bakterien besitzen im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien eine zusätzliche Zellmembran als äußere Membran. Die Integration von äußeren Membranproteinen (engl.: *outer membrane proteins* (OMPs)) stellt eine besondere Herausforderung dar, da die Proteine aus dem Cytoplasma durch die innere Membran und das Periplasma transportiert werden müssen, bevor sie in die äußere Membran eingebaut werden können (Bos *et al.*, 2007; Tokuda, 2009). Über den genauen Mechanismus zur Integration von OMPs in *S. oneidensis* ist bisher nicht viel bekannt. Jedoch sind diese Mechanismen schon länger ein Aspekt der Forschung an *E. coli*. Auf Grund der nahen Verwandtschaft der beiden Organismen, stellen die Erkenntnisse aus *E. coli* eine Basis für die Erforschung der Integration von OMPs in *S. oneidensis*. Nach ihrer Funktion lassen sich OMPs in sechs verschiedene Gruppen einteilen; unspezifische Poren, substratspezifische Kanäle, Translocons für den Export von Substraten, Autotransporter, Enzyme und strukturenbende OMPs (Nakae, 1976; Nikaido, 1994). Bezüglich ihrer Lokalisation kann zwischen Lipoproteinen, die mit der Membran assoziieren, und Transmembranproteinen, die die Membran durchspannen, unterschieden werden (Hayashi & Wu, 1990). Unabhängig von Funktion und Lokalisation müssen die im Cytoplasma synthetisierten Proteine durch die innere Membran geschleust werden (Malinverni & Silhavy, 2011).

1.3.1. Translokation durch die innere Membran

Für die Überwindung der inneren Membran sind verschiedene Systeme bekannt, deren Einsatz sich auf die Funktion der sekretierten Proteine bezieht. Das Sec-System ist hauptsächlich für den Transport von β -Fass-Proteinen verantwortlich. Die zu sekretierenden Proteine werden über eine Signalsequenz am N-Terminus erkannt. SecB bindet die Apoproteine im Cytoplasma an ihren hydrophoben Seitenketten, um ihre Aggregation zu verhindern und geleitet sie zu SecA und SecYEG. Diese sitzen in der inneren

Membran und führen den Transport unter ATP-Verbrauch durch (Driessen & Nouwen, 2008). Nach dem Eintritt in das Periplasma wird die Sekretionssequenz von der Protease SP (engl.: *periplasmic signal peptidases*) abgetrennt (Cranford-Smith & Huber, 2018). Den weiteren Verbleib der ungefalteten Proteine übernehmen andere Systeme.

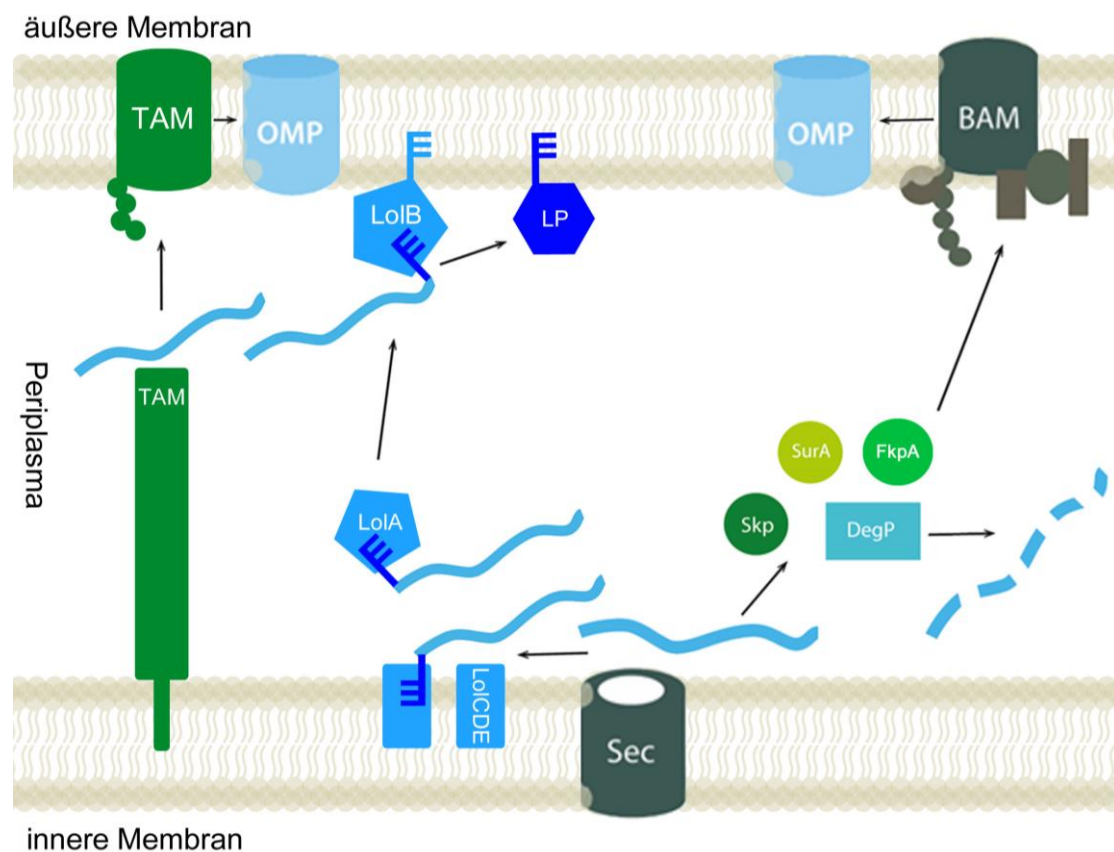


Abbildung 13.: Schema für die Translokation von Proteinen durch die innere Membran und Integration der Transmembranproteine durch den TAM- und BAM-Komplex in die äußere Membran, sowie der Lipoproteine über das Lol-System (Abb. verändert nach Ranava et al., 2018)

Eine andere Möglichkeit bietet das TAT-System (engl.: *twin-arginine translocation system*), welches in der Lage ist gefaltete Proteine zu transportieren (Voulhoux et al., 2001). Der Großteil der durch das TAT-System in das Periplasma transportierten Proteine, werden anschließend durch das T2SS aus der Zelle sekretiert (Massai et al., 2019).

1.3.2. Transport durch das Periplasma und Integration in die äußere Membran

Für die Integration der OMPs haben sich verschiedene Systeme entwickelt, die spezifische Gruppen von Proteinen bearbeiten. In erster Linie lassen sich die Membranproteine in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe, die Lipoproteine, zeichnen sich durch ihre Verankerung in der Membran über einen Lipidanker aus. Diese Proteine werden durch das Lol-System im Periplasma aufgenommen und zu ihrem Zielort geleitet (Narita & Tokuda, 2006). Das Lol-System integriert die Lipoproteine sowohl in der äußeren als auch in der inneren Membran, abhängig von der Signalsequenz (Brox *et al.*, 2004). Dazu werden die Proteine mit dem hydrophoben Lipidanker am LoICDE-Komplex an der inneren Membran aufgenommen. LolA schließt den Lipidanker für den Transport durch das Periplasma ein und geleitet das Protein zu LolB. Dies sitzt selbst als Lipoprotein an der äußeren Membran und übernimmt die von LolA angereicherten Proteine für die Integration in die Membran (Narita *et al.*, 2004; Tokuda & Matsuyama, 2004).

Die zweite Gruppe unterscheidet sich durch ihre Struktur. Diese Proteine durchspannen die äußere Membran. Dabei bilden β -Faltblätter durch antiparallele Anordnung eine sich wieder schließende Fassstruktur. Die Seitenketten der Aminosäuren generieren eine lipophile Oberfläche und ein hydrophiles Inneres. So können sich die Proteine in der Lipidphase der Membran stabil integrieren. Doch der Transport durch das wässrige Periplasma und die Integration durch die Membran stellt eine besondere Herausforderung dar. Diese Kategorie von Proteinen kann unter anderem durch den TAM-Komplex eingebaut werden.

Der TAM-Komplex (engl.: translocation and assembly module) besteht aus TamA, ein β -Fass-Protein in der OM und TamB, in der IM (Selkrig *et al.*, 2012, 2015). Es wird davon ausgegangen, dass TamB die hydrophoben Bereiche eines OMP bindet und durch das Periplasma zu TamA transportiert. Dort wird es in die OM eingebaut (Bollati *et al.*, 2015; Josts *et al.*, 2017). Typischerweise

gehören Autotransporter und fimbrial ushers zu der Gruppe von OMPs, die der TAM-Komplex einbaut (Ranava *et al.*, 2018b).

Der BAM-Komplex ist deutlich komplexer aufgebaut und interagiert mit Chaperonen aus dem Periplasma. Nach der Sekretion der Proteine in das Periplasma interagieren sie direkt mit Chaperonen, welche eine Aggregation und den direkten Abbau verhindern (Silhavy *et al.*, 2010). Diese Komplexe werden zum BAM-Komplex an der OM transportiert. Bis jetzt sind vier beteiligte Proteine bekannt. Eines ist SurA, das wichtigste Chaperon für die OMPs (Zhong *et al.*, 2013), denn es geleitet die Apoproteine zum BAM-Komplex, der die Integration in die OM durchführt (Chum *et al.*, 2019). Die kleineren Chaperone FkpA und Skp halten die ungefalteten Proteine in Lösung und verhindern eine Aggregation (Chum *et al.*, 2019). DegP, das letzte bekannte Protein, ist eine Protease und für den Abbau von fehlerhaften Proteinen verantwortlich, jedoch konnte auch schon eine Chaperonfunktion festgestellt werden (Sklar *et al.*, 2007; Spiess *et al.*, 1999; Volokhina *et al.*, 2011).

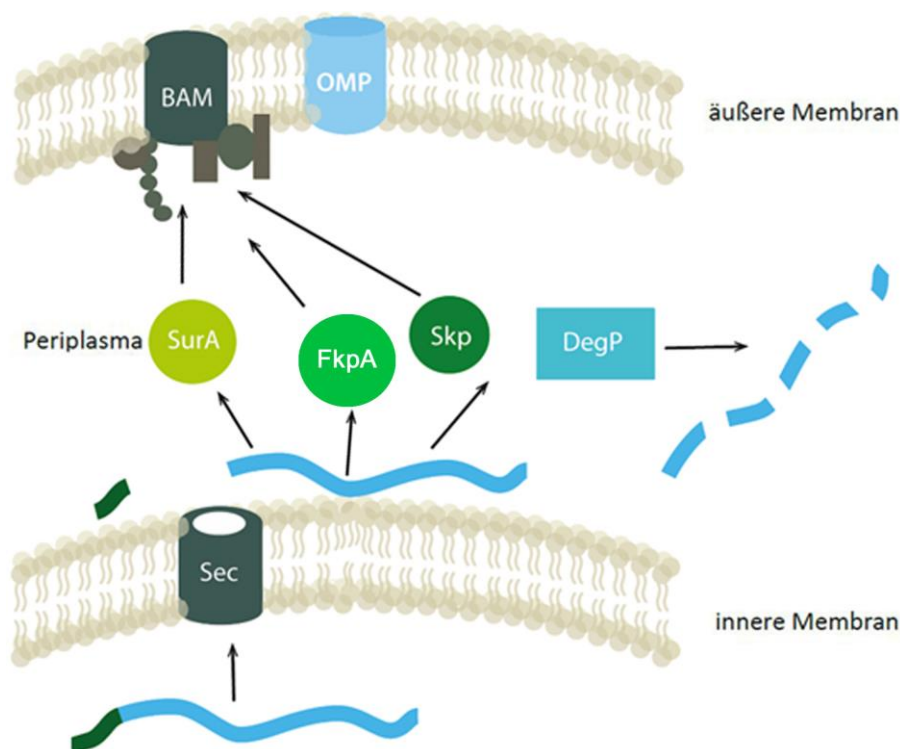


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Integration von OMPs (türkis) in die äußere Membran. Das ungefaltete OMP wird durch das Sec-System durch die innere Membran transportiert. Dort interagieren die Chaperone SurA oder Skp mit der Aminosäurekette, um eine Aggregation oder falsche Faltung zu verhindern. In diesen Fällen wird es von DegP degradiert. Der BAM-Komplex ist für die Integration in die äußere Membran verantwortlich (Abb. verändert nach Sklar *et al.*, 2007).

Auch wenn sich die Funktionen der Proteine unterscheiden, so ist keines der Chaperone essentiell für den Einbau von OMPs (Chum *et al.*, 2019). Einige Arbeiten zeigen ein Zwei-Wege-System auf, bei dem SurA hauptverantwortlich für die OMPs ist und Skp zusammen mit DegP unter zellulären Stressbedingungen in den Vordergrund treten (Redford & Welch, 2006; Sklar *et al.*, 2007).

Die Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase) SurA (engl.: **survival protein A**), ein 47 kDa schweres Protein, ist als primäres Chaperon für die Löslichkeit und die Faltung der Apoproteine verantwortlich. Dieser Mechanismus ist unter den Gram-negativen Bakterien weit verbreitet, wie beispielweise die hoch konservierte Sequenz innerhalb der γ -Proteobacteria und das Vorkommen in α -, β -, δ - und ϵ -Proteobacteria verdeutlicht (Alcock *et al.*, 2008). Die starke Ähnlichkeit zwischen SurA aus *E. coli* und *S. oneidensis*, wie Abbildung 15 zeigt, weist auf eine vergleichbare Funktion in den beiden Organismen hin. SurA trägt zwei Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Domänen. Die PPIase-Domäne I scheint für die Interaktion mit den OMPs zuständig zu sein (Behrens *et al.*, 2001). Diese Domäne erkennt spezifische Peptidsequenzen, welche sich durch einen hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren auszeichnen (Behrens *et al.*, 2001; Bitto & McKay, 2003; Hennecke *et al.*, 2005).

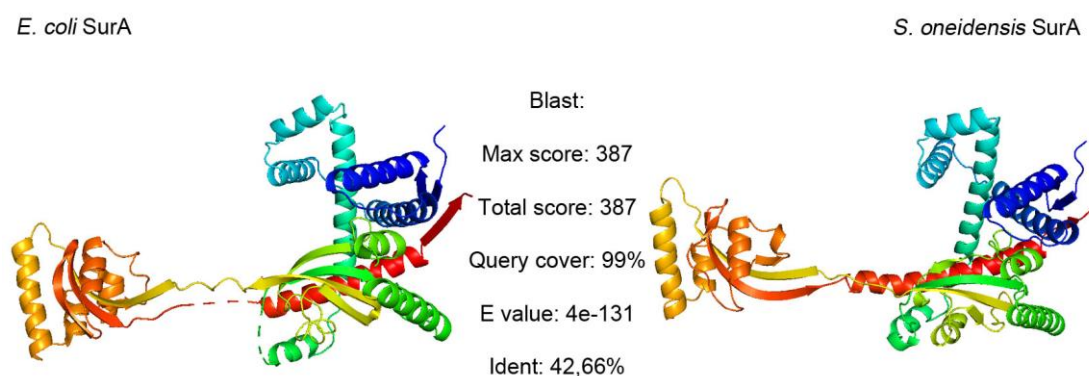


Abbildung 15.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von SurA aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechnete Struktur von SurA aus *S. oneidensis* (rechts) (Xu *et al.*, 2007). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

Die von SurA gebundenen Apoproteine werden durch das Periplasma direkt zum BAM-Komplex geleitet und an diesen übergeben (J. G. Sklar *et al.*, 2007).

Dieser übernimmt die Integration in die OM. Zellen ohne SurA besitzen eine niedrigere Konzentration an OMPs. Zu dieser Gruppe der reduzierten OMPs gehören auch die wichtigsten β -Fass-Proteine OmpA, OmpF und LamB (Behrens-Kneip, 2010; Rouvière & Gross, 1996). Die durch die Deletion von SurA fehlenden OMPs weisen eine Größe von 16 bis 24 β -Faltblättern auf (Heuck *et al.*, 2011). OMPs mit 8 bis 15 β -Faltblätter, scheinen über einen separaten Weg eingebaut zu werden.

Diese weitere Möglichkeit des Einbaus scheint über das Chaperon Skp und die Protease DegP abzulaufen. Skp (engl.: **seventeen kilodalton protein**) ist deutlich kleiner als SurA und ist mit seiner „quallenartigen“ Struktur (Abbildung 16), aus einem Kopf und drei Tentakeln, für OMPs zwischen 18 und 89 kDa zuständig (Qu *et al.*, 2007; Walton & Sousa, 2004).

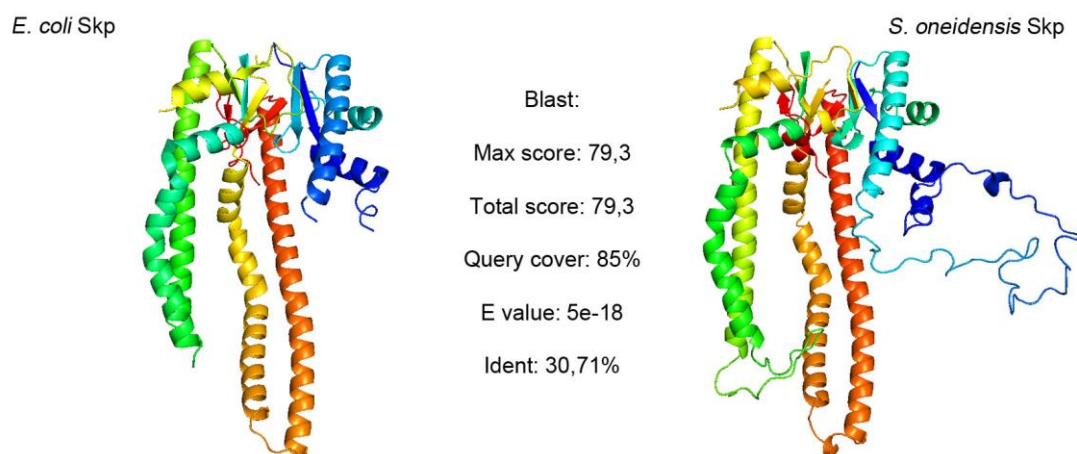


Abbildung 16.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von Skp aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von Skp aus *S. oneidensis* (rechts) (Walton & Sousa, 2004). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

DegP kann in seltenen Fällen ebenfalls eine Chaperonfunktion einnehmen, um Skp zu unterstützen (Spiess *et al.*, 1999). Auch hier erkennen die Chaperone eine C-Terminale Peptidsequenz aus aromatischen Aminosäuren, meist Phenylalanin. Es sind aber auch weitere Varianten, welche Tyrosin, Tryptophan oder Histidin erkennen, bekannt (de Cock *et al.*, 1997). *E. coli* selbst besitzt drei dieser HtrA (engl.: **high temperature requirement**) Proteasen, DegQ, DegS und DegP (Sawa *et al.*, 2011). In *S. oneidensis* wurden nur zwei Gene für diese Proteasen gefunden und mit *degQ* und *degS* benannt. Die größte Ähnlichkeit weist dabei DegQ zu dem in *E. coli* erforschten DegP auf. Wie in Abbildung 17

gezeigt, bilden die Proteasen einen Komplex aus 24 Monomeren, die das OMP komplett umschließen (Sawa *et al.*, 2011).

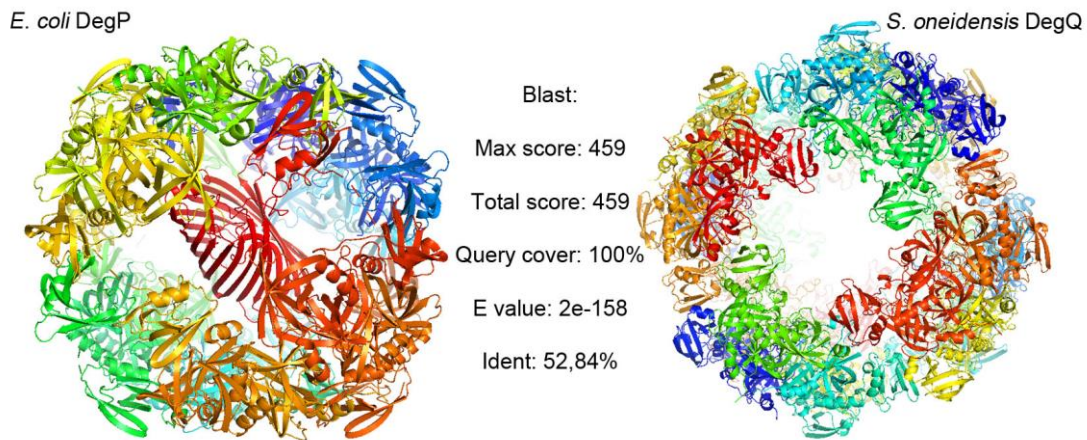


Abbildung 17.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von DegP aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von DegQ aus *S. oneidensis* (rechts) (Krojer *et al.*, 2008). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

Als ein weiteres Chaperon im Periplasma konnte FkpA in *E. coli* identifiziert werden. Die cis/trans peptidyl-prolyl Isomerase (PPIase) steht unter der Kontrolle der σ^E - und Cpx-Stressantwort (Missiakas *et al.*, 1996; Raivio & Silhavy, 1999). Während SurA unter normalen Bedingungen hauptsächlich für die Integration von OMPs verantwortlich ist, übernimmt FkpA bei induziertem Stress eine gleichwertige Rolle (Ge *et al.*, 2014). Es liegt als Homodimer vor, wie in Abbildung 18 dargestellt (Arié *et al.*, 2001).

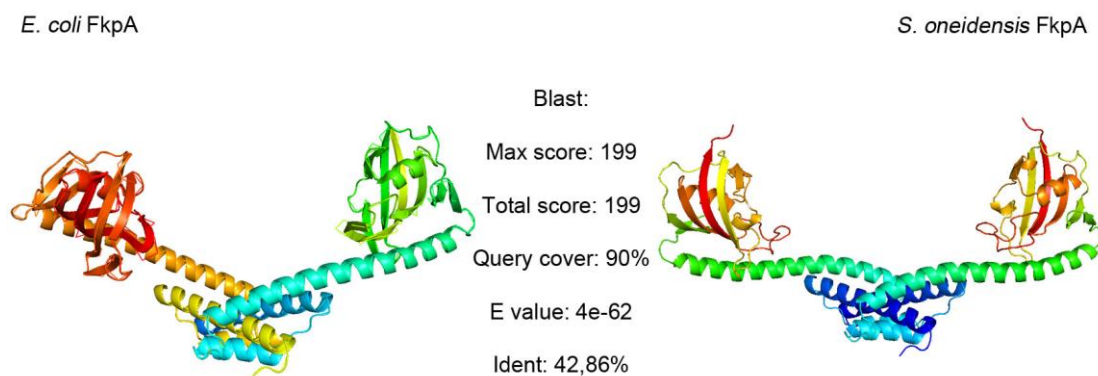


Abbildung 18.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von FkpA aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von FkpA aus *S. oneidensis* (rechts) (Saul *et al.*, 2004). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

Auch wenn die genauen Aufgaben der Chaperone noch nicht vollständig bekannt sind, so lassen die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen in *E. coli* zumindest Hypothesen auf die Integration von OMPs wie MtrB in *S. oneidensis* zu. Die große Ähnlichkeit der einzelnen, beteiligten Proteine aus dem homolog aufgebauten Chaperonnetzwerk für die Translokation der OMPs zum BAM-Komplex unterstreicht dies nochmals.

Für die Integration in die Membran ist der aus fünf Proteinen bestehende sog. BAM-Komplex (engl.: **B**eta-**b**arrel **a**ssembly **m**achine) zuständig. BamA ist als β -Fass-Protein in der äußeren Membran lokalisiert. Die Proteine BamB, BamC, BamD und BamE sind Lipoproteine, welche durch ein N-terminales Cystein an der äußeren Membran verankert und in Richtung Periplasma orientiert sind (Hayashi & Wu, 1990; J. G. Sklar *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005). Die genaue Funktion und die einzelnen Interaktionen der Proteine sind noch nicht vollständig bekannt. Im Folgenden werden die einzelnen Funktionen genauer beschrieben.

BamA:

BamA besteht aus einer C-terminalen β -Fass-Domäne und fünf POTRA-Domänen (engl.: **p**olypeptide **t**ranslocation **a**ssoiated) am N-Terminus (Gentle *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2007; Voulhoux *et al.*, 2003). Es hat 16 β -Faltblätter, welche das Protein in der OM halten (Stegmeier & Andersen, 2006).

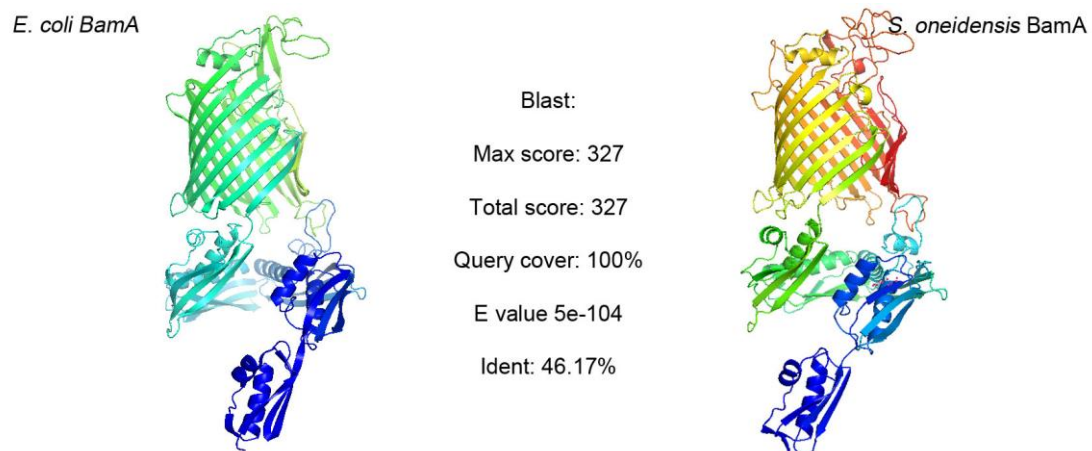


Abbildung 19.: Gegenüberstellung der Kristallstrukturen von BamA aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von BamA aus *S. oneidensis* (rechts) (Albrecht *et al.*, 2014). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

Die PORTRA-Domänen scheinen für die Interaktion mit den Proteinen BamB, -C, -D und -E verantwortlich zu sein und übernehmen chaperonähnliche Funktionen für den Einbau von OMPs (Kim *et al.*, 2007).

BamB:

Von den Lipoproteinen des BAM-Komplexes ist über BamB am meisten bekannt. Die Phänotypen von $\Delta bamB$ - und $\Delta surA$ -Mutanten sind identisch, daher ist von einer Interaktion der Proteinen auszugehen (Ureta *et al.*, 2007). Doch auch hier scheinen mehrere parallele Wege möglich zu sein, da nur eine Doppeldelation für die Zellen letal ist (Onufryk *et al.*, 2005). Einer dieser alternativen Wege benötigt DegP, dessen zusätzliche Deletion ebenfalls zum Zelltod führt (Charlson *et al.*, 2006). Zusammen mit SurA scheint BamB einen relevanten Schritt für den Einbau von β -Fass-Proteinen mit 16 bis 24 β -Faltblättern zu übernehmen. Es wird davon ausgegangen, dass BamB die Substratbindekazapazität des BAM-Komplexes steigert und somit die Aggregation von großen OMPs verhindert werden kann (Heuck *et al.*, 2011).

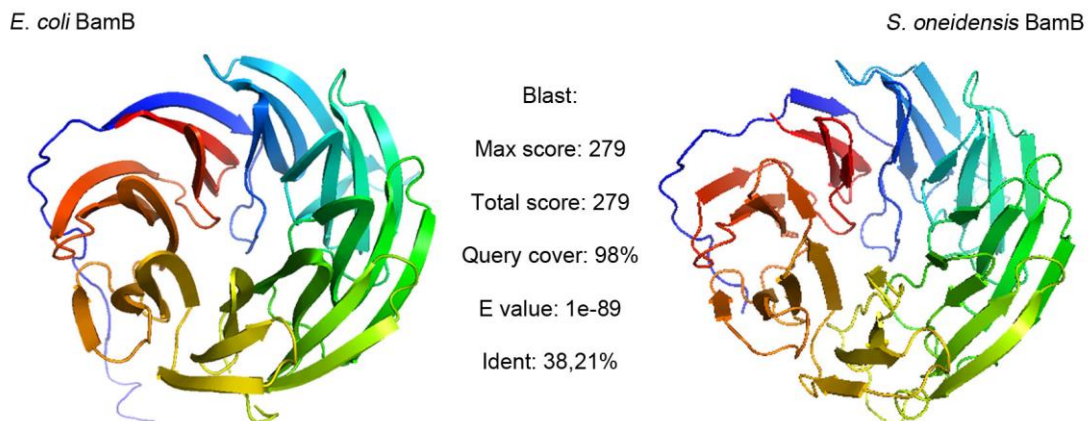


Abbildung 20.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von BamB aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von BamB aus *S. oneidensis* (rechts) (Noinaj *et al.*, 2011). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

BamC:

Im Gegensatz zu dem hoch konservierten N- und C-Terminus weist der Rest des Proteins keine auffällige Struktur auf, weswegen davon ausgegangen wird, dass diese Bereiche für die Interaktion mit den anderen Proteinen des BAM-Komplexes verantwortlich ist (Kim *et al.*, 2011; Knowles, McClelland, *et*

al., 2009). Poren, die zur Permeabilität der Zelle beitragen, scheinen mit der Hilfe von BamC integriert zu werden, da eine Deletion die Anzahl dieser herunter setzt (Hagan *et al.*, 2011). In Abbildung 21 werden die Proteine BamC aus *E. coli* und BamD aus *S. oneidensis* gegenübergestellt, da ein Vergleich der Proteine eine größere Ähnlichkeit aufwies als zu den homolog benannten Proteinen. Dies gilt ebenfalls für BamD aus *E. coli* und BamC aus *S. oneidensis*. Die geringe Ähnlichkeit der beiden Komponenten des BAM-Komplexes könnte bei der Integration von heterolog exprimierten β -Fass-Proteinen zu Komplikationen führen.

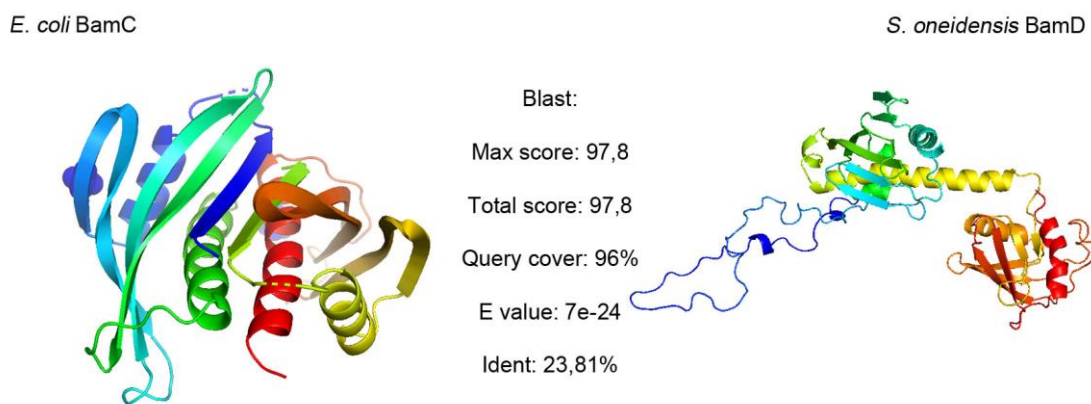


Abbildung 21.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von BamC aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von BamD aus *S. oneidensis* (rechts) (Albrecht & Zeth, 2011). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

BamD:

BamD erkennt die Signalsequenz der β -Fass-Proteine und leitet so die Integration in die Membran ein (Sandoval *et al.*, 2011).

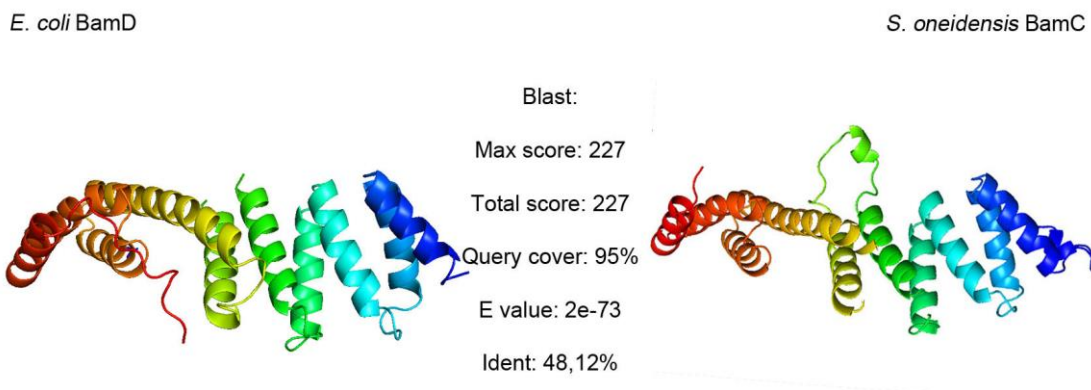


Abbildung 22.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von BamD aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von BamC aus *S. oneidensis* (rechts) (Gu *et al.*, 2016). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Komponenten BamC aus *E. coli* und BamD aus *S. oneidensis*, zeigen die beiden Proteine BamD aus *E. coli* und BamC aus *S. oneidensis* eine deutlich größere Ähnlichkeit auf, wie auch in Abbildung 22 zu erkennen ist.

BamE:

BamE als kleinstes Protein des BAM-Komplexes scheint keine spezielle Aufgabe bei der Integration zu übernehmen, sondern eher eine strukturgebende Funktion für den gesamten Komplex inne zu haben (Sklar *et al.*, 2007). Das errechnete Modell von BamE aus *S. oneidensis* zeigt im Gegensatz zu den BlastP Ergebnissen kaum Vergleichbarkeiten mit BamE aus *E. coli*. Eine genaue Aussage ist damit jedoch nicht zu treffen.

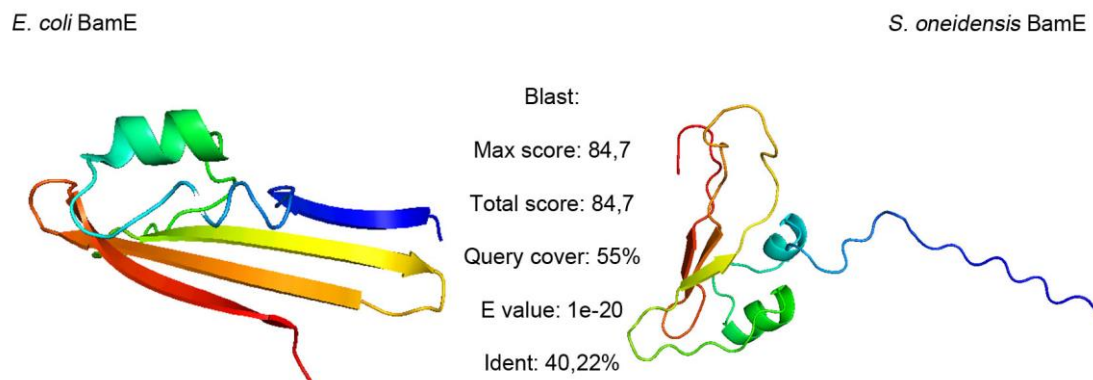


Abbildung 23.: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von BamE aus *E. coli* (links) und der über Swiss-model errechneten Struktur von BamE aus *S. oneidensis* (rechts) (Bakelar *et al.*, 2016). Mittig sind die Werte des BlastP-Ergebnis aufgelistet.

Wie die OMPs durch den BAM-Komplex in die äußere Membran integriert werden ist noch nicht umfassend verstanden. Es existieren dazu verschiedene Modelle. So basiert ein Modell auf der Sekretion der Aminosäurekette durch BamA und anschließendem Einbau des β -Fass-Proteins von der Zelloberfläche in die Membran (Clantin *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu wird auch eine Integration des Proteins von der periplasmatischen Seite der OM diskutiert, wobei die verschiedenen Proteine des BAM-Komplexes die Faltung und Einlagerung durchführen (Kim *et al.*, 2012).

Ähnlich zu der Theorie des Einbaus von außen von Clantin, wird auch einer Hypothese über eine Sekretion des Apoproteins durch einen Hohlraum in der OM, der von drei BamA-Proteinen gebildet wird, nachgegangen (Kim *et al.*, 2012).

Eine weitere, deutlich komplexere Theorie geht davon aus, dass das zu integrierende Protein die eigenen β -Faltblätter in die von BamA einlagert und anschließend seitlich in die Membran übergeht (Kim *et al.*, 2012).

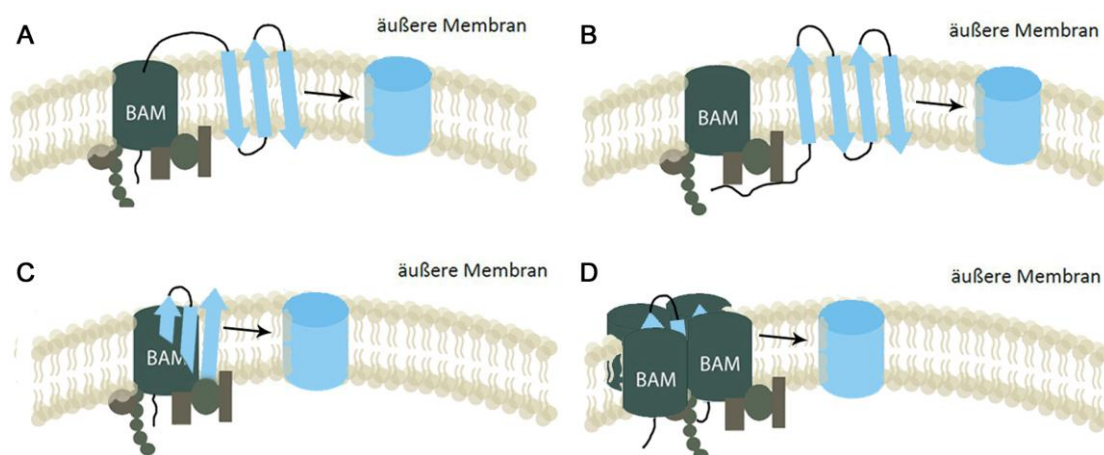


Abbildung 24: Schematische Darstellung der vier Theorien über den Einbau von Membranproteinen (türkis) durch den BAM-Komplex. A: Das einzubauende Protein wird durch das β -Fass-Protein BamA in den extrazellulären Bereich transportiert und von der Zelloberfläche aus in die Membran integriert. B: Die Integration des Membranproteins findet neben dem BAM-Komplex im Periplasma statt. C: Vier BamA Proteine bilden einen Komplex aus dessen Mitte die Membranproteine in die Membran eingebaut werden. D: Zwischen den β -Faltblättern des BamA Proteins integriert das Membranprotein und wird β -Faltblatt für β -Faltblatt in die Membran abgegeben (Abb. verändert nach Kim *et al.*, 2012)

Im Allgemeinen ist sehr wenig über die genaue Funktion des BAM-Komplex bekannt. Dies liegt vor allem an dem hoch komplexen Aufbau aus mehreren Möglichkeiten und den diversen Aufgaben, die durch die OMPs durchgeführt werden. Stehen einzelne Proteine des BAM-Komplexes nicht zur Verfügung, führt dies meist zum Zelltod. Dies verhindert das Ziehen von Rückschlüssen aus Phänotypen von knock-out Mutanten. Es konnte auch gezeigt werden, dass OMPs sich auch ohne den BAM-Komplex selbstständig in die Membran integrieren. Diese Methode führt jedoch nur zu einer sehr geringen Einbaurrate und hat kaum eine relevante Bedeutung für die Zelle (Hagan *et al.*, 2010).

1.4. Zielsetzung

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten neue Aufschlüsse über den Einbau des β -Fass-Proteins MtrB in *S. oneidensis* liefern. Dadurch sollten vertiefte physiologische und mechanistische Erkenntnisse der Funktion und Integration des MtrABC-Komplexes und dessen Rolle bei der extrazellulären Eisenreduktion erlangt werden.

Der Mechanismus zur Integration von MtrB als zentraler Ankerpunkt des Komplexes stand im Fokus, um *E. coli* zur Übertragung von Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren zu befähigen. Durch das Generieren eines solchen Stammes können zwei wichtige Aspekte abgedeckt werden. Zum einen sollte die Minimalausstattung für den EET durch die Übertragung auf *E. coli* ermittelt werden. Diese Erkenntnisse dienen zusätzlich einem besseren Verständnis der Funktion in *S. oneidensis*. Des Weiteren bietet ein solcher Stamm eine breitere Basis zur Nutzung des EET für Biosensoren oder Produktionsstämme in einer MFC, da *E. coli* als einer der am besten erforschten Mikroorganismen einen deutlich besseren Zugang für genetische Veränderungen und Eingriffe in den Metabolismus bietet. Dafür sollten die Interaktionen der dem BAM-Komplex zugehörigen Chaperone SurA, Skp und FkpA bzw. FklB untersucht werden, sowie die Funktionen der periplasmatischen Proteasen DegQ, BepA und YfgC bei der Kontrolle des Einbaus von MtrB. Diese Kontrollmechanismen sollten für die Integration des MtrABC-Komplexes in *E. coli* genutzt werden, um den Ablauf des Integrationsweges in verschiedenen Abschnitten überprüfen zu können. Damit wird ein genauer Vergleich der beiden Organismen *S. oneidensis* und *E. coli* bei der Funktion der Integrationsmechanismen ermöglicht.

Des Weiteren sollte die Funktion von MtrA bei der Integration von MtrB im Zusammenhang mit Chaperonen und Proteasen untersucht werden. All diese Erkenntnisse sollten anschließend auf *E. coli* übertragen werden, um eine erfolgreiche Integration von MtrB zu ermöglichen und so eine extrazelluläre Eisenreduktion für die Zellen zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Enzyme

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

2.2. Verwendete Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeter Stämme.

| Arbeits-Nr. | Stammbezeichnung | relevanter Genotyp | Referenz |
|-------------|--|---|---------------------------------|
| 1 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 | WT | Stammsammlung JG7 |
| 2 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta mtrA$ | $\Delta mtrA$ | Stammsammlung JG52 |
| 3 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta mtrA \Delta degQ$ | $\Delta mtrA \Delta degQ$ | Stammsammlung JG337 |
| 4 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 <i>mtrB_{strep}</i> | <i>mtrB_{strep}</i> | Stammsammlung JG40 |
| 5 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 <i>mtrB_{strep} \Delta mtrA</i> | <i>mtrB_{strep} \Delta mtrA</i> | Stammsammlung JG324 |
| 6 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 <i>mtrB_{strep} \Delta mtrA \Delta degQ</i> | <i>mtrB_{strep} \Delta mtrA \Delta degQ</i> | Stammsammlung JG364 |
| 7 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> pEC86 | pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 8 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrB_{strep}</i> | pBAD <i>mtrB_{strep}</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 9 | <i>E. coli</i> K12 $\Delta degP$ pBAD <i>mtrB_{strep}</i> | $\Delta degP$ pBAD <i>mtrB_{strep}</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 10 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pEC86 | pBAD <i>mtrAB</i> pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |

| Arbeits-Nr. | Stammbezeichnung | relevanter Genotyp | Referenz |
|-------------|---|--|------------------------------|
| 11 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrB</i> | pBAD <i>mtrB</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 12 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>degP</i> pBAD <i>mtrB</i> | Δ <i>degP</i> pBAD <i>mtrB</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 13 | <i>E. coli</i> WM 3064 | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>skp</i> , | JG98 |
| 14 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>surA</i> pBAD <i>mtrB</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>surA</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 15 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>skp</i> pBAD <i>mtrB</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>skp</i> , pBAD <i>mtrB</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 16 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>degPΔ<i>skp</i> pBAD <i>mtrB</i></i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>degPΔ<i>skp</i>, pBAD <i>mtrB</i></i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 17 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>yfgC</i> pBAD <i>mtrB</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>yfgC</i> , pBAD <i>mtrB</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 18 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>ycaL</i> pBAD <i>mtrB</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>ycaL</i> , pBAD <i>mtrB</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 19 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 20 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>surA</i> pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>surA</i> , pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 21 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>degPΔ<i>skp</i> pBAD <i>mtrAB</i>, pEC86</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>degP</i> , Δ <i>skp</i> , pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 22 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>ycaL</i> pBAD <i>mtrAB</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>ycaL</i> , pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 23 | <i>E. coli</i> K12 Δ <i>yfgC</i> pBAD <i>mtrAB</i> | F-, λ -, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, Δ <i>ycaL</i> , pBAD <i>mtrAB</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |

| Arbeits-Nr. | Stammbezeichnung | relevanter Genotyp | Referenz |
|-------------|--|--|---------------------------------|
| 24 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrB</i> pMAL <i>degQ</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrB</i> , pMAL <i>degQ</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 25 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>degQ</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>degQ</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 26 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrB_{strep}</i> pMAL <i>degQ</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrB_{strep}</i> , pMAL <i>degQ</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 27 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> pMAL <i>degQ</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> , pMAL <i>degQ</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 28 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>degQ</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>degQ</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 29 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> pMAL <i>degQ</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> , pMAL <i>degQ</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 30 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrB</i> pMAL <i>yfgC</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrB</i> , pMAL <i>yfgC</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 31 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>yfgC</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>yfgC</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 32 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrB_{strep}</i> pMAL <i>yfgC</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrB_{strep}</i> , pMAL <i>yfgC</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 33 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> pMAL <i>yfgC</i> | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> , pMAL <i>yfgC</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 34 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>yfgC</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>yfgC</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |

| Arbeits-Nr. | Stammbezeichnung | relevanter Genotyp | Referenz |
|-------------|---|---|---------------------------------|
| 35 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> _{strep} pMAL <i>yfgC</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> _{strep} , pMAL <i>yfgC</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 36 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 <i>mtrB</i> _{strep} Δ <i>skp</i> | <i>mtrB</i> _{strep} Δ <i>skp</i> | JG1111 |
| 37 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 <i>mtrB</i> _{strep} Δ <i>surA</i> | <i>mtrB</i> _{strep} Δ <i>surA</i> | JG1104 |
| 38 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>yfgC</i> | Δ <i>yfgC</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 39 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>degQ</i> | Δ <i>degQ</i> | JG1284 |
| 40 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>ycaL</i> | Δ <i>ycaL</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 41 | <i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ <i>degQ</i> Δ <i>ycaL</i> | Δ <i>degQ</i> Δ <i>ycaL</i> | In dieser Arbeit hergestellt |
| 42 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>surA</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>surA</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 43 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>surA fkpA</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>surA</i> <i>fkpA</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |
| 44 | <i>E. coli</i> K12 pBAD <i>mtrAB</i> pMAL <i>skp degQ</i> , pEC86 | F-, λ-, ilvG, rfb-50, rph-1, DSMZ, pBAD <i>mtrAB</i> , pMAL <i>skp</i> <i>degQ</i> , pEC86 | In dieser Arbeit hergestellt |

2.3. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

| Nr. | Plasmid | relevanter Genotyp | Referenz |
|-----|-----------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | pBAD202 | Kan ^R , P _{Ara} , | Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |
| 2 | pBAD <i>mtrB</i> | Kan ^R , P _{Ara} , <i>mtrB</i> | Diese Arbeit |
| 3 | pBAD <i>mtrAB</i> | Kan ^R , P _{Ara} , <i>mtrAB</i> | Diese Arbeit |
| 4 | pBAD <i>mtrB_{strep}</i> | Kan ^R , P _{Ara} , <i>mtrB_{strep}</i> | Diese Arbeit |
| 5 | pBAD <i>mtrAB_{strep}</i> | Kan ^R , P _{Ara} , <i>mtrAB_{strep}</i> | Diese Arbeit |
| 6 | pMAL <i>degQ</i> | Amp ^R , P _{IPTG} , <i>degQ</i> | Diese Arbeit |
| 7 | pMAL <i>yfgC</i> | Amp ^R , P _{IPTG} , <i>yfgC</i> | Diese Arbeit |
| 8 | pMAL <i>skp degQ</i> | Amp ^R , P _{IPTG} , <i>skp degQ</i> | Diese Arbeit |
| 9 | pMAL <i>surA fkpA</i> | Amp ^R , P _{IPTG} , <i>surA fkpA</i> | Diese Arbeit |
| 10 | pMAL <i>surA</i> | Amp ^R , P _{IPTG} , <i>surA</i> | Diese Arbeit |
| 11 | pEC86 | Chl ^R , P _{AHT} | |
| 12 | pMQ | Kan ^R | |

Alle mit dem Plasmid pBAD202 transformierten Stämme wurden anschließend ausschließlich mit 50 µg ml⁻¹ Kanamycin kultiviert. Für die Induktion wurde, wenn nicht anders angegeben 0,1 mM Arabinose verwendet. Stämme mit dem pEC86 (Arslan *et al.*, 1998) Plasmid wurden mit einer Konzentration von 30 µg ml⁻¹ Chloramphenicol kultiviert. Die Genexpression wurde mit 0,2 µg ml⁻¹ Anhydrotetrazyklin (AHT) induziert. Stämme mit dem pMAL202 Plasmid, welches eine Ampizilinresistenz enthält, wurden zusammen mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin kultiviert. Zur Induktion wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0,15 mM zugegeben. Alle Stämme wurden direkt beim Ansetzen der Hauptkultur über Nacht induziert.

2.4. Sterilisation

Für die Sterilisation wurden alle verwendeten Materialien, wie Medien, Spitzen oder Kolben durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min sterilisiert. Bei hitzeempfindlichen Lösungen wurden auf eine Sterilfiltration zurückgegriffen.

2.5. Kultivierung und Anzucht der Stämme

Für die Anzucht vor Versuchen von *S. oneidensis* und *E. coli* in Flüssigkultur wurde LB-Medium (Tabelle 3) genutzt. Die Kulturbedingungen waren im Falle von *E. coli* 37°C und für *S. oneidensis* 30°C bei ständigem Schütteln mit 180 rpm in einem Thermoschüttler (Brunswick, Edison, USA). LB-Kulturplatten, welche für das Animpfen der Vorkulturen genutzt wurden, wurde zusammen mit 2% Agar im Medium autoklaviert. Bei Bedarf wurden sie in der Mikrowelle geschmolzen und unter sterilen Bedingungen bei 60°C in Petrischalen gegossen. Bei Platten mit einem Antibiotikum wurde dies kurz vor dem Gießen bei hinzugegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des LB-Mediums; pH= 7,4.

| Komponente | Menge |
|--------------------|--------------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| ddH ₂ O | add. 1000 ml |

Um die Zellen unter anoxischen Bedingungen zu kultivieren wurde M4-Medium verwendet. Für *S. oneidensis* wurde Lactat als Elektronendonator und Eisencitrat als Elektronenakzeptor verwendet. Da *E. coli* kein Eisencitrat nutzen kann, wurden hier Glycerin und Fumarat genutzt. Zusätzlich wurde für *E. coli* eine Konzentration von 50 mM HEPES genutzt und dem Medium 10 g/l Trypton und 5 g/l Hefeextrakt zugegeben, so wie nach dem Autoklavieren 14,8 µM Thiamin Hydrochlorid (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung des M4-Mediums; pH= 7,2.

| Komponente | Menge |
|-----------------------------------|--------------|
| M4-Salze (10x) | 100 ml |
| Spurenelemente (100x) | 10 ml |
| Magnesiumsulfat-Lösung (1 M) | 1 ml |
| Calciumchlorid-Lösung (0,1 M) | 1 ml |
| Na-D, L-Laktat- (50%) (50 mM) | 11,2 g |
| Eisencitrat | 12,3 g |
| Caseinhydrolysat (Casaminosäuren) | 1 g |
| ddH ₂ O | add. 1000 ml |

Die Zusammensetzung der M4-Salze (10x) Stock ist in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung des M4-Medium-Konzentrats (10x); pH= 7,4.

| Komponente | Menge |
|---|--------------|
| K ₂ HPO ₄ | 2,21 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,99 g |
| HEPES | 14,65 g |
| NaHCO ₃ | 1,68 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 11,89 g |
| NaCl | 87,7 g |
| ddH ₂ O | add. 1000 ml |

Die Zusammensetzung der Spurenelemente sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Spurenelemente 100x; pH= 7,0.

| Komponente | Menge |
|---|--------------|
| CoCl ₂ | 64,9 mg |
| CuSO ₄ *5H ₂ O | 5 mg |
| H ₃ BO ₃ | 350 mg |
| Fe(II)Cl ₂ *4H ₂ O | 107,4 mg |
| Na ₂ EDTA | 2501,5 mg |
| MnSO ₄ *H ₂ O | 22 mg |
| Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O | 94,4 mg |
| Na ₂ SeO ₄ *6H ₂ O | 39,5 mg |
| NaCl | 58,4 mg |
| NiCl ₂ *6H ₂ O | 118,9 mg |
| ZnSO ₄ *7H ₂ O | 28,8 mg |
| ddH ₂ O | add. 1000 ml |

Die durch einen Gummistopfen abgedichtete Flasche mit M4-Medium wurde für eine anaerobe Anzucht der Zellen vor dem Autoklavieren zur Anaerobisierung unter permanentem Schütteln unter einem 2 Minuten Zyklus mit Stickstoff begast und vakuumisiert. Dieser Zyklus wurde mindestens 20 Mal wiederholt.

2.6. Stammkonservierung

Für die Stammkonservierung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen bei -80°C aufbewahrt. Um dabei Schäden durch Kristallisation des Wassers zu verhindern, wurde dem Medium 20% Glycerin zugegeben. Die Zellen wurden in 5 ml LB-Medium über Nacht angezogen, anschließend abzentrifugiert und in 1 ml frischem LB-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7. Fe²⁺ Konzentrationsbestimmung

Die für die Bestimmung der Reduktionsrate von Fe³⁺ relevante Messung der Fe²⁺-Konzentration wurde mit dem Ferrozin-Assay durchgeführt.

Dazu wurden 10 µl der Proben direkt bei der Entnahme 1:10 mit 1 M HCl verdünnt, um eine Oxidation durch Luftsauerstoff zu verhindern. Für die Messung wurde eine 1%ige Ferrozin-Lösung, Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat mit 50% Ammoniumacetat angesetzt. Davon wurden 180 µl zu 20 µl der reinen Probe und den mit 1 M HCl hergestellten Verdünnungen gegeben. Ferrozin bildet mit gelöstem Fe²⁺ einen purpurnen Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 550-600 nm. Mittels einer Eichgeraden und der Messung bei 595 nm konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

2.8. Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung von Plasmiden

Für die Isolation von Plasmiden aus Zellen, wurde eine 5 ml Übernachtskultur auf LB-Medium angesetzt und am nächsten Tag die Plasmide mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt.

2.8.2. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer.

| Nr. | Primername | Sequenz 5' - 3' |
|-----|------------------|--|
| 1 | pBAD_mtrB_for | AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ACCATGAAATTTAACTCAATTTGAT |
| 2 | pBAD_mtrB_rev | CTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACC GTTTTTAGAGTTTGTAACTCATGCTC |
| 3 | pBAD_mtrA_for | AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ACCATGAAGAACTGCCTAAAAAT |
| 4 | pMAL degQ for | TGACGATGACAAGGTACCGGAATTCGGATCATGAAAACGA AATTATCTGT |
| 5 | pMAL degQ rev | CGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGATTAACGAAGC ACTAAGTAAA |
| 6 | pMAL yfgC for | ATGCCGAAAAACGTCGTCAATGGGCATATTGCGTAACTT GACGT |
| 7 | pMAL yfgC rev | CGGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGATTACTTCAGC GCATCC |
| 8 | pMAL degPskp for | AATGCCGAAAAACGTCGTCAATGGGCATAATGAAAAAAA CCACATTAGC |
| 9 | pMAL degPskp rev | GGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGATTATTTAACCTG TTTCAGTAC |
| 10 | fkIB for | GCACTTCACCAACAAGGACCATAGCATATGATGAAATCGA TTTATAAATTATCGTTAGT |
| 11 | fkIB surA rev | CAAAATCCTTGGCACGTTTACTTCTTAGCAGGCTCTG |
| 12 | surA fkIB for | TGCTAAGAAGTAAACGTGCCAAGGATTTTG |

| Nr. | Primername | Sequenz 5' - 3' |
|-----|--------------------------------|---|
| 13 | surA fklB rev | GGCCAGTGCCAAGCTTGCCTGCAGGTCGACTTAACCTCGA TTAGACTCAGG |
| 14 | pMQ delta yfgC up for | GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGAAGACTTATGA GTTAACCTTA |
| 15 | pMQ delta yfgC up rev | ATTATCGGTTAGCAGACGCGTGAGCCAAGAGTGGATCCTT TATTTATTTT |
| 16 | pMQ delta yfgC down for | TCTTGGCTCACGCGT |
| 17 | pMQ delta yfgC down rev | TGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAAATTGCCTG AACAAACATTA |
| 18 | pMQ delts 1137 up for | GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGATGTATGTGCA CCGCATT |
| 19 | pMQ delts 1137 up rev | GCAAGATAAACGAAACCTTACCCTCAAAGGTAGAACTCC CTTTTATCCT |
| 20 | pMQ delts 1137 down for | CTTTTGAGGGTAAGGTTTCG |
| 21 | pMQ delts 1137 down rev | TGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGCGGCTAAGCC AGCTT |
| 22 | test SO_1137 for | TTTACCCACCAAGTGC |
| 23 | test SO_1137 rev | TTCAAGACCGGCAAATGCAT |
| 24 | test skp for | CTTTAAATCTAACTCGGTTG |
| 25 | test skp rev | ATGAATAATACAATCTTGGC |
| 26 | test yfgC for | TTTCCAAAAACACCGGA |
| 27 | test yfgC rev test surA for | AACATCTTTGAATGATGATG CTATTTTGTTCGCAACT |
| 28 | test surA rev | ACATAGGCCAATGGAATA |
| 29 | pBAD Test for | GATTAGCGGATCCTACCTGAC |
| 30 | pBAD Test rev | CTCTCATCCGCCAAAACAGC |
| 31 | pMQ delts 1137 up for | GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGATGTATGTGCA CCGCATT |
| 32 | pMQ delts 1137 up rev | GCAAGATAAACGAAACCTTACCCTCAAAGGTAGAACTCC CTTTTATCCT |
| 33 | pMQ delts 1137 down for | CTTTTGAGGGTAAGGTTTCG |
| 34 | pMQ delts 1137 down rev | TGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGCGGCTAAGCC AGCTT |
| 35 | test SO_1137 for | TTTACCCACCAAGTGC |
| 36 | test SO_1137 rev | TTCAAGACCGGCAAATGCAT |
| 37 | pMQ delta yfgC up for | GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGAAGACTTATGA GTTAACCTTA |
| 38 | pMQ delta yfgC up rev | ATTATCGGTTAGCAGACGCGTGAGCCAAGAGTGGATCCTT TATTTATTTT |
| 39 | pMQ delta yfgC down for | TCTTGGCTCACGCGT |
| 40 | pMQ delta yfgC down rev | TGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAAATTGCCTG AACAAACATTA |

| Nr. | Primername | Sequenz 5' - 3' |
|-----|---------------|----------------------|
| 41 | test yfgC for | TTTCCAAAAACACCGGA |
| 42 | test yfgC rev | AACATCTTTGAATGATGATG |

2.8.3. Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA-Fragmente zu amplifizieren. Mittels Primern wird der zu amplifizierende Bereich flankiert und anschließend vervielfältigt (Mullis *et al.*, 1986). Diese Methode wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um Deletionen von Genen oder Plasmide auf das Ziel-Gen hin zu kontrollieren, sowie für die Herstellung von Inserts für die Klonierung von neuen Plasmiden.

Bei einer analytischen PCR-Reaktion zur Kontrolle von Kolonien wurde der MangoMix® (Bioline, Luckenwalde) genutzt. Für die präparative Amplifizierung für die Herstellung von Plasmiden oder als Vorbereitung für eine Sequenzierung wurde die iProof-Polymerase (BioRad, München) oder die PCRBIO HiFi Polymerease (PCR Biosystems Ltd, London) verwendet. Beide Polymerasen haben eine 3'-5' Exonukleaseaktivität („proof reading“), welche eine Fehlerrate reduziert. Aus diesem Grund wurden diese für die Amplifikationen bei Klonierungen verwendet. Für alle Anwendungen wurde sich an die Angaben des Herstellers gehalten.

Die für alle Anwendungen notwendigen Primer wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen und sind in Tabelle 7 angegeben. Diese wurden für eine Annealing-Temperatur von 55°C designt.

Die PCR wurden in einem Thermo Cycler C1000™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt und das Programm ist in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8.: PCR-Programm für präparative PCR-Reaktionen.

| Schritt | Temperatur | Zeit | Funktion |
|-------------------------------------|------------|----------|------------------------|
| 1 | 95 °C | 2:30 min | Initiale Denaturierung |
| 2 | 95 °C | 30 s | Denaturierung |
| 3 | 55 °C | 30 s | Annealing |
| 4 | 72 °C | 30 s/kb | Elongation |
| 34-malige Wiederholung ab Schritt 2 | | | |
| 5 | 72 °C | 5 min | Finale Elongation |
| 6 | 4 °C | ∞ | Lagerung |

Die durchgeführten PCR-Ansätze wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert und gegebenenfalls isoliert (2.8.4. Agarose-Gelelektrophorese).

2.8.4. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden (Adkins & Burmeister, 1996).

Für die benötigten Gele wurde je nach erwarteten Größen der Fragmente die entsprechende Menge an Agarose in 60 ml 1x TAE-Puffer (Tabelle 9) zugegeben, mittels einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend 0,5 µg/ml Midori green (Nippon Genetics, Düren) zugegeben. Für Fragmente unter 100 bp wurden 2,5% Agarose zugegeben. Bei Fragmenten zwischen 100 bp und 6.000 bp wurde 1% Agarose verwendet. Alle größeren Fragmente wurden über ein 0,5% Gel aufgetrennt. Dies geschah, um die Porengröße des Gels für die jeweiligen Größen zu optimieren und somit das Laufverhalten der DNA nicht zu beeinträchtigen. Verwendet wurde eine Elektrophorese-Apparatur Perfect Blue Mini S (PeqLab, Darmstadt).

Tabelle 9: Zusammensetzung TAE-Puffer.

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

Damit die DNA-Proben in die Taschen des Gels absinken, wurden sie mit 6x Ladepuffer (Tabelle 10) versetzt. Für Proben des MangoMix® dies nicht nötig, da dieser bereits Ladepuffer beinhaltet. Für eine Größenbestimmung der Fragmente wurde ein Größenmarker (1 kb Marker oder 50 bp Marker, Thermo Scientific, Dreieich) in eine separate Tasche gegeben.

Die Aufnahmen der Gele wurden mit der Molecular Imager Chemi Doc™ XRS+, BioRad Laboratories GmbH, München gemacht.

Tabelle 10: 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 |

2.8.5. DNA Kozenstrationsbestimmung

Mittels des Nano Drop (Thermo Scientific, Nano Drop 2000 Spectrophotometer) können die DNA-Konzentration einer Probe ermittelt werden.

Die Absorption der Probe wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wird vom Nano Drop in ng/µl angegeben.

2.8.6. Isothermale *in vitro* Ligation

Die isothermale *in vitro* Ligation nach Gibson (Gibson *et al.*, 2009) ermöglicht die Integration eines Inserts, wie z.B. ein Zielgen in einen Vektor. Mittels PCR und Primer mit Überhang kann dem Zielgen ein flankierender zum Vektor homologer Bereich angefügt werden. Die Überhänge der Primer müssen dafür homolog zu den Enden des linearisierten Vektors sein. Vektor und Insert

wurden in äquimolaren Mengen zugegeben mit einer Endkonzentration von 5 ng/μl. Die T5 Exonuklease baut die Einzelstränge des Doppelstrangs in 5' → 3' Richtung ab, wodurch einzelsträngige Überhänge entstehen. Die flankierenden, homologen Bereiche des Inserts können sich nun mit dem Vektor paaren. Freie einzelsträngige Bereiche werden von der Polymerase zu Doppelsträngen aufgefüllt. Die T4-Ligase verbindet die Backbones der unverknüpften Stränge und schließt somit das Plasmid. Für diese parallel verlaufenden Schritte ist eine Inkubation für 1,5 h bei 50°C notwendig.

Tabelle 11 fasst die Komponenten des Reaktionspuffers (5x) zusammen.

Tabelle 11: 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 |

In Tabelle 12 ist die Zusammensetzung des Reaktionsmastermix der *in vitro* Ligation angegeben.

Tabelle 12: Der verwendete Reaktionsmastermix der *in vitro* Ligation.

| Substanz | Menge |
|-----------------------------|--------|
| Reaktionspuffer (5x) | 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 |

2.8.7. Herstellung von elektrisch kompetenten Zellen

Für die Transformation von Vektoren in Zellen wurde die Elektroporation genutzt. Ein Hochspannungs-Puls (~5 ms, 1,8 kV) depolarisiert kurzzeitig die Membran und ermöglicht so die Aufnahme des Vektors. Dieser Hochspannungs-Puls kann nur unter schlecht leitenden Bedingungen angesetzt werden, da es sonst zu einem Schaden der Zellen führen kann. Dafür wurden die Zellen in salzarmem SOB-Medium (Tabelle 13) vorgezogen. Sobald eine OD von ~0,5 erreicht wurde, wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Die abgekühlten Zellen wurden geerntet und 3x mit eiskaltem, sterilem ddH₂O gewaschen, bevor sie in 500 µl sterilem ddH₂O aufgenommen wurden. Bis zum Einsatz der Zellen wurden sie auf Eis gelagert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des SOB-Mediums.

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

2.8.8. Transformation der elektrisch kompetenten Zellen

Die Transformation wird genutzt, um gezielt Plasmide in Bakterien zu übertragen. Die Elektroporation ist dabei eine einfache und sehr effektive Methode (Hanahan, 1983).

In dieser Arbeit wurde dafür mit dem MicroPulser™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) ein Hochspannungspuls von 1,8 kV für 5 ms erzeugt. Dies führt zu einer Depolarisation der Bakterienmembran und somit zu Poren, durch welche die Plasmide in das Zelleinnere gelangen können. Hierfür wurden ca. 100 - 400 ng des entsprechenden Plasmids zu 90 µl der kompetenten Zellen (siehe Seite 47) gegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (med. grade Polycarbonat; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) gefüllt. Die

Küvette wurde der Hochspannung ausgesetzt und schnellstmöglich mit 500 µl SOC Medium (Tabelle 14) versetzt, um die Zellen im ddH₂O schnell mit Nährstoffen zu versorgen. Die transformierten Zellen im SOC Medium wurden anschließend für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl auf Selektions-Platten ausgestrichen.

Tabelle 14: Zusammensetzung des SOC-Mediums.

| Substanz | Konzentration |
|-----------------------------------|---------------|
| Glucose | 20 mM |
| MgCl ₂ | 20 mM |
| gelöst in SOB-Medium (Tabelle 13) | |

2.8.9. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde genutzt um DNA-Fragmente aus Plasmiden, sowie Zielgene oder Deletionen im Genom auf Fehler zu kontrollieren.

Dazu wurden die Plasmide oder PCR-Produkte von Genomabschnitten isoliert und zusammen mit dem jeweiligen Primer, der den Start der Sequenzierung bestimmt, an GATC Biotech (Konstanz) übergeben. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit der CLC Main Workbench (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.8.10. Konjugation mit *E. coli* WM 3064

Die Konjugation dient der gezielten Übertragung von DNA-Fragmenten in das Genom von Bakterien. Hierbei können Zielgene in das Genom übertragen oder Deletionen durchgeführt werden.

Mittels PCR wurden homologe Sequenzen in einer Länge von ca. 500 bp, flankierend zu der zu deletierenden Zielsequenz amplifiziert und durch die Isothermale in vitro Ligation in das pMQ150 Plasmid eingesetzt. Für die Konjugation wurde der *E. coli* WM 3064 Stamme, wie zuvor beschrieben mittels der Elektroporation mit dem gewünschten pMQ150 Plasmid transformiert. Die

transformierten Zellen wurden auf Selektionsplatten über Nacht kultiviert. Durch die Deletion des *dapA*-Gens ist der *E. coli* WM 3064 auf eine externe Zugabe von 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) angewiesen (Jin *et al.*, 2013). Dieser Stamm ist zur Konjugation befähigt und somit in der Lage bei direktem Kontakt mit *S. oneidensis* den pMQ150 Vektor in die Zellen zu übertragen.

Es wurden über Nacht Kulturen des gewünschten *E. coli* WM 3064, sowie von dem zu konjugierenden *S. oneidensis* Stamm in 5 ml LB angesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von 2-3 wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1 ml LB aufgenommen. Anschließend wurden die beiden Stämme gemischt und auf eine DAP-Platte gegeben. Die Platte wurde bei 30°C als Co-Kultur inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Bakterienrasen mit 1 ml LB von der Platte entfernt und resuspendiert. Es wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 angesetzt und anschließend 100 µl auf Kanamycin 25-Platte ausgestrichen. Die Kanamycinresistenz auf dem pMQ150 ließ auf positive Klone selektieren. Die in den folgenden Schritten nicht mehr benötigten *E. coli* WM 3064 Zellen wurden durch das fehlende DAP nicht weiter kultiviert, da sie ohne das DAP in ihrer Zellwandsynthese gehemmt waren.

In den konjugierten Zellen von *S. oneidensis* kann sich der Vektor über die homologen Bereiche gezielt in das Genom integrieren. Dieser Schritt wird als 1. Cross bezeichnet. Für den darauffolgenden 2. Cross wurden die Zellen für 8 h in 5 ml LB bei 30°C inkubiert. Es wurde kein Antibiotikum zugegeben, um den Selektionsdruck zu nehmen. Dadurch sind die Zellen in der Lage den angelagerten Vektor aus dem Genom zu entfernen, ohne dass dies zum Zelltod führte. Dabei kann der Vektor allein oder zusammen mit angelagertem Bereich des Genoms entfernt werden und so zur Deletion des Gens führen. Die Stämme wurden anschließend in den Verdünnungen von 1:10 1:100 und 1:1000 auf 10% Succhrose-Platten ausgestrichen. Gewachsene Einzelkolonien wurden anschließend auf Succhrose-, Kanamycin- und LB-Platten charakterisiert. Anschließend ist ein Rückschluss des Genotyps auf Grund der Überlebensfähigkeit der Klone auf den einzelnen Platten möglich. Klone, die auf Kanamycin wachsen, tragen noch das Plasmid mit der Antibiotikumsresistenz und sind für die weitere Arbeit uninteressant. Nur Klone,

die den Vektor entfernt haben und somit nicht auf Kanamycin jedoch auf Succhrose und LB wachsen können, wurden weiterverwendet.

Die Succhrose-Platten dienen dabei als zweiter Marker. Das *sacB*-Gen auf dem pMQ150-Vektor schränkt das Wachstum der Zellen auf Succhrose ein. Durch dieses Gen wird eine Polymerisation des Zuckers auf der Zelloberfläche bewirkt, welche die Zellteilung erschwert. Die LB-Platten dienen nicht der Selektion, da alle Zellen auf ihnen wachsen können, sie dienen der Kontrolle, dass sich bis zum Schluss noch Bakterien auf der Spitze befanden und wurden darum immer als letztes ausgestrichen.

Die Deletionen wurden anschließend mittels PCR überprüft und die positiv getesteten Klone im relevanten Genomabschnitt sequenziert.

2.9. Protein-biochemische Methoden

2.9.1. Fraktionierung der Zelle in ihre einzelnen Bestandteile

Die Fraktionierung der Zellen dient dazu die einzelnen Bestandteile wie äußere bzw. innere Membran, Periplasma und Cytoplasma zu separieren.

Nachdem die Stämme unter den für die Versuche relevanten Bedingungen auf eine OD₆₀₀ von 2-3 angezogen wurden, wurden die Zellen geerntet. Dem Zellpellet wurden 20 ml Protein-Puffer (Tabelle 15) zugegeben, um es darin zu resuspendieren. Vor dem Aufbrechen der Zellen wurden der Probe 0,1 mg/ml DNaseI (AppliChem, Darmstadt) zugegeben. Diese baut die genomische DNA ab und verhindert so einen negativen Einfluss auf die Viskosität der Probe. Der Aufbruch der Zellen wurde mit der French-Press (Thermo Fisher Scientific; American Instruments Company, Maryland, USA) bei einem Druck von 1250 psi durchgeführt. Ein Schraubventil ermöglicht die Kontrolle über den Durchlauf der Probe. Der Druckabfall, der ausströmenden Probe führt zum Aufbrechen der Zellen, dabei muss der Druck in der French-Press-Zelle aufrechtgehalten werden. Um die nicht aufgeschlossenen Zellen zu entfernen wurden die Proben bei 6000 g für 10 min und 4°C zentrifugiert (low spin). Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge (Beckman, L8- 70M Ultracentrifuge) bei 4°C für 60 min und bei 45000 rpm mit einem Ti70 Rotor (Beckman coulter, Krefeld) zentrifugiert. Dadurch bildet sich ein Pellet aus der Membranfraktion und die wässrigen Bestandteile aus Periplasma und Cytoplasma bilden den Überstand. Das Pellet wurde in 5 ml Protein-Puffer (Tabelle 15) mit 2% Triton X-100 und 10% (w/v) Glycerin resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Protein-Puffers.

| Substanz | Konzentration |
|----------------|---------------|
| HEPES (pH 7,5) | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |

2.9.2. Proteinbestimmung

Die Methode nach Bradford wurde genutzt, um die Proteinkonzentrationen der Proben zu bestimmen (Bradford, 1976). Durch eine Eichgerade aus Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA) von 0 bis 100 µg/ml konnte die Farbreaktion der Proben mit definierten Werten verglichen werden und so die Proteinkonzentration bestimmt werden. Für die Farbreaktion wurden 20 µl der Probe bzw. der Eichsubstanz mit 180 µl Bradford-Reagenz (Tabelle 16) in einer 96-well-Mikrotiterplatte versetzt. Es wurde immer im Duplikat gemessen und der Mittelwert verwendet. Die Messung wurde mit dem iMark Mikrotiterplatten-Reader (Bio Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Die Farbreaktion von Coomassie-Brilliant-Blue entsteht durch die Bindung an basischen Seitenketten der Aminosäuren. Die führt zur Überführung vom kationischen Zustand in den anionischen und zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm hin zu 595 nm. Dies ermöglicht bei einer Bestimmung der Absorption bei 595 nm, einen Rückschluss auf die Konzentration der Proteine.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Bradfordreagenz.

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

2.9.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vergleichbar mit den Agarose-Gelelektrophorese für DNA, ermöglicht die diskontinuierliche Gelelektrophorese die Auftrennung von Proben nach der Größe der Proteine (LAEMMLI, 1970).

Im Gegensatz zu DNA sind Proteine nicht prinzipiell negativ geladen. Aus diesem Grund wurden den Proben ein Ladepuffer mit Natriumdodecylsulfat

(SDS) zugegeben. Das SDS bewirkt nicht nur eine Entfaltung der Proteine, sondern führt ebenfalls zu einem Einschluss der Proteine mit SDS, welches negativ geladen ist und so eine negative Nettoladung der Proteine herbeiführt. Dies gewährleistet, dass die Proteine nicht auf Grund ihrer Eigenladung aufgetrennt werden, sondern Grund ihrer spezifischen Größe bzw. Laufverhaltens. Jedoch können Disulfidbrücken nicht durch SDS aufgebrochen werden. Um diese Strukturen zu reduzieren wurde β -Mercaptoethanol dazugegeben und die Proben erhitzt.

Die Acrylamid-Gele wurden zuerst 10%ig als Trenngel gegossen und nach dem Erhärten des Gelabschnitts mit einem 4%igen Sammelgel überlagert, in das die Taschen für das Beladen der Proben eingefügt wurden. Dies bietet den Vorteil, dass die Proteine der Probe sich im 4%igen Sammelgel besser anordnen, um sich im folgenden Trenngel genauer aufzutrennen. Zusätzlich herrscht ein pH-Wert von 6,8 im Sammelgel. Das Glycerin liegt dadurch als Zwitterion vor und bewegt sich langsamer durch diesen Gelabschnitt. Zusammen mit den Cl⁻-Ionen, welche vor der Probe laufen, bauen sie einen Spannungsgradienten auf. Dieser bewirkt eine Isotachophorese, bei der auch größere, negativ geladene Proteine bis hin zur Grenzschicht am Trenngel gesammelt werden. Bei dem pH-Wert von 8,8 im Trenngel deprotonieren die Proben und das Glycin verändert seine Ladung. Die kleinere Porengröße und der aufgelöste Spannungsgradient ermöglichen die feine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe.

Die Gele wurden mittels der Mini-Protean® tetra cell Apparatur (Bio-Rad) angefertigt. Die Lösungen für das Trenn- und Sammelgel wurden parallel bis auf TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) angesetzt. Das APS dient zur Polymerisation des Acrylamids und wird durch TEMED als Katalysator dabei unterstützt. Daher dürfen diese Stoffe erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben werden. Nach dem Eingießen des Trenngels (Tabelle 17) wurde es mit Isopropanol überschichtet, um eine einheitliche Oberfläche zu bilden. Vor dem Aufsetzen des Sammelgels wurde das Isopropanol abgenommen und die Reste verdunsten lassen. Mit dem Gießen des Sammelgels (Tabelle 18) wurden auch die Kämme für die Taschen

eingeführt. Die auspolymerisierten, fertigen Gele wurden feucht gehalten, bei 4°C, luftdicht bis zum Einsatz gelagert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenngels.

| Substanz | Menge |
|---|---------|
| 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 18: Zusammensetzung des Sammelgels.

| Substanz | Menge (für ein Gel) |
|---|---------------------|
| 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 |

Mittels des Bradfordassays (siehe Seite 52) wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. 60 µg Protein der Probe wurden mit dem Protein-Puffer (Tabelle 15) auf 50 µl aufgefüllt und 10 µl SDS-Ladepuffer (Tabelle 19) zugegeben. Die Proben wurden, falls nicht anders angegeben, zur Vorbereitung, für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Gele wurden in die vorgesehenen Elektrophoresekammern gespannt und diese mit SDS-Laufpuffer (Tabelle 20) geflutet. Für die Größenbestimmung der einzelnen Banden wurde der BlueStar Protein Marker von NIPPON Genetics Europe verwendet. Die Spannung für das elektrische Feld wurde durch das Power Pac HC Power Supply (BioRad, München) auf 120 V eingestellt. Bei einer angemessenen Auftrennung des Markers wurde das elektrische Feld abgebrochen und die Gele der Apparatur entnommen.

Tabelle 19: Zusammensetzung des 6x-SDS-Ladepuffers.

| 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 |

In Tabelle 20 ist die Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers aufgelistet.

Tabelle 20: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers.

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

2.9.4. Häm-Färbung

Die Häm-Färbung wird zur spezifischen Färbung von Cytochromen in einem SDS-Gel verwendet (Thomas *et al.*, 1976).

Die Eigenschaft der Häm-Cofaktoren H_2O_2 zu reduzieren führt zu einer Übertragung der Elektronen auf 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welches dabei von einer farblosen Leukoform in einen blauen Zustand übergeht. Cytochrome lassen sich so im SDS-Gel als blaue Bande erkennen.

Für diesen Prozess werden die genutzten SDS-Gel 30 min in 12,5% TCA-Lösung inkubiert, dies dient der Fixierung der Proteine im Gel. Eine weitere Inkubation mit ddH₂O wäscht die TCA-Lösung weg. Alle Komponenten aus Tabelle 21 wurden in der angegebenen Reihenfolge auf das Gel gegeben. Das Gel wurde ca. 15 min oder länger in der Lösung gelagert, bis die Färbung ausreichend zu sehen war.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Reaktionslösung zur Häm-Färbung.

| Substanz | Menge |
|-------------------------------------|-------|
| TMB (1 mg/ml) in ddH ₂ O | 9 ml |
| Citratpuffer (pH 6,4) | 1 ml |
| H ₂ O ₂ (35%) | 40 µl |

2.9.5. Western-Blot

Diese Methode ermöglicht es, einzelne Proteine, welche in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen (Burnette, 1981).

Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel wurden hier auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für den Transfer wurde ein elektrisches Feld mit dem Trans-Blot Turbo® System (Bio-Rad) angelegt. Dazu wurden zwei Stapel mit je sieben Filterpapiere im Blotting-Puffer (Tabelle 22) für 15 min eingelegt. Sieben der Filterpapiere wurden mit der Nitrocellulosemembran in die Blotting-Kammer des Trans-Blot Turbo® aufgelegt. Auf die Nitrocellulosemembran wurde das Gel gelegt und mit dem zweiten Stapel Filterpapieren abgedeckt (Abbildung 25). Alle Luftblasen wurden ausgestrichen bevor die Apparatur geschlossen wurde.

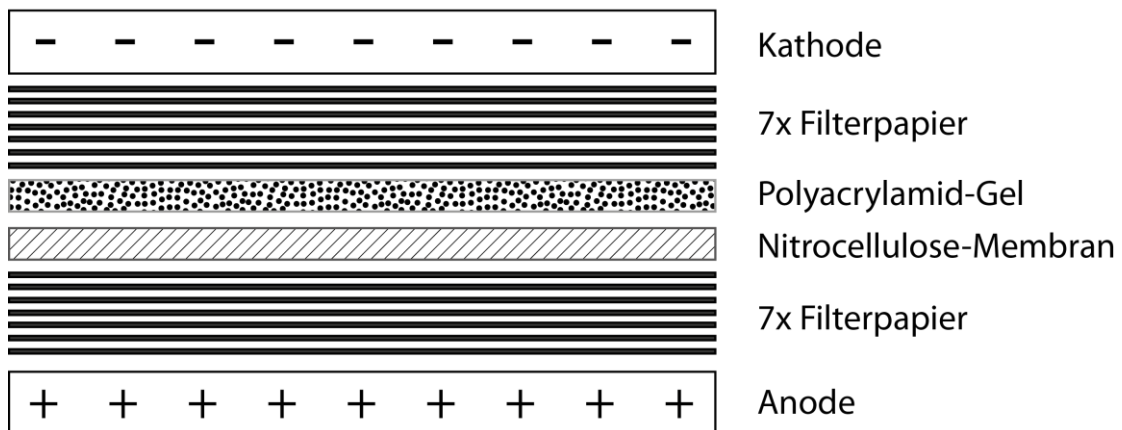


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western-Blots. Von der Anode, auf der Unterseite, stapeln sich sieben Filterpapiere, auf welchen die Nitrocellulose-Membran und darauf das Polyacrylamid-Gel liegen. Als letztes zur Kathode hin sind weitere sieben Filterpapiere aufgesetzt.

Der Transfer wurde bei 1,3 A und 25 V durchgeführt. Die Dauer des Transfers wurde je nach Größe des Zielproteins zwischen 7 und 12 min eingestellt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Blotting-Puffers; pH= 8,7.

| Substanz | Menge (in 1 L) |
|-------------------|----------------|
| TRIS | 40 g |
| Glycin | 20 g |
| Ethanol (95%) | 150 ml |
| Methanol | 50 ml |
| dH ₂ O | add. 1000 ml |

2.9.6. Immunodetektion

Um die spezifische Färbung von einzelnen Zielproteinen zu ermöglichen, wurde die Immunodetektion genutzt. Dafür wurden Antikörper genutzt, welche spezifisch an ausgewählte Antigene des Zielproteins oder einer dem Protein zugefügten Signalsequenz („Tag“) binden.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese in TBS-Puffer (Tabelle 23) gewaschen, für 5 min. Die noch proteinfreien Stellen der Membran wurden mit Blockierlösung (3% Milchpulver in TBS) gesättigt, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Der primäre Antikörper, ein anti-MtrB-Antikörper von der Firma GenScript (USA, New Jersey), wurde 1:2000 verdünnt in 20 ml TBS mit 3% BSA aufgenommen und eine Stunde inkubiert. Das Epitop des Anti-MtrB-Antikörpers erstreckt sich über die Sequenz von Gly²³-Cys⁴⁴. Die Detergenzien Triton-X100 und Tween vermindern die Oberflächenspannung der Lösung und unterstützen so die Waschschrte. Reste der Detergenzien wurden durch einen dritten Waschschrte mit TBS für 10 min entfernt, damit die Bindung des zweiten Antikörpers nicht beeinträchtigt wird. Dieser sekundäre Antikörper war mit einer alkalinen Phosphatase ausgestattet. Für den sekundären Antikörper wurde 3% Milchpulver (in TBS) gelöst und der Antikörper 1:7500 verdünnt. Dieser wurde für eine Stunde auf den Blot gegeben. Anschließend wurde er 4x für 5 min mit TBST (Tabelle 24) und 5x 2 min mit dH₂O gewaschen.

Die Farbreaktion wurde mit dem AP conjugation substrate Kit (Bio-Rad) eingeleitet. Dabei dephosphoryliert die alkalische Phosphatase 5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP), dessen Intermediat durch Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) ein blaues Dimer bildet, welches die Banden auf dem Blot sichtbar macht.

Tabelle 23: Zusammensetzung des TBS-Puffers.

| Substanz | Menge |
|----------|--------|
| TRIS | 10 mM |
| NaCl | 200 mM |

Tabelle 24: Zusammensetzung des TBST-Puffers.

| Substanz | Menge |
|----------|--------|
| TRIS | 10 mM |
| NaCl | 200 mM |
| Tween 20 | 0,05 % |

Tabelle 25: Zusammensetzung des TBSTT-Puffers.

| Substanz | Menge |
|--------------|--------|
| TRIS | 10 mM |
| NaCl | 200 mM |
| Tween 20 | 0,05 % |
| Triton X-100 | 0,2 % |

3 Ergebnisse

3.1. Integrationsmechanismen von MtrB in *S. oneidensis* und *E. coli* in Abhängigkeit von MtrA und maskierter C-terminaler Sequenz

Der MtrABC-Komplex aus *S. oneidensis*, bestehend aus den beiden Cytochromen MtrA und MtrC, sowie der verbindenden Pore MtrB. Er ist in der äußeren Membran lokalisiert und ermöglicht die Übertragung von (respiratorischen) Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren. Für die Integration des Komplexes werden die drei Proteine über das Sec-System in das Periplasma geleitet. Die beiden c-typ Cytochrome MtrA und MtrC werden im Periplasma von den durch die *ccm*-Gene kodierten Proteinen mit den Hämgruppen ausgestattet (Fu *et al.*, 2015). Während der Transport von MtrC über das T2SS an die Zelloberfläche gut erforscht ist, ist der genaue Mechanismus der Integration von MtrA und MtrB noch nicht vollständig bekannt (L. Shi *et al.*, 2008). Es ist davon auszugehen, dass MtrB als β -Fass-Protein durch den BAM-Komplex und die dazugehörigen Chaperone in die äußere Membran eingebaut wird. Ebenfalls scheint eine Interaktion von MtrA mit MtrB stattzufinden ohne die eine Integration der beiden Proteine nicht möglich ist. In der Promotionsarbeit von Simon Stephan konnte gezeigt werden, dass ein Einbau von MtrB in einer *mtrA*-Deletions-Mutante von *S. oneidensis* nicht stattfindet (Stephan, 2015). Zusätzlich wurde die Protease DegQ identifiziert, die für den Abbau von fehlgefaltetem MtrB verantwortlich zu sein scheint. Auf Grund der damaligen Ergebnisse wurde von einer Kontrolle der MtrA und MtrB Interaktion durch DegQ in *S. oneidensis* ausgegangen. In Abwesenheit von MtrA sollte die Protease DegQ den Abbau von MtrB einleiten. Versuche in *E. coli* mit der homologen Protease DegP konnten dies bestätigen (Schicklberger *et al.*, 2011). In diesen Arbeiten wurde eine strep-getaggte Variante von MtrB verwendet. Tags können einen Einfluss auf Proteine und deren Funktionsweise haben. Um eine solche Interferenz auszuschließen wurden die Versuche in dieser Arbeit wiederholt und um eine native, ungetaggte Version von MtrB erweitert.

Die Ergebnisse sollten Aufschlüsse über die Interaktion von MtrA und MtrB sowie die Interaktion von DegQ bzw. DegP mit MtrB liefern. Gleichzeitig sollte auch der Einfluss des Strep-Tags an MtrB überprüft werden, um ein besseres Verständnis über den Kontrollmechanismus der Protease zu erlangen.

3.1.1.1. Einbau von MtrB und MtrB_{strep} in *S. oneidensis* und *E. coli* unter der Kontrolle von DegQ/P

Die Ergebnisse von Simon Stephan (Stephan, 2015) und Schicklberger *et al.* (2011) zeigten eine Interaktion zwischen MtrB und DegQ, bzw. DegP in *E. coli*. Jedoch konnte nicht vollständig davon ausgegangen werden, dass es durch den Strep-Tag am C-Terminus zu keiner Beeinflussung des Integrationsmechanismus kommt. Der C-terminale Bereich eines β -Fass-Proteins ist häufig mit einer Signalsequenz versehen, deren genaue Funktion noch unbekannt ist (de Cock *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu einem Histidin-Tag (His-Tag), bildet ein Strep-Tag eine Sekundärstruktur aus, die im Falle von MtrB eine mögliche Signalsequenz maskieren könnte.

Aufgrund dieser Erkenntnis sollten die beiden Varianten MtrB und MtrB_{strep} in *E. coli* und *S. oneidensis* verglichen werden.

3.1.1.1. Versuchsaufbau

Für diesen Versuch wurden die drei Stämme *S. oneidensis* WT, $-\Delta mtrA$ und $-\Delta mtrA\Delta degQ$ mit einer im Genom lokalisierten strep-getaggen Version von MtrB (im folgenden MtrB_{strep} genannt) erstellt. Die Stämme wurden auf eine OD₆₀₀ 2 angezogen, geerntet und fraktioniert. Die Resuspension der Membranfraktion wurde in Proteinpuffer (2% Triton) durchgeführt. Nach der Proteinbestimmung nach Bradford wurden 30 μ g Protein auf ein 10 % SDS-Gel geladen. Mittels der Immunodetektion und einem MtrB-Antikörper wurde MtrB spezifisch gefärbt, um den Einbau zu überprüfen. Dasselbe wurde mit den

Stämmen *S. oneidensis* WT, $\Delta mtrA$ und $\Delta mtrA\Delta degQ$ mit einem nativen MtrB durchgeführt.

3.1.1.2. Nachweis von MtrB in der Membranfraktion

Durch die Fraktionierung der Proben war es möglich ausschließlich den Membrananteil der Zellen zu untersuchen. Der spezifische Anti-MtrB-Antikörper I ermöglichte eine spezifische Detektion von MtrB in der Probe, um eine Aussage über den Einbau von MtrB in den verschiedenen Stämmen zu erhalten. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 26 dargestellt.

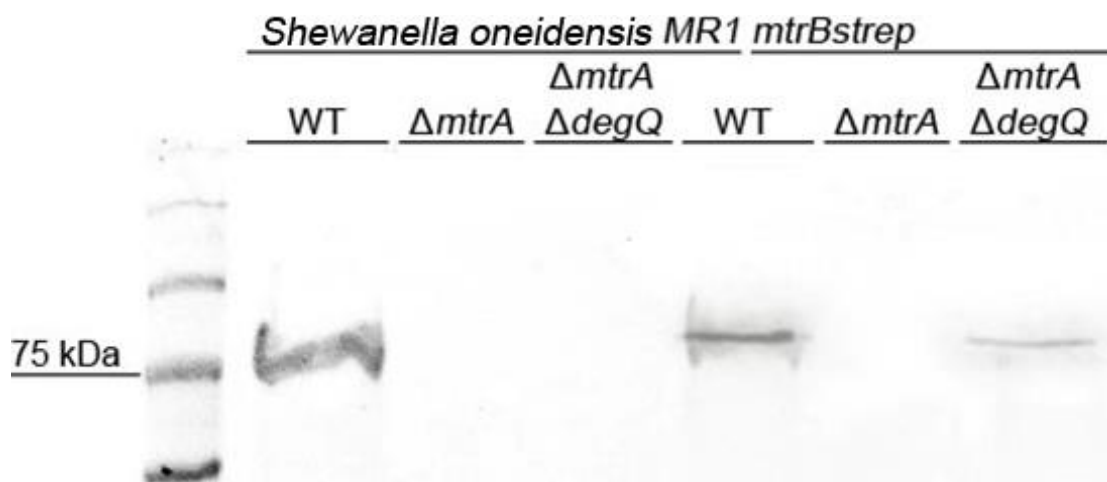


Abbildung 26.: Nachweis von MtrB bzw. dem Strep-getagten MtrB in der Membranschicht nach der Fraktionierung verschiedener *S. oneidensis* Stämme. Die linken drei Spuren enthalten Proben mit nicht modifiziertem, natürlichem MtrB-Gen aus der Fraktionierung von *S. oneidensis*, während die drei Spuren rechts aus *S. oneidensis* Stämmen mit Strep-Tag modifiziertem MtrB stammen. Je MtrB-Version wurde ein WT-Stamm (WT), ein Stamm mit *mtrA*-Deletion ($\Delta mtrA$) und ein Stamm mit Doppeldeletion von *mtrA* und *degQ* ($\Delta mtrA\Delta degQ$) analysiert. Es zeigt sich, dass MtrB sowie MtrB-Strep beim WT Stamm in der Membran vorkommen. MtrB konnte bei beiden *MtrA*-Mutanten nicht nachgewiesen werden. Bei der Doppelmutante konnte kein MtrB, dafür aber MtrB-Strep in der Membranfraktion detektiert werden.

Vergleichend zu den Resultaten von Simon Stephan (Stephan, 2015) ist der Einbau in die Zellmembran von MtrB und MtrB_{strep} im WT reproduzierbar (Spur 1 und 4). Der Einbau in einem $\Delta mtrA$ Stamm ist unabhängig von dem Strep-Tag nicht möglich (Spur 2 und 5). Jedoch scheint die MtrB_{strep} Version im

$\Delta mtrA \Delta degQ$ Stamm in die Membran integriert zu sein (Spur 6) während die native Version abgebaut wurde (Spur 3). Daher liegt es nahe, dass die zusätzliche C-terminale Sequenz des Strep-Tags vor dem Abbau schützt. Die für den Versuche in *E. coli* sollten unter den gleichen Voraussetzungen durchgeführt werden. Da *E. coli* WT weder *mtrA* noch *mtrB* im Genom trägt, wurden diese Stämme mit Hilfe eines pBAD202 Plasmids mit *mtrB* und *mtrAB* versehen. Für die korrekte Faltung der Cytochrome wurden die pBAD202 *mtrA* tragenden Stämme zusätzlich mit den *E. coli* eigenen *ccm*-Genen (Arslan *et al.*, 1998) ausgestattet. Durch die Induktion wird eine höhere Konzentration der kodierten Proteine im Periplasma erreicht, was zu einer verbesserten Integration der Hämgruppen der Cytochrome führt. Die *E. coli* Stämme wurden im Anschluss zur Kultivierung nach dem identischen Protokoll zu den *S. oneidensis* Stämmen behandelt. Die Ergebnisse des MtrB-Nachweises sind in Abbildung 27 zu sehen.

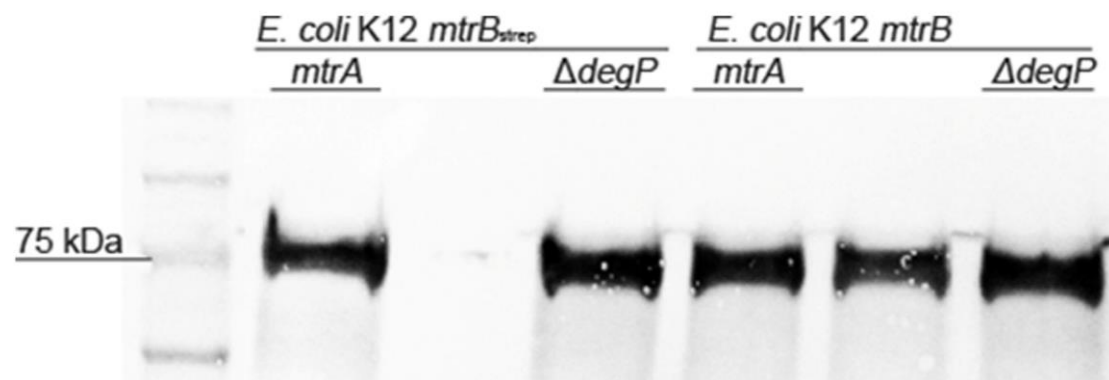


Abbildung 27.: Nachweis von MtrB bzw. dem Strep-getagten MtrB in der Membranfraktion nach der Fraktionierung von *E. coli* pBADmtrAB_{strep} Spur 1, *E. coli* pBADmtrB_{strep} Spur 2, *E. coli* pBADmtrB_{strep} $\Delta degP$ Spur 3, *E. coli* pBADmtrAB Spur 4, *E. coli* pBADmtrB Spur 5, *E. coli* pBADmtrB $\Delta degP$ Spur 6. Bei der Probe in Spur 2 konnte kein MtrB detektiert werden.

Der Detektion von MtrB_{strep}, in die Membran ist in *E. coli* identisch zu *S. oneidensis*. Lediglich MtrB_{strep} ohne MtrA wird abgebaut. Und es scheint als würde DegP (das Homolog zu DegQ) den Abbau durchführen, da eine zusätzliche Deletion von *degP* zur Detektion von MtrB_{strep} führt (Spur 3). Lediglich beim Einbau eines nativen MtrBs sind Unterschiede festzustellen. Während in *S. oneidensis* der Einbau von MtrB ohne MtrA nicht nachweisbar

ist, kann in *E. coli* MtrB auch in den Stämmen $\Delta mtrA$ und $\Delta mtrA\Delta degP$ detektiert werden. Es scheint so als wäre der Abbau von MtrB in *E. coli* vom Strep-Tag und nicht von MtrA abhängig.

3.1.2. Faltung von MtrB in Abhängigkeit von MtrA

Eine besondere Eigenschaft von β -Fass-Proteinen ist ihre stabile Form. Durch die antiparallelen β -Faltblattstrukturen benötigt es mehr Energie diese für die Vorbereitung für ein SDS-Gel vollständig zu denaturieren. Für gewöhnlich werden Proben für ein SDS-Gel vor dem Beladen bei 95°C für 5 min inkubiert. Dies führt zu einer vollständigen Entfaltung der Proteine, bei denen ebenfalls die Disulfidbrücken gebrochen werden. Eine unvollständige Entfaltung bewirkt eine Veränderung des Laufverhaltens von β -Fass-Proteinen in einem SDS-Gel (Burgess *et al.*, 2008).

Bei dieser unvollständigen Entfaltung bleiben bestimmte Epitope des Proteins für Antikörper auf einem Blot verdeckt. So ist es nicht möglich MtrB in einer lediglich bei 37°C behandelten Probe zu detektieren. Jedoch liegen bei 37°C einige Epitope bei einem falsch gefalteten MtrB schon frei (Stephan, 2015). Diese Eigenschaft von β -Fass-Proteinen wurde in folgenden Versuchen genutzt, um die korrekte Faltung von MtrB zu überprüfen.

3.1.2.1. Versuchsaufbau

Um die Proben auf eine mögliche Fehlfaltung von MtrB bzw. MtrB-Strep zu prüfen, wurden die bereits getesteten Proben ein zweites Mal vorbereitet und bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben identisch behandelt und mit einer Immunodetektion mit dem Anti-MtrB-Antikörper I eingefärbt.

3.1.2.2. Faltungsuntersuchung von MtrB in *S. oneidensis* und *E. coli*

Durch die Inkubation der Proben bei 37°C wird das Epitop für den Anti-MtrB-Antikörper I nur in fehlerhaft gefalteten Proteinen frei zugänglich. Durch diese Untersuchung kann der korrekte Einbau von MtrB in die Membran unter verschiedenen Bedingungen getestet werden. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 28 zu sehen.

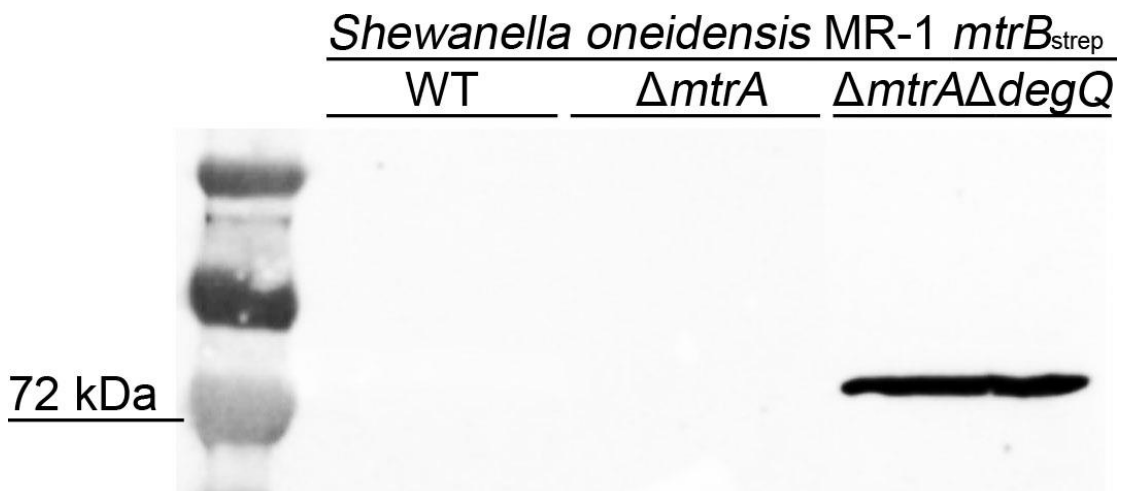


Abbildung 28.: Nachweis von Strep-getagten MtrB in der Membranfraktion nach der Fraktionierung verschiedener *S. oneidensis* Stämme. Die bei 37°C für 5 min inkubierten Proben aus den fraktionierten Stämmen *S. oneidensis* MR-1 *mtrB*_{strep} Spur 1, *S. oneidensis* *mtrB*_{strep} $\Delta mtrA$ Spur 2, *S. oneidensis* *mtrB*_{strep} $\Delta mtrA\Delta degQ$ Spur 3 zeigen in Spur 3 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei den anderen Proben konnte kein MtrB detektiert werden.

Das Signal für MtrB_{strep} bei dem $\Delta mtrA$ Stamm ist wie erwartet nicht zu sehen. Die Bande des WT, welche bei einer Behandlung bei 95°C zu sehen war, ist durch die geringere Inkubationstemperatur nicht mehr zu detektieren. Es ist lediglich eine Bande beim $\Delta mtrA\Delta degQ$ Stamm zu sehen. Dies lässt auf eine Fehlfaltung von MtrB_{strep} schließen, bei der das Epitop schon frei zugänglich für den Antikörper ist. Aus diesem Grund kann von einer fehlerhaften Faltung von MtrB ohne MtrA ausgegangen werden und die zusätzliche Deletion von *degQ* verhindert den Abbau von MtrB. So lässt sich auch eine fehlerhafte Version von MtrB in die Membran integrieren.

Für die Integration des MtrABC-Komplexes in die äußere *E. coli* Membran ist eine korrekte Form von MtrB für die Funktion essenziell. Aus diesem Grund wurde die Faltung in *E. coli* ebenfalls in Bezug auf die 37°C-Bande kontrolliert.

Die Proben wurden identisch behandelt, geblottet und in Abbildung 29 dargestellt.

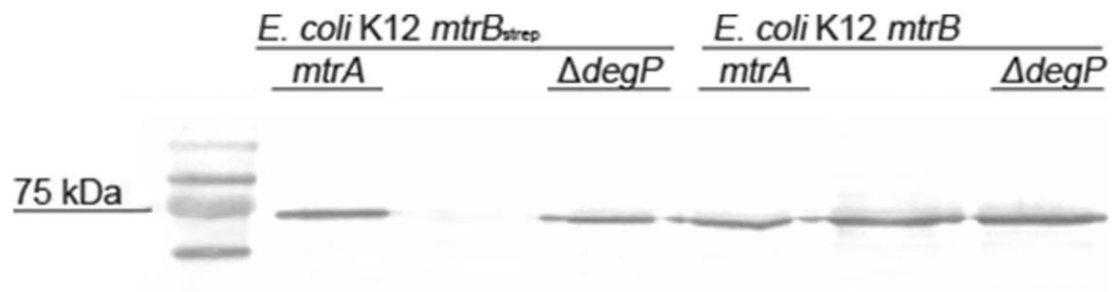


Abbildung 29.: Nachweis von MtrB bzw. dem Strep-getagten MtrB in der Membranfraktion nach der Fraktionierung verschiedener *E. coli* Stämme. Die bei 37°C für 5 min inkubierten Proben aus den fraktionierten Stämmen pBADmtrA_{strep} Spur 1, *E. coli* pBADmtrB_{strep} Spur 2, *E. coli* pBADmtrB_{strep} $\Delta degP$ Spur 3, *E. coli* pBADmtrAB Spur 4, *E. coli* pBADmtrB Spur 5, *E. coli* pBADmtrB $\Delta degP$ Spur 6 zeigen in Spur 1, -3, -4, -5 und -6 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei der Probe in Spur 2 konnte kein MtrB detektiert werden.

Im Gegensatz zu *S. oneidensis* ist es in *E. coli* in allen bis auf einen Stamm möglich eine 37°C Bande zu detektieren. Lediglich die Integration eines MtrB_{strep} allein ist nicht möglich und weist weder eine Bande bei 37°C noch bei 95°C auf. Es ist davon auszugehen, dass *E. coli* nicht in der Lage ist MtrB korrekt zu falten. Jedoch scheint es auch keinen Kontrollmechanismus für den Abbau von fehlerhaften OMPs zu haben, der auf MtrB reagiert. Auch wenn mit diesen Ergebnissen kein Rückschluss auf den genauen Einbauweg genommen werden kann, ist zu beobachten, dass der Einbau von MtrB in *E. coli* und *S. oneidensis* unter diesen Bedingungen unterschiedlich abläuft.

3.2. Untersuchung der Chaperone und Proteasen des BAM-Komplexes in *S. oneidensis* für die Integration von MtrB

Auf Grundlage der vorherigen Erkenntnisse in *E. coli* und *S. oneidensis* lässt sich vermuten, dass der Einbau von MtrB in den beiden Organismen unterschiedlichen Mechanismen unterliegt. Für die Faltung und Integration solcher Proteine wurden verschiedene Protein-Komplexe identifiziert (Ricci & Silhavy, 2019). Für die Integration von Proteinen der äußeren Membran sind bis dato drei Systeme bekannt. Dabei baut das Lol-System Lipoproteine an die Oberflächen der inneren und äußeren Membran in Richtung des Periplasmas ein (Calmettes *et al.*, 2015). Für β -Fass-Protein sind zwei Systeme verantwortlich. Der TAM-Komplex integriert für gewöhnlich Autotransporter und Porine (Heinz *et al.*, 2015). Auf Grundlage dieser Literatur ist anzunehmen, dass MtrB über den BAM-Komplex integriert wird. Nach der Translokation der Apoproteine in das Periplasma, werden diese von Chaperonen (SurA, FkpA, Skp und der Protease DegP) gebunden und an den BAM-Komplex geleitet. Dort werden die OMPs in die Membran integriert. Die nähere Funktion der Chaperone ist jedoch bisher nicht vollkommen aufgedeckt. Neuere Indizien deuten jedoch darauf hin, dass die falsch gefalteten Versionen von MtrB auf fehlerhafte Interaktionen der Chaperone zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden verschiedene Deletionsmutanten von *S. oneidensis* auf die Integration und die Funktion von MtrB hin untersucht.

Die Versuchsreihe sollte die für die Integration entscheidenden Chaperone und Proteasen identifizieren, wobei die Faltung und Integration von MtrB in der äußeren Membran mittels eines Western-Blots kontrolliert wurde.

3.2.1. Untersuchung eines Faltungsdefizits in Deletionsmutanten des BAM-Komplexes von *S. oneidensis* und *E. coli*

Durch die Versuche im vorhergehenden Abschnitt konnte nachgewiesen werden, dass der Einbau von MtrB in die Zellmembran davon abhängt, ob es einen Strep-Tag besitzt oder nicht bzw. ob es korrekt gefaltet wurde. Außerdem

wurde ein klarer Unterschied bei der posttranslationalen Modifikation zwischen *S. oneidensis* und *E. coli* ersichtlich. *E. coli* ist hier nicht in der Lage MtrB korrekt zu falten. Die genauen Mechanismen, die den Unterschieden in den zwei Organismen zugrunde liegen, sind dabei nicht erkennbar.

Die folgende Versuchsreihe sollte diese Unklarheiten beantworten. Durch die gezielte Deletion der verschiedenen Gene sollten mögliche Interaktionspartner für den Einbau von MtrB identifiziert werden.

3.2.1.1. Versuchsaufbau

Zur Durchführung wurden verschiedene Deletionsmutanten erstellt. Neben der Deletion der Chaperone des BAM-Komplexes *surA* und *skp*, wurden ebenfalls die Proteasen *degQ*, *yfgC* und das *E. coli*-Protease-Homolog zu *ycaL* aus *S. oneidensis* (SO_1137) deletiert. Dazu wurden dem pMQ150 Plasmid flankierende 500 bp Fragmente des zu deletierenden Bereiches im Genom beigefügt und in einen *E. coli* WM 3064 Stamm transformiert. Über die Konjugation und den anschließenden 2. Cross wurden die Deletionen eingefügt. Die Deletions-Stämme wurden über Nacht auf eine Zelldichte von 2-3 angezogen und am nächsten Tag für die Fraktionierung geerntet. Jeweils zwei Proben wurden für die anschließende SDS-Gelelektrophorese vorbereitet, wobei die eine Probe bei 37°C und die andere bei 95° für je 5 min inkubiert wurde. Nach erfolgreicher Elektrophorese und Western-Blot wurde mittels Anti-MtrB-Antikörper I die MtrB-Fraktion spezifisch eingefärbt.

3.2.1.2. Kontrolle der Interaktionspartner von MtrB

Durch die Untersuchung der Proben mittels Westernblot lassen sich Rückschlüsse über den Einbau, die Lokalisation und den Zustand der Faltung von MtrB in den einzelnen Deletionsmutanten treffen. Die Ergebnisse dieses Nachweises sind in folgender Abbildung 30 zu sehen.

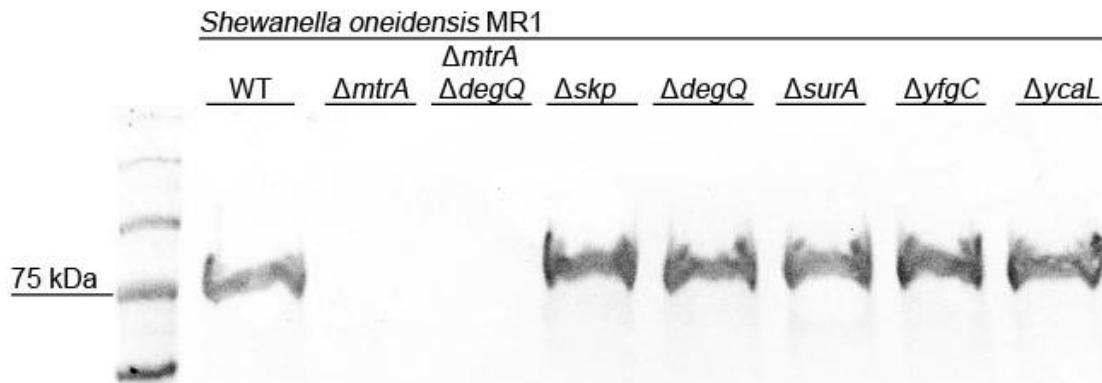


Abbildung 30.: Nachweis von MtrB in verschiedenen Deletionsmutanten von *S. oneidensis* aus Proben der Membranfraktion, die bei 95°C inkubiert wurden. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *S. oneidensis* MR-1 Spur 1, *S. oneidensis* $\Delta mtrA$ Spur 2, *S. oneidensis* $\Delta mtrA\Delta degQ$ Spur 3, *S. oneidensis* Δskp Spur 4, *S. oneidensis* $\Delta degQ$ Spur 5, *S. oneidensis* $\Delta surA$ Spur 6, *S. oneidensis* $\Delta yfgC$ Spur 7, *S. oneidensis* $\Delta ycaL$ Spur 8 zeigen bis auf Spur 2 und Spur 3 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei den Proben der $\Delta mtrA$ Stämme konnte kein MtrB detektiert werden.

In allen Proben, bis auf die Stämme ohne *mtrA* (Spur 2 und -3), konnte MtrB spezifisch detektiert werden. Lediglich die 37°C Proben (nicht gezeigt) ergaben kein Signal. Entgegen der Hypothese ist keines dieser Proteine essenziell für die MtrB Integration in die äußere Membran. Die Blot-Ergebnisse zeigen, dass weder eine Deletion zum Abbau von MtrB führt noch zu einer Fehlfaltung. Dies lässt darauf schließen, dass der Faltungsprozess bzw. Einbaumechanismus von MtrB unabhängig von einem einzelnen Chaperon ist. Es ist naheliegend, dass unbekannte Faktoren für die Integration verantwortlich sind und Defizite durch Deletionen von beteiligten Genen durch parallel aktive Integrationswege kompensiert werden können.

Die vorherigen Ergebnisse aus *E. coli*, konnten im Vergleich zu denen aus *S. oneidensis* zeigen, dass sich der Einbau von MtrB in den beiden Organismen, trotz der nahen Verwandtschaft, unterscheidet. Für ein besseres Verständnis des Ablaufs der Integration von MtrB in *E. coli* wurden verschiedene Deletionsmutanten von *E. coli* mit verschiedenen Versionen von *mtrB* zusammen mit *mtrA* und pEC86 getestet, um die für den Einbau in *E. coli* verantwortlichen Proteine zu identifizieren (Abbildung 31).

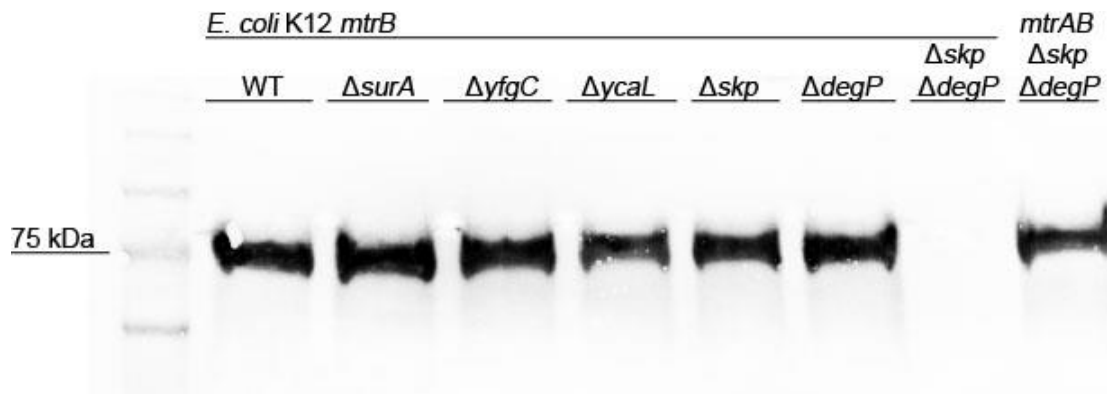


Abbildung 31.: Nachweis von MtrB in verschiedenen Deletionsmutanten von *E. coli* aus Proben der Membranfraktion, die bei 37°C inkubiert wurden. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* K12 *pBADmtrB* Spur 1, *E. coli* Δ *surA pBADmtrB* Spur 2, *E. coli* Δ *yfgC pBADmtrB* Spur 3, *E. coli* Δ *ycaL pBADmtrB* Spur 4, *E. coli* Δ *skp pBADmtrB* Spur 5, *E. coli* Δ *degP pBADmtrB* Spur 6, *E. coli* Δ *skp Δ *degP pBADmtrB* Spur 7, *E. coli* Δ *skp Δ *degP pBADmtrAB pEC86* Spur 8 zeigen bis auf Spur 7 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei der Probe des *E. coli* Δ *skp Δ *degP pBADmtrB* Stammes konnte kein MtrB detektiert werden.***

In Abbildung 31 sind lediglich die bei 37°C behandelten Proben abgebildet, da die bei 95°C behandelten Proben keinen Unterschied in den Ergebnissen erbracht haben. Der Einbau von MtrB ist in allen Deletionsmutanten von *E. coli* möglich. Lediglich der Δ *skp Δ *degQ* Stamm konnte kein MtrB in die Membran integrieren. In Spur 8 war es jedoch möglich MtrB in einem *E. coli* Δ *skp Δ *degQ pBAD mtrAB pEC86* zu detektieren. Dies zeigt, dass die Integration von MtrB von einem der drei Proteine Skp (Spur 6), DegP (Spur 5) oder MtrA (Spur 8) abhängig ist. Erst wenn alle drei Proteine nicht vorhanden sind (Spur 7) ist eine Integration nicht mehr möglich.**

Alle Proben wurden zusätzlich bei 37°C inkubiert und ergaben dasselbe Bandenmuster wie die 95°C inkubierten Proben. Dies zeigt, dass die Faltung von MtrB in *E. coli* nicht wie in *S. oneidensis* funktioniert.

3.2.2. Untersuchung der Funktionalität von MtrB in den verschiedenen Deletionsmutanten von *S. oneidensis*

Da über eine Detektion von MtrB in der richtigen Fraktion der Zellbestandteile keine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Proteins getroffen werden kann, wurden die Deletionsmutanten von *S. oneidensis* auf ihre Eisenreduktionsrate

überprüft. Diese Versuche konnten mit *E. coli* nicht durchgeführt werden, da den Zellen selbst bei einem korrekt eingebauten MtrABC-Komplex noch die Mechanismen zur Übertragung der Elektronen aus dem Menaquinonpool in das Periplasma sowie die Elemente für den Transport durch das Periplasma fehlen.

3.2.2.1. Versuchsaufbau

Da Fe^{3+} nicht membrangängig ist und durch den MtrABC-Komplex von *S. oneidensis* an der Zelloberfläche reduziert werden kann, wurde dieser TEA für einen Zellsuspensions Assay (engl. Cell Suspension Assay, CSA) gewählt. Eine Vorkultur wurde angezogen, die anschließend in M4 Medium mit Lactat und Fumarat überführt wurde. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 2-3 geerntet und gewaschen. Die einzelnen Stämme wurden anschließend in Protein-Puffer aufgenommen und in ein Anaerobenzelt eingeschleust. Unter anoxischen Bedingungen wurden 96-deep-well-plats mit 1 ml M4 Lactat Eisencitrat Medium auf eine OD_{600} von 1 angeimpft. Stündlich wurden 10 μl der Kultur zur Probeentnahme in 90 μl 1 M HCL überführt, um die weitere Reduktion des Fe^{2+} abzustoppen. Um die Reduktionsrate zu bestimmen, wurden die Proben mittels Ferrozin auf die Eisenkonzentration getestet und die Ergebnisse gegen die Zeit aufgetragen.

3.2.2.2. Kontrolle der Funktionalität

Die Reduktionsrate von Fe^{2+} steht im direkten Zusammenhang mit der Funktionalität des MtrABC-Komplexes. Eine Deletion eines essenziellen Teils für die Integration des Komplexes führt zu einer verringerten Reduktionsrate. Dies würde eine Identifizierung der beteiligten Proteine ermöglichen. Zunächst wurde der Einfluss des Strep-Tags auf die Funktion von MtrB überprüft. Dazu wurde der WT-Stamm zusammen mit einem Stamm, der eine genomisch getaggte Version von *mtrB* trägt, verglichen. Zusätzlich wurden die beiden Versionen mit einer weiteren Deletion von *degQ* ausgestattet. Dies diente zur

Überprüfung einer möglichen Wechselwirkung von DegQ mit dem Strep-Tag an MtrB. Die Eisenreduktion wurde gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 32).

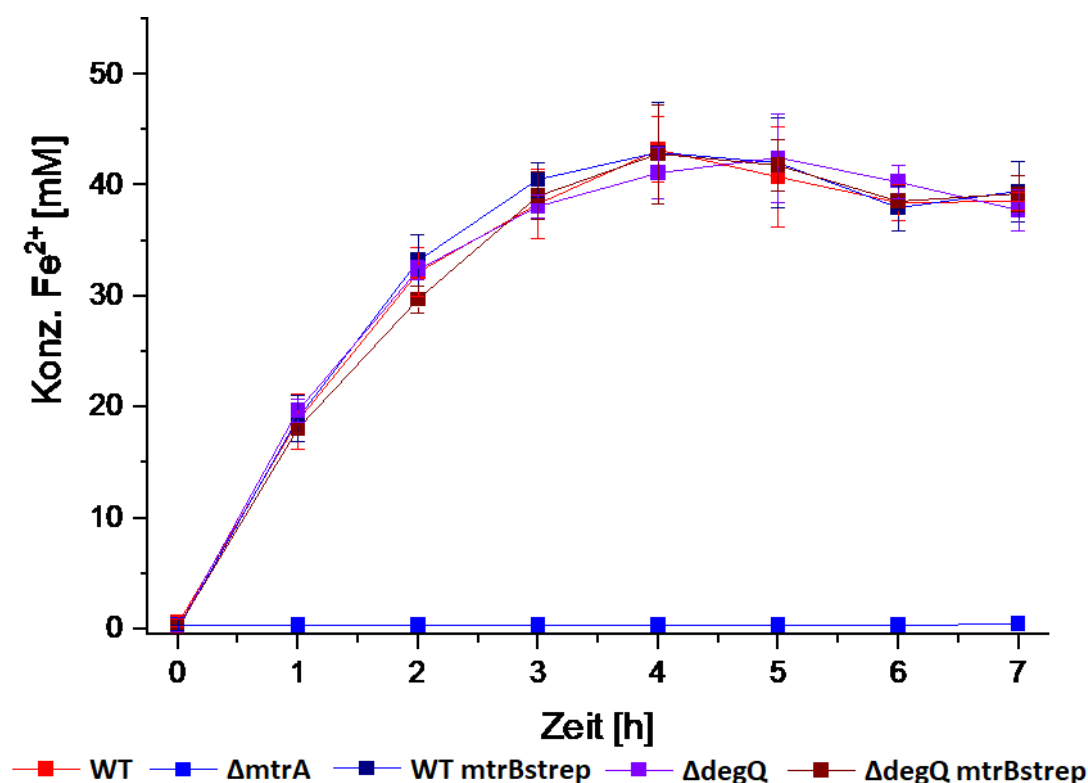


Abbildung 32.: Reduktionsrate von Fe³⁺ über 7 Stunden. Der Verlauf der Reduktion ist bei allen untersuchten *S. oneidensis* Stämmen gleich. Abgebildet sind die Verläufe der Stämme *S. oneidensis* MR-1 (rot), *S. oneidensis* mtrB_{strep} (dunkelblau), *S. oneidensis* ΔdegQ (violett), *S. oneidensis* mtrB_{strep} ΔdegQ (dunkelrot) und *S. oneidensis* ΔmtrA (hellblau) als Negativkontrolle.

Der *S. oneidensis* ΔmtrA Stamm diente als Negativkontrolle, da eine Reduktion von Fe²⁺ ohne MtrA nicht möglich ist.

Unabhängig vom Stamm verlaufen die Kurven sehr ähnlich. Dies lässt darauf schließen, dass die Veränderungen im Genom keinen Einfluss auf die Funktion des MtrABC-Komplexes besitzen. Da auch der WT keine signifikant bessere Reduktionsrate aufweist.

Aus diesem Grund wurden weitere Deletionsmutanten getestet. In diesem Durchgang wurden die Chaperone *skp* und *surA* deletiert. Damit sollten jeweils die beiden Wege zum BAM-Komplex unterbrochen werden. Der Kurvenverlauf ist in folgender Abbildung 33 abgebildet.

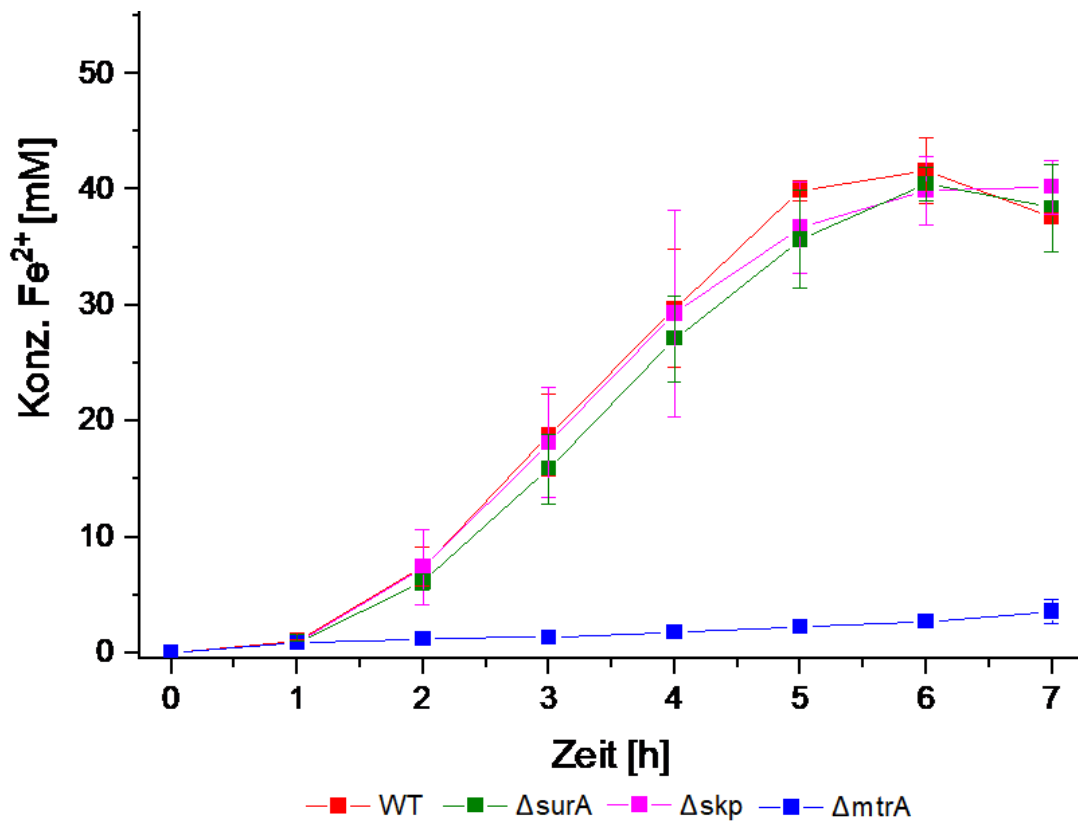


Abbildung 33.: Reduktionsrate von Fe^{3+} über 7 Stunden. Der Verlauf der Reduktion ist bei allen untersuchten *S. oneidensis* Stämmen gleich. Abgebildet sind die Verläufe der Stämme *S. oneidensis* MR-1 (rot), *S. oneidensis* Δ skp (pink), *S. oneidensis* Δ surA (grün) und *S. oneidensis* Δ mtrA (blau) als Negativkontrolle.

Auch die Deletionen der beiden Chaperone scheint kein Einfluss auf die Integration von MtrB bzw. auf die Funktion des Proteins zu haben. Bis auf den Δ mtrA Stamm, der als Negativ-Kontrolle diente, verläuft die Reduktion des Fe^{3+} vergleichbar zum WT.

Zur weiteren Kontrolle wurden noch die Deletionsstämme der Proteasen auf die Funktion überprüft. Dazu wurden die Gene der Proteasen DegQ, YfgC, YcaL und YcaL in Kombination mit DegQ deletiert. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 34 zu sehen.

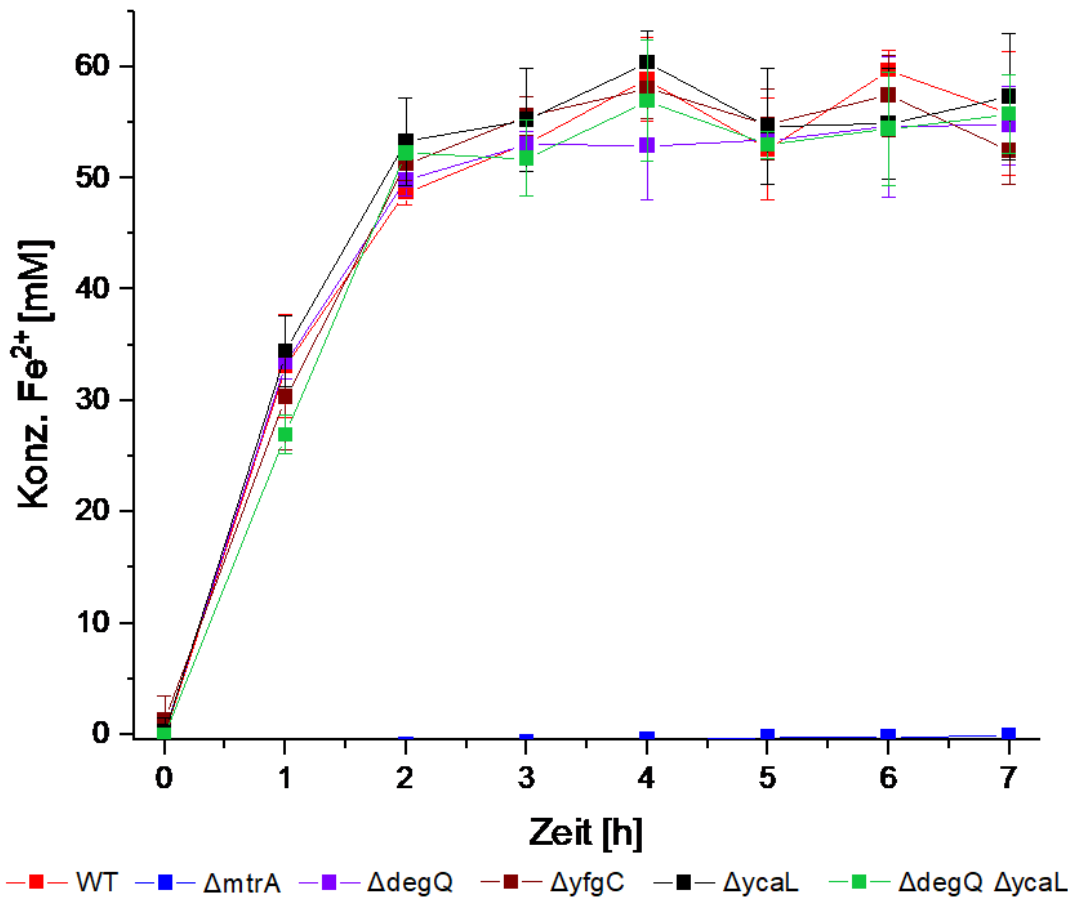


Abbildung 34.: Reduktionsrate von Fe²⁺ in Deletionsmutanten verschiedener Proteasen in *S. oneidensis* über 7 Stunden. Abgebildet sind die Verläufe der Stämme *S. oneidensis* MR-1 (rot), *S. oneidensis* ΔdegQ (violett), *S. oneidensis* ΔyfgC (dunkelrot), *S. oneidensis* ΔycaL (schwarz), *S. oneidensis* ΔdegQΔycaL (grün) und *S. oneidensis* ΔmtrA (blau) als Negativkontrolle.

Wie bereits aufgrund von Abb. 30 erwartet, zeigt die Deletion von DegQ keinen veränderten Verlauf im Vergleich zu WT. Auch die Abwesenheit der Proteasen zeigt keine Auswirkung auf die Reduktionsrate von Fe³⁺ und sind mit dem WT vergleichbar. Es scheint als wären die verschiedenen Proteine einzeln nicht essenziell für die Integration des MtrABC-Komplexes. Die Aktivierung alternativer, paralleler Wege zu den untersuchten Proteasen und Chaperonen sind in *S. oneidensis* möglich. Die Zellen scheinen nicht auf einen einzelnen Weg für die Integration angewiesen zu sein, was die Bedeutung des Komplexes für *S. oneidensis* hervorhebt.

3.3. Entwicklung eines *E. coli* Stammes zur Kontrolle der Integration von MtrB über die periplasmatischen Proteasen von *S. oneidensis*

Die zuvor gezeigten Ergebnisse der Faltungsdefizite (3.2.1.) lassen darauf schließen, dass MtrB in *E. coli* über die Proteine Skp und DegP, sowie durch MtrA eingebaut wird. Bei diesem Einbauweg scheint es jedoch ein Problem mit der Faltung zu geben, da MtrB immer bei 37°C Inkubation der Probe zu detektiert war. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Protease DegQ in *S. oneidensis* auf fehlerhafte MtrB Versionen reagiert und dessen Abbau herbeiführt (Stephan, 2015). Zusätzlich existiert noch eine weitere Protease in *S. oneidensis*, deren homologes Protein (BepA) in *E. coli* den Einbau von β -Fass-Proteinen begleitet bzw. deren Abbau einleitet. Ähnlich wie bei MtrA und MtrB konnte bei dem β -Fass-Protein LptD eine Abhängigkeit von dem Interaktionspartner LptE für den Einbau festgestellt werden (Chng *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2014). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Protease BepA bei einer geringeren Konzentration von LptE den Abbau von LptD einleitet (S. Narita *et al.*, 2013). Diese scheint also eine vergleichbare Funktion zu DegQ innezuhaben.

Auf Grund dieser Analogie wurden verschiedene Versionen von MtrB mit und ohne MtrA in *E. coli* mit den Proteasen DegQ und BepA (in *S. oneidensis* YfgC) exprimiert und der korrekte Einbau von MtrB in die Zellmembran überprüft. Neben der isolierten Interaktion der Proteasen mit MtrB sollte ebenfalls die Kombination mit MtrA überprüft werden. Zusätzlich zu der Verwendung des MtrB-WT, wurde die gleiche Versuchsreihe mit MtrB_{strep} durchgeführt. Da die Faltung von Cytochromen wie MtrA in *E. coli* nur zu einer geringen Konzentration von wirksamen Proteins führt, wurden zwei weitere Stämme mit dem pEC86 Plasmid ausgestattet, um eine höhere Ausbeute an korrekt gefaltetem MtrA zu erhalten (Arslan *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse dieser Versuche sollten Aufschluss über die Interaktionen der Proteasen mit den verschiedenen Versionen von MtrB, in Abhängigkeit von dessen Strep-Tag geben.

3.3.1. Versuchsaufbau

Für diese Versuchsreihe wurden aufbauend auf den beiden Stämmen *E. coli* K12 und *E. coli* $\Delta degP$ mehrere Stämme mit den verschiedenen Versionen von MtrB (*mtrB*, *mtrAB*, *mtrBstrep*, *mtrABstrep* und die Kombination aus *mtrAB* sowie *mtrABstrep* mit pEC86) hergestellt. Diese Stämme wurden zusätzlich mit dem Expressionsplasmid pMAL für die Expression der Kontroll-Proteasen DegQ und BepA ausgestattet. Die Stämme wurden von einer Vorkultur aus auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und induziert. Über Nacht wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ 2-3 wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet und fraktioniert. Von der erhaltenen Membranfraktion wurden 30 µg Protein entnommen und auf 25 µl mit Proteinpuffer aufgefüllt. Vor der Inkubation bei 95°C, für 5 min wurden 5 µl SDS-Ladepuffer dazugegeben. Anschließend wurden die Proben auf ein SDS-Gel geladen. Die Detektion wurde mit dem Anti-MtrB-Antikörper I durchgeführt.

3.3.2. Überprüfung der Kontrollfunktion der Proteasen aus *S. oneidensis*

Da die vorigen Ergebnisse gezeigt haben, dass *E. coli* in der Lage ist MtrB auch ohne MtrA in die Membran zu integrieren, ist davon auszugehen, dass ein Einbau der Proteine hier im Gegensatz zu *S. oneidensis* nicht durch periplasmatische Proteasen kontrolliert wird. Aus diesem Grund wurden die bereits bekannten Proteasen von *S. oneidensis* in *E. coli* exprimiert. Das Ziel war es die mittels der Überprüfung des Einbaus von MtrB die Kontrollfunktion der jeweiligen Protease zu identifizieren.

Zunächst wurden die verschiedenen Versionen von MtrB in einem *E. coli* K12 getestet, um einen Vergleich zu der Co-Expression mit den Proteasen ziehen zu können. Das Ergebnis ist in folgender Abbildung 35 zu sehen.

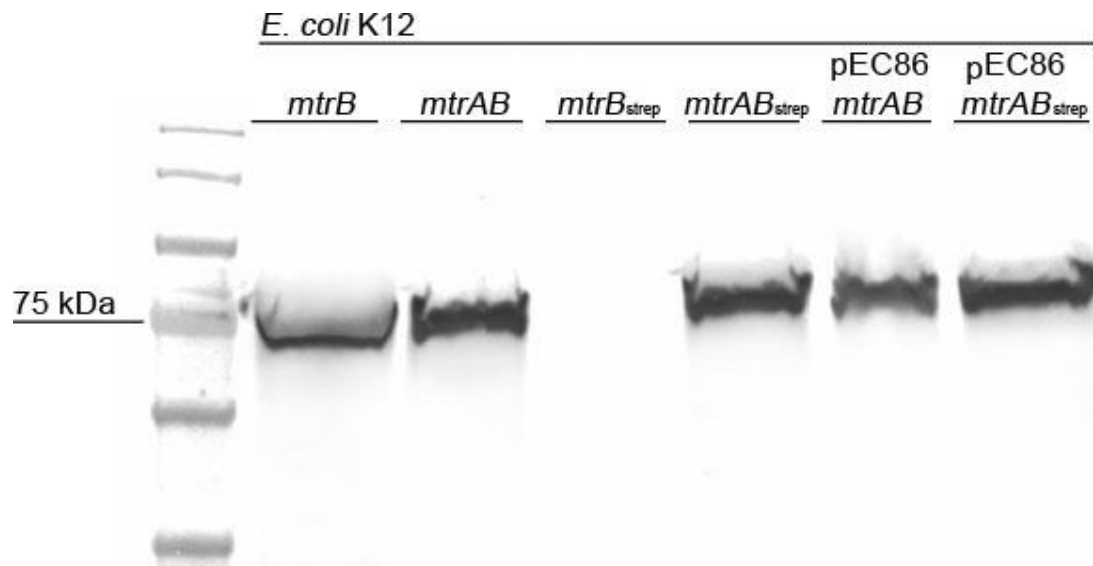


Abbildung 35.: Nachweis von MtrB und MtrB_{strep} in verschiedenen Deletionsmutanten von *E. coli* aus Proben der Membranfraktion. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* K12 pBADmtrB Spur 1, *E. coli* K12 pBADmtrAB Spur 2, *E. coli* K12 pBADmtrB_{strep} Spur 3, *E. coli* K12 pBADmtrAB_{strep} Spur 4, *E. coli* K12 pBADmtrAB pEC86 Spur 5 und *E. coli* K12 pBADmtrAB_{strep} pEC86 Spur 6 zeigen bis auf Spur 3 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei der Probe des *E. coli* K12 pBADmtrB_{strep} Stammes konnte kein MtrB detektiert werden.

MtrB ist in allen Proben bis auf den Stamm mit dem *mtrB_{strep}* Variante zu detektieren. Die verbesserte Cytochrommaturation durch das pEC86 scheint kein essenzieller Part für den Einbau zu sein, da der Einbau auch in den Stämmen ohne pEC86 möglich ist. Lediglich in Spur 3 und 4 zeigt sich, dass der Einbau eines MtrB_{strep} nur in Kombination mit *mtrA* möglich ist. Dies weist darauf hin, dass der Nachteil des Tags durch das Vorhandensein des MtrA Proteins ausgeglichen werden kann.

Die gleiche Kombination an Plasmiden wurde auch in einem *E. coli* K12 $\Delta degP$ Stamm exprimiert, um den Abbau von MtrB_{strep} durch DegP zu verhindern.

Die Stämme wurden identisch behandelt und der Westernblot in Abbildung 36 dargestellt.

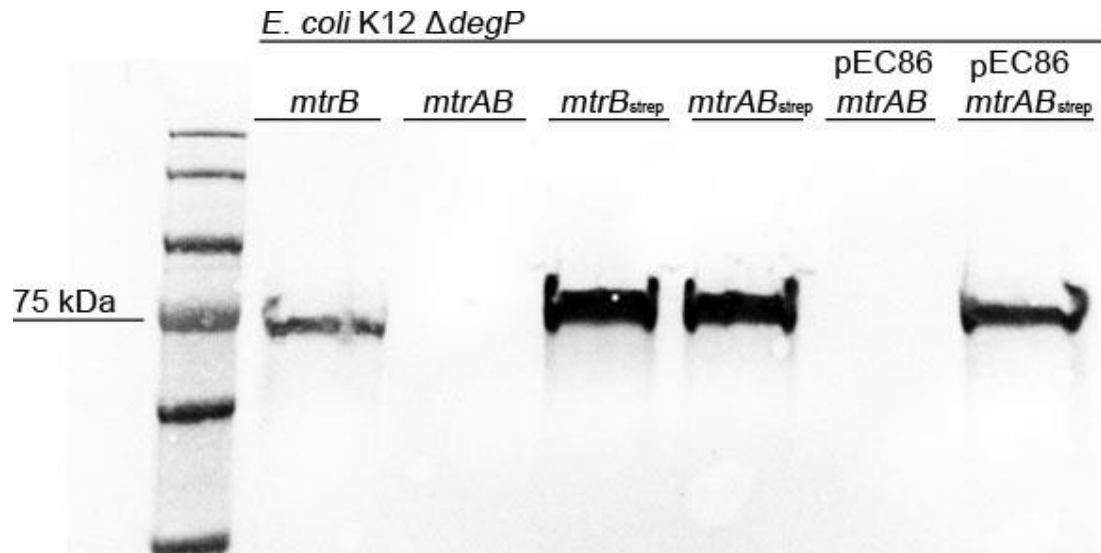


Abbildung 36.: Nachweis von MtrB und MtrB_{strep} in verschiedenen Deletionsmutanten von *E. coli* aus Proben der Membranfraktion. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrB Spur 1, *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrAB Spur 2, *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrB_{strep} Spur 3, *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrAB_{strep} Spur 4, *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrAB pEC86 Spur 5 und *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrAB_{strep} pEC86 Spur 6 zeigen bis auf Spur 2 und Spur 5 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei der Proben der *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrAB und *E. coli* $\Delta degP$ pBADmtrAB pEC86 Stammes konnte kein MtrB detektiert werden.

Wie erwartet ist durch die Deletion von *degP* der Einbau von MtrB_{strep} (Spur 3) im Gegensatz zum WT wieder möglich. Die Spuren 2 und 5 zeigen kein Signal für MtrB. Daraus lässt sich schließen, dass eine Integration von MtrB in Kombination mit MtrA ohne DegP nicht möglich ist. Es könnte sein, dass die Interaktion der beiden Proteine ohne DegP nicht funktioniert und es so zu einem Abbau kommt. Jedoch zeigen die Spuren 4 und 6, dass dieser Abbau durch einen Strep-Tag an MtrB verhindert werden kann.

Auf Grundlage dieser Versuche wurden die Stämme zusätzlich mit einem pMAL Plasmid, mit *degQ* ausgestattet. Ziel war durch die Überprüfung der Integration von MtrB die Funktion der Protease und ihren Kontrollmechanismus zu identifizieren (Abbildung 37).

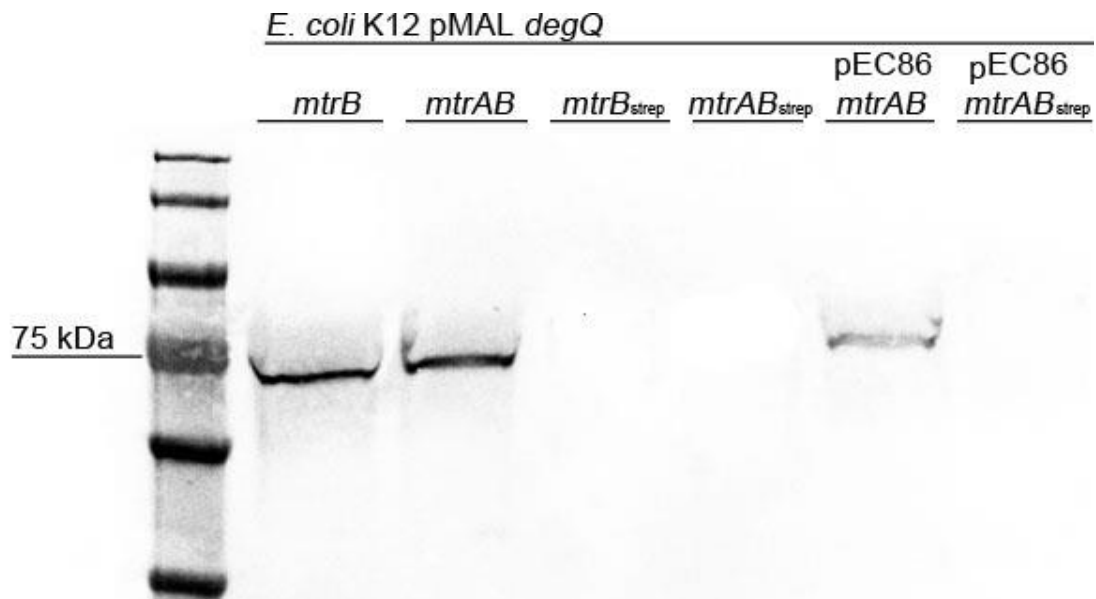


Abbildung 37.: Nachweis von *MtrB* und *MtrB_{strep}* in verschiedenen Deletionsmutanten von *E. coli* aus Proben der Membranfraktion. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* K12 pBAD*mtrB* pMAL *degQ* Spur 1, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *degQ* Spur 2, *E. coli* K12 pBAD*mtrB_{strep}* pMAL *degQ* Spur 3, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB_{strep}* pMAL *degQ* Spur 4, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pEC86 pMAL *degQ* Spur 5 und *E. coli* K12 pBAD*mtrAB_{strep}* pEC86 pMAL *degQ* Spur 6 zeigen bis auf Spur 3, -4 und Spur 6 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei den Proben der *E. coli* K12 pBAD*mtrB_{strep}*, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB_{strep}* und *E. coli* K12 pBAD*mtrAB_{strep}* pEC86 Stammes konnte kein *MtrB* detektiert werden.

Wie auch schon in den ersten Versuchen mit *E. coli* K12 ohne pMAL *degQ* war auch hier der Einbau von *MtrB_{strep}* nicht möglich. Jedoch scheinen bei der Integration von *MtrB* mit *DegP* und *DegQ* keine *strep*-getaggtten *MtrB*-Versionen integriert werden zu können, da auch in Spur 4 und 6 keine Bande detektiert werden konnte. Im Gegensatz zum WT funktioniert die Schutzfunktion von *MtrA* nicht für beide Proteasen in Kombination. Aus diesem Grund wurden *degQ* auch in einem *E. coli* K12 Δ *degP* Stamm exprimiert. So sollten die Wirkungsweisen der beiden Proteasen kontrolliert werden. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 38 zu sehen.

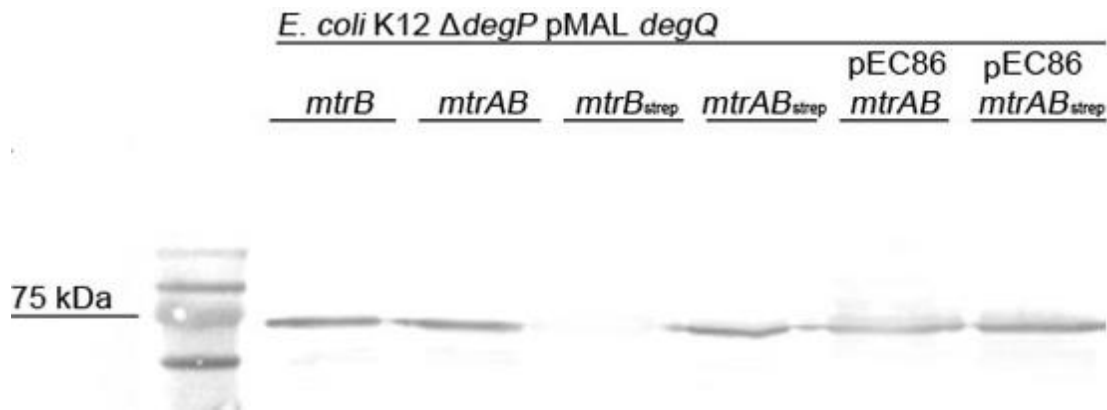


Abbildung 38.: Nachweis von *MtrB* und *MtrB_{strep}* in verschiedenen Deletionsmutanten von *E. coli* aus Proben der Membranfraktion. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrB* pMAL *degQ* Spur 1, *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrAB* pMAL *degQ* Spur 2, *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrB_{strep}* pMAL *degQ* Spur 3, *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrAB_{strep}* pMAL *degQ* Spur 4, *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrAB* pEC86 pMAL *degQ* Spur 5 und *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrAB_{strep}* pEC86 pMAL *degQ* Spur 6 zeigen bis auf Spur 3 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei der Probe des *E. coli* $\Delta degP$ pBAD*mtrB_{strep}* pMAL *degQ* Stamme konnte kein *MtrB* detektiert werden.

Die Expression der Protease *degQ* aus *S. oneidensis* in *E. coli* führt zu einer Komplementation der Deletion von der in *E. coli* nativen Protease *degP*. Wie beim WT ist lediglich der Einbau von *MtrB_{strep}* in die Membran nicht möglich. Es scheint als wären die Wirkungsweisen der beiden Proteasen unterschiedlich auch wenn sie zum selben Ergebnis führen. Doch scheint eine Kombination der beiden Proteasen zum Abbau von strep-getaggen *MtrB* zu führen.

Durch diese komplexen Interaktionen der beiden Proteasen ist eine eindeutige Aussage zur Funktion der Proteasen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Stämme mit einer weiteren Protease von *S. oneidensis* ausgestattet. Die Protease *YfgC* wurde über ein pMAL exprimiert und die Zellen anschließend wie die Stämme zuvor behandelt. Das Ergebnis ist in folgender Abbildung 39 zu sehen.

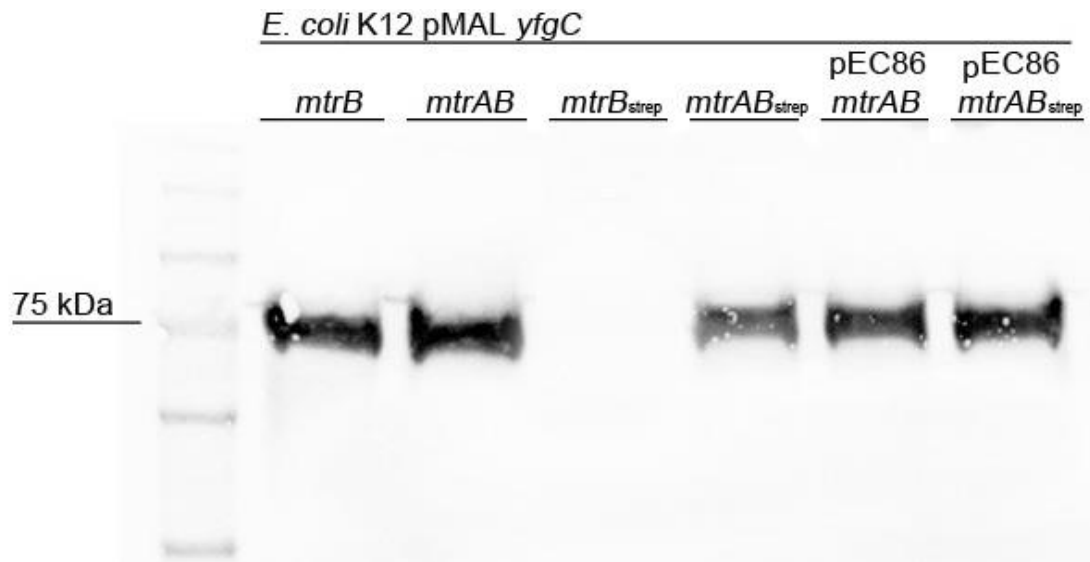


Abbildung 39.: Nachweis von *MtrB* und *MtrB_{strep}* in verschiedenen Deletionsmutanten von *E. coli* aus Proben der Membranfraktion. Die Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* K12 pBAD*mtrB* pMAL yfgC Spur 1, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL yfgC Spur 2, *E. coli* K12 pBAD*mtrB_{strep}* pMAL yfgC Spur 3, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB_{strep}* pMAL yfgC Spur 4, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pEC86 pMAL yfgC Spur 5 und *E. coli* K12 pBAD*mtrAB_{strep}* pEC86 pMAL yfgC Spur 6 zeigen bis auf Spur 3 eine Bande bei ca. 72 kDa. Bei der Probe des *E. coli* K12 pBAD*mtrB_{strep}* Stammes konnte kein *MtrB* detektiert werden.

Wie beim WT ist auch in diesem Fall nur die Integration von *MtrB_{strep}* nicht möglich. Alle anderen Versionen zeigen ein Signal für *MtrB*. Es scheint so als hätte die Protease YfgC keinen Einfluss auf die Integration von *MtrB*. Unklar ist jedoch ob dies in *S. oneidensis* ebenfalls so ist oder in *E. coli* ein Abbau durch Chaperone verhindert wird.

3.4. Koexpression von *S. oneidensis* Chaperonen in *E. coli* als Faltungshilfe von MtrB

Die Integration von β -Fass-Proteinen in die äußere Membran wird in Gram-negativen Bakterien unter anderem vom BAM-Komplex übernommen (Ranova *et al.*, 2018a). Jedoch müssen die β -Fass-Proteine nach der Sekretion durch das Periplasma zum BAM-Komplex geleitet werden. Auf dem Weg dorthin werden sie von Chaperonen vor der Aggregation und dem Abbau durch Proteasen geschützt. Aus Versuchen mit *E. coli* sind bis jetzt zwei Wege bekannt. Die beteiligten Proteine sind SurA, FkpA, Skp und die Protease DegP. SurA bildet dabei den Hauptweg und kann durch FkpA unterstützt werden. Gerät die Zelle unter Stress übernehmen das Chaperon Skp zusammen mit der Protease DegP den Transport der OMPs zum BAM-Komplex (Delhaye *et al.*, 2019; Raivio & Silhavy, 1999).

Für die Integration von MtrB wurden die *S. oneidensis* eigenen Proteine in *E. coli* zusammen mit *mtrA* und *-B* exprimiert. Die Versuche sollten dabei zeigen ob die Chaperone von *S. oneidensis* einen anderen Effekt auf die Faltung von MtrB haben als die *E. coli* Chaperone.

3.4.1. Versuchsaufbau

Für diese Versuche wurden *E. coli* Stämme hergestellt, die als Basis mit einem pBAD *mtrAB* und pEC86 ausgestattet waren. Das pEC86 diente zur effektiveren Maturation des Cytochroms MtrA. Es wurde die native Version von MtrAB gewählt, um Komplikationen mit dem Strep-Tag auszuschließen. Zusätzlich wurden die Gene *fkIB* (das Homolog zu dem *E. coli* Chaperon *fkpA*) und *surA* aus *S. oneidensis* auf einem pMAL in *E. coli* exprimiert. Ebenfalls sollte der zweite Weg über Skp und DegP nachgebildet werden. Dazu wurden ein pMAL mit *skp* und *degQ* (das Homolog zu dem *E. coli* *degP*) zu dem Ausgangsstamm gegeben.

Die Stämme würden mittels einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und über Nacht auf OD₆₀₀ 2-3 anwachsen gelassen. Anschließend wurden die

Zellen geerntet und fraktioniert. Von der Membranfraktion wurde mittels Bradford die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Vorbereitung der Proben wurden die Menge an Probe entnommen, die 30 µg entsprach und auf 25 µl mit Proteinpuffer aufgefüllt. Den Proben wurden 5 µl SDS-Ladepuffer zugegeben. Die Proben wurden immer doppelt angesetzt, um eine bei 37°C für 5 min zu inkubieren und eine bei 95°C. Die unvollständige Denaturierung bei 37°C wurde durchgeführt, um fehlerhaft gefaltete MtrB-Versionen zu identifizieren. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel geladen und aufgetrennt. Nach dem bloten wurden die Proben mit dem Anti-MtrB-Antikörper I eingefärbt.

3.4.2. Überprüfung der Integration und Faltung von MtrB in *E. coli* durch Chaperone von *S. oneidensis*

Die bei 37°C und 95°C behandelten Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen, geblottet und anschließend mittels des Anti-MtrB-Antikörper I auf ihre Faltung hin überprüft (Abbildung 40).

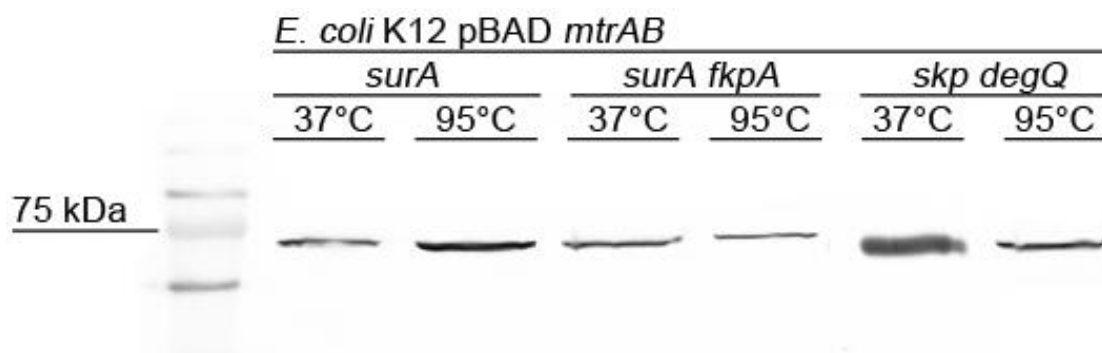


Abbildung 40.: Nachweis von MtrB in verschiedenen *E. coli* Stämmen aus Proben der Membranfraktion. Die bei 37°C und 95°C für 5 min inkubierten Proben aus den fraktionierten Stämmen *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *surA* pEC86 (37°C) Spur 1, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *surA* pEC86 (95°C) Spur 2, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *surA fkpA* pEC86 (37°C) Spur 3, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *surA fkpA* pEC86 (95°C) Spur 4, *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *skp degQ* pEC86 (37°C) Spur 5 und *E. coli* K12 pBAD*mtrAB* pMAL *skp degQ* pEC86 (95°C) Spur 6 zeigen eine Bande bei ca. 72 kDa.

Die Detektion von MtrB war in allen Stämmen möglich. In keinem der Stämme war eine Version von MtrB in die Membran zu detektieren, die nicht bei der 37°C behandelten Probe zu detektieren war. Daher ist davon auszugehen,

dass auch mit den Chaperonen aus *S. oneidensis* das Faltungsdefizit von *E. coli* nicht kompensiert werden kann bzw. der Fehler in der Faltung an einer anderen Stelle des Integrationsweges stattfindet.

3.5. Untersuchung des Faltungsdefizits von MtrB in *E. coli* und *S. oneidensis*

Durch die Behandlung der SDS-Gel-Proben bei 37°C konnte auf ein Faltungsdefizit in dem *S. oneidensis* *mtrB_{strep} ΔmtrAΔdegQ* Stamm und allen *E. coli* Stämmen geschlossen werden (3.1.2.2. Faltungsuntersuchung von MtrB in *S. oneidensis* und *E. coli*). Die Untersuchungen basieren dabei auf dem freiliegenden Epitop des Anti-MtrB-Antikörpers I, die nicht bei einer Denaturierung bei 95°C freiliegen. Dies kann nur durch eine andere Form des MtrB Proteins gewährleistet werden. Auf dem Weg zur Integration in die äußere Membran sind zwei potenzielle Abschnitte als Ursache der Fehlfaltung denkbar. Als erstes der Transport durch das Periplasma mit den unterschiedlichen Chaperonen und als zweites die Integration in die äußere Membran durch den BAM-Komplex. Die Tatsache, dass jenes Faltungsdefizit in *S. oneidensis* durch eine Deletion von *mtrA* hervorgerufen werden kann deutet auf einen fehlerhaften Prozess im Transport von MtrB zum BAM-Komplex. Bisher konnte keine Abhängigkeit von den Chaperonen für die Integration von MtrB festgestellt werden. Jedoch konnte in der Sequenz des Epitops des Anti-MtrB-Antikörper I ein Motiv identifiziert werden, dass typischerweise eine Disulfidbrücke ermöglicht. Dieses CKXC Motiv ist in dem Homologen Protein MtrB ebenfalls vertreten (Abbildung 41).

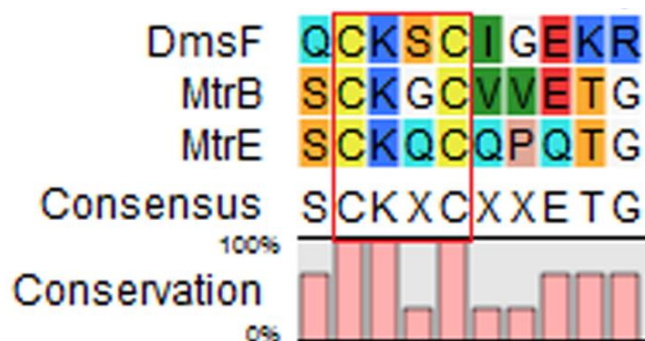


Abbildung 41.: Ausschnitt des Alignments (CLC) der drei homologen Proteine DmsF, MtrB und MtrE, mit dem konservierten CKXC, im rot markierten Bereich.

Für das Aufbrechen einer solchen Disulfidbrücke bedarf es eines starken Reduktionsmittels und einer entsprechenden hohen Temperatur. Dazu wird für gewöhnlich β-Mercaptoethanol dem Ladepuffer für die SDS-Gel-Proben zugegeben.

3.5.1. Versuchsaufbau

Für die Versuche wurden die Stämme, bei denen ein Faltungsdefizit bereits gezeigt werden konnte, gewählt. Als Kontrolle wurde *S. oneidensis* MR-1 WT, zusammen mit *S. oneidensis mtrB_{strep} ΔmtrAΔdegQ* und *E. coli* pBADmtrAB pEC86 fraktioniert und getestet. Bei diesem Versuch wurden drei verschiedene Ladepuffer getestet, die in folgender Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 26.: Zusammensetzung der Ladepuffer.

| Substanz | Menge |
|-----------------------------------|--------|
| Glycerin | 8,2 g |
| TRIS-Lösung (2 M, pH 6,8) | 1,5 ml |
| Bromphenolblaulösung (0,5% (w/v)) | 3 ml |
| SDS-Lösung (20% (w/v)) | 6 ml |
| Ladepuffer 1 | |
| Kein Reduktionsmittel | |
| Ladepuffer 2 | |
| β-Mercaptoethanol | 3 ml |
| Ladepuffer 3 | |
| Dithionit | 30 mg |

Für gewöhnlich wird in SDS-Ladepuffern β-Mercaptoethanol verwendet, um Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu reduzieren. Auf diese Weise können Proteine bis auf ihre Primärstruktur entfalten werden. Für die Untersuchungen des Faltungsdefizits wurden noch zwei weitere Ladepuffer hergestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ladepuffer ohne β-Mercaptoethanol gewählt, da so eine Reduktion der Disulfidbrücke in MtrB verhindert wird und allein die Auswirkung der Inkubation bei 95°C untersucht werden kann. Zusätzlich wurde im dritten Ladepuffer das β-Mercaptoethanol durch Dithionit ersetzt. Dies ist ein deutlich stärkeres Reduktionsmittel, welches in der Lage sein sollte, auch bei geringerer Temperatur die Disulfidbrücke aufzulösen.

Durch die Behandlung der drei Stämme mit den drei unterschiedlichen Reduktionsmitteln und der anschließenden Detektion in einem Westernblot mittels Immunodetektion sollte die Ausbildung der Disulfidbrücke identifiziert

werden. Dies würde einen Rückschluss auf das Faltungsdefizit der *E. coli* Stämme ermöglichen.

3.5.2. Disulfidbrücken Ausbildung von MtrB in *E. coli*

Zunächst sollte die Frage über die Disulfidbrücke in MtrB geklärt werden. Aus diesem Grund wurden die Proben mit dem reduktionsmittelfreien Ladepuffer versetzt, um die Auswirkung der Inkubation bei 95°C zu zeigen. Zusätzlich wurde ein weiterer Ladepuffer mit Dithionit angesetzt. Dieser diente zu Reduktion der Disulfidbrücke bei 37°C. *S. oneidensis* MR-1 dient als Kontrolle des Epitops, dass bei einer intakten Disulfidbrücke nicht zu binden sein sollte. *S. oneidensis mtrB_{strep} ΔmtrAΔdegQ* und *E. coli* pBAD*mtrAB* pEC86 dienten als Vergleich, um das Faltungsdefizit der beiden Versionen von MtrB vergleichen zu können (Abbildung 42).

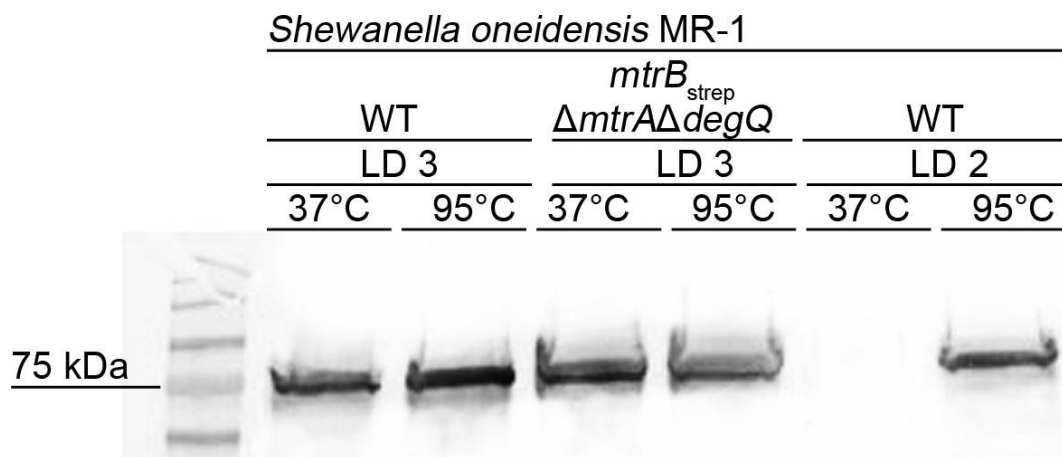


Abbildung 42.: Nachweis von MtrB und MtrB_{strep} in verschiedenen *S. oneidensis* Stämmen aus Proben der Membranfraktion. Die bei 37°C und 95°C für 5 min inkubierten Proben aus den fraktionierten Stämmen *S. oneidensis* MR-1 und *S. oneidensis mtrB_{strep} ΔmtrAΔdegQ* wurden mit dem Ladepuffer 3 (Dithionit) behandelt und zeigen alle eine Bande bei ca. 72 kDa. Als Kontrolle wurden in Spur 5 und -6 Proben der WT-Fraktion mit dem Ladepuffer 2 (β-Mercaptoethanol) geladen.

Sowohl im WT als auch im modifizierten *S. oneidensis* Stämmen führen die bei 37°C und bei 95°C mit dem Ladepuffer 3 (Dithionit) behandelten Proben zu einer Detektion von MtrB. Lediglich die Kontrolle mit dem Ladepuffer 2

(β -Mercaptoethanol) zeigt wie zu erwarten war kein Signal bei 37°C. Es scheint so als würde durch das stärkere

Reduktionsmittel Dithionit keine erhöhte Temperatur gebraucht zu werden, um die Disulfidbrücke zu öffnen und damit das Epitop frei zu legen.

Zur weiteren Kontrolle wurde der Ladepuffer 1 (ohne Reduktionsmittel) mit den Stämmen *S. oneidensis* MR-1, *S. oneidensis* *mtrB_{strep} ΔmtrAΔdegQ* und *E. coli* pBAD*mtrAB* pEC86 getestet. Die Proben von *S. oneidensis* MR-1 wurden als Kontrolle einmal mit dem Ladepuffer 2 versetzt und bei Kontrolle einmal mit dem Ladepuffer 2 versetzt und bei 37°C sowie 95°C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 zu sehen.

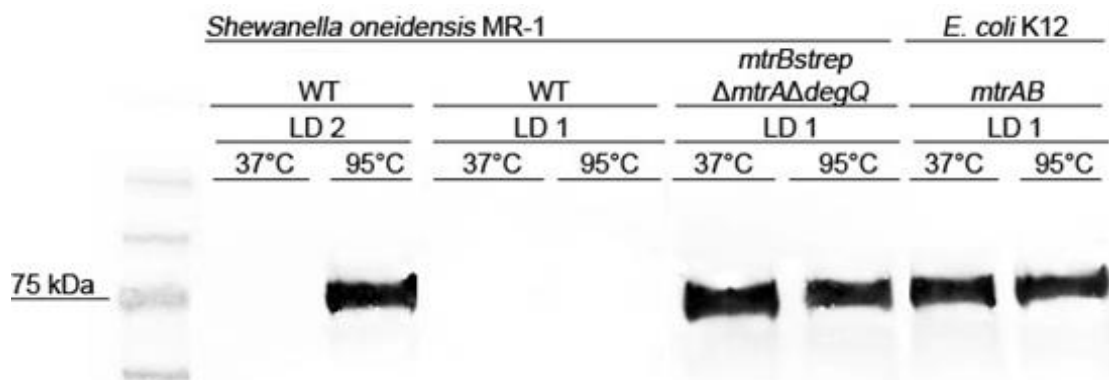


Abbildung 43.: Nachweis von MtrB und MtrB_{strep} in verschiedenen *S. oneidensis* und *E. coli* Stämmen aus Proben der Membranfraktion. Die bei 37°C und 95°C für 5 min inkubierten Proben aus den fraktionierten Stämmen *S. oneidensis* MR-1, *S. oneidensis* *mtrB_{strep} ΔmtrAΔdegQ* und *E. coli* pBAD*mtrAB* pEC86 wurden mit dem Ladepuffer 1 (ohne Reduktionsmittel) behandelt und zeigen alle bis auf die Proben von *S. oneidensis* MR-1 (Spur 3 und -4) eine Bande bei ca. 72 kDa. Als Kontrolle wurden in Spur 1 und -2 Proben der WT-Fraktion mit dem Ladepuffer 2 (β -Mercaptoethanol) geladen.

Die Detektion mit dem Anti-MtrB-Antikörper I zeigt bei allen Proben, bis auf den WT (Spur 3 und -4) ein Signal für MtrB auf der Höhe von ca. 72 kDa. Auch ohne Reduktionsmittel ist eine Detektion der Proben aus der Deletionsmutante und dem *E. coli* möglich. Lediglich der WT benötigt die Freilegung des Epitops durch ein Reduktionsmittel oder Inkubation bei 95°C. Dies spricht für eine fehlerhafte Ausbildung der Disulfidbrücke von MtrB in *E. coli*. Zusätzlich lässt dies auf eine fehlerhafte Interaktion von MtrA und -B in *E. coli* schließen, da der vergleichbare Phänotyp (Detektion von MtrB in einer bei 37°C behandelten

Probe) von MtrB in *S. oneidensis* nur bei einer Deletion von *mtrA* zu beobachten ist.

4 Diskussion

Das bisherige Modell der Integration von MtrB basiert auf den Ergebnissen der Promotionsarbeit von Simon Stephan, dessen Versuche mit einer C-terminalen, strep-getaggen Version von MtrB durchgeführt wurden (Stephan, 2015). In einem Komplementationversuch wurde kein Unterschied in der Funktion des MtrABC-Komplexes mit MtrB oder MtrB_{strep} festgestellt. Jedoch zeigen die Versuche dieser Arbeit einen Unterschied bei der Integration von MtrB und MtrB_{strep}, sowohl bei *E. coli* als auch bei *S. oneidensis*.

4.1. Korrektur des alten Modells der Integration von MtrB in die äußere Membran

Bislang wird davon ausgegangen, dass MtrA und -B nach der Translation über das Sec-System durch die innere Membran ins Periplasma transportiert werden. Dort entfernt die Protease SP die N-terminale Sekretionssequenz (Cranford-Smith & Huber, 2018). Im wässrigen Milieu des Periplasmas ist gerade für Transmembranproteine mit einem hohen Anteil an lipophilen Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit groß, dass es zu einer ungewollten Aggregation der Proteine kommt, wobei die hydrophoben Aminosäuren sich zusammenlagern und von den Hydrophilen umschlossen werden. Für diesen Fall kontrollieren Proteasen den Zustand der Apoproteine und bauen diese gegebenenfalls ab (Soltes *et al.*, 2017). Um dies zu verhindern binden Chaperone die noch ungefalteten Proteine und geleiten diese durch das Periplasma (Behrens-Kneip, 2010). Für diese Aufgabe sind drei Proteine bekannt. SurA bildet dabei den Hauptweg, während Skp und DegP in Stresssituationen eingesetzt werden (Raivio & Silhavy, 1999). DegP ist zusätzlich in der Lage als Protease fehlerhaft gefaltete Proteine abzubauen (Sklar *et al.*, 2007). Simon Stephan zeigte, dass der Transport durch das Periplasma von MtrA abhängig ist (Abbildung 44) (Stephan, 2015). Unklar bleibt jedoch welche Proteine im weiteren Verlauf eine Rolle spielen.

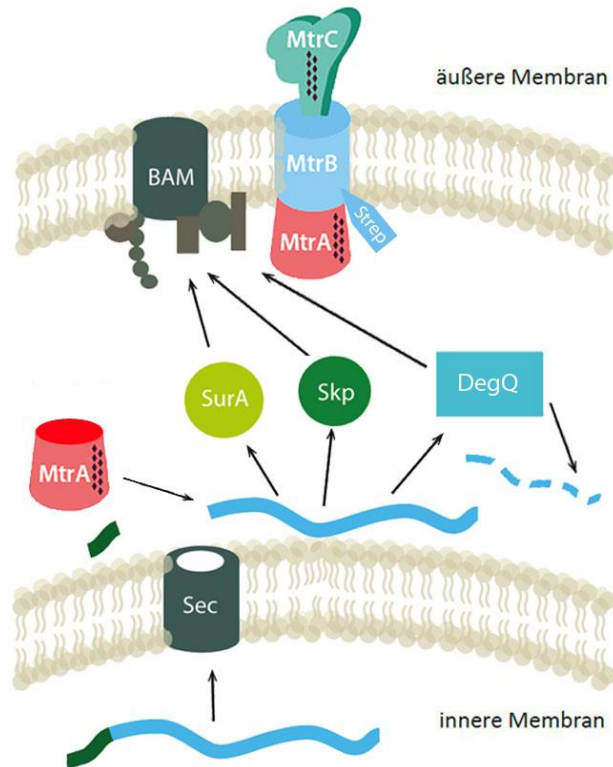


Abbildung 44.: Schema zur Integration von MtrB in *S. oneidensis* über die Proteine SurA, Skp und die Protease DegQ. Nach dem Eintritt der Aminosäurekette (hellblau) in das Periplasma durch das Sec-System, interagiert MtrA (rot) mit MtrB. Die beiden Proteine können über die beiden Chaperone SurA und Skp oder über die Protease DegQ zum BAM-Komplex geleitet oder durch DegQ abgebaut werden. Durch den BAM-Komplex wird MtrB in die Membran integriert.

Eine Integration von MtrB_{strep} war ohne MtrA nur möglich, wenn das Gen für die Protease DegQ deletiert wurde. Zur selben Schlussfolgerung kam Schickelberger *et al.* (2011), wobei seine Versuche in *E. coli* auf der Deletion von *degP*, dem *degQ* Homolog basieren. Bislang besteht die Annahme, dass MtrA und -B im Periplasma interagieren und von den Chaperonen SurA, Skp und der Protease DegQ zum BAM-Komplex geleitet werden. Dabei wird die Interaktion von MtrA und -B durch DegQ kontrolliert. Sollte bei dieser Interaktion ein Fehler auftreten, so baut die Protease DegQ MtrB direkt ab. Zusätzlich konnte eine Fehlfaltung in *S. oneidensis* festgestellt werden, die durch eine Integration von MtrB_{strep} ohne MtrA und ohne die Protease DegQ ausgelöst wird (Kapitel 3.1.) (Stephan, 2015). Diese Fehlfaltung ist, durch eine Detektion von MtrB mittels eines Westernblots bei 37°C behandelten Proben festzustellen (Abbildung 28).

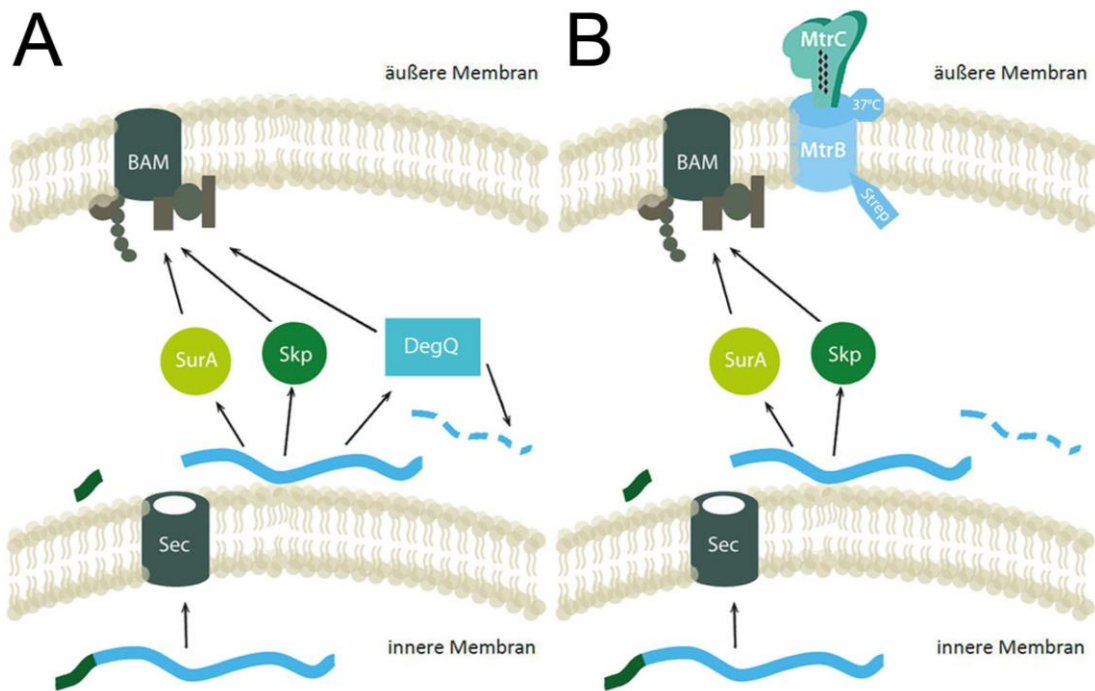


Abbildung 45.: Vergleich der Integration von MtrB mit Strep-Tag in An- bzw. Abwesenheit von DegQ ohne MtrA in *S. oneidensis* auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit. **A:** Schema zur Integration einer Strep-getaggen Variante von MtrB ohne MtrA. Die Deletion von *mtrA* führt zu einem Abbau durch die Protease DegQ. **B:** Schema zur Integration einer Strep-getaggen Variante von MtrB ohne MtrA und DegQ. Die Deletion von *mtrA* führt wie in Abschnitt A gezeigt, zu einem Abbau von MtrB. Die zusätzliche Deletion von *degQ* ermöglicht die Integration von MtrB_{strep} in die äußere Membran.

Die neuen Erkenntnisse zeigen, dass die Interaktionen von MtrB und DegQ eher auf dem Strep-Tag basieren als auf einer Kontrollfunktion der Protease. Der Vergleich beider Versionen (MtrB und MtrB_{strep}) in einer *mtrA* Deletionsmutante zeigt, dass MtrB nicht mehr in der Membran zu detektieren ist. Jedoch kann die Integration in die Membran bei einer MtrB_{strep} Variante durch die Deletion von *degQ* wieder gewährleistet werden (Abbildung 26). Die native Version von MtrB in einem $\Delta mtrA$ Stamm bleibt auch bei einer Deletion von *degQ* nicht zu detektieren. Dies spricht für eine andere Funktion der Protease als bisher angenommen.

4.1.1. Funktionale Einordnung der Proteasen DegQ und DegP bei der Integration von MtrB und MtrB_{strep}

Für die Integration von MtrB in die äußere Membran von *E. coli* ist es unabdingbar die Interaktionen der periplasmatischen Proteasen und Chaperone mit dem heterolog exprimierten *mtrB* zu verstehen. Auch wenn die beiden homologen Proteasen DegQ aus *S. oneidensis* und DegP aus *E. coli* (Identität: 52,84%) viele Parallelen aufweisen und von Schicklberger *et al.* (2011) eine Art Kontrollfunktionen der beiden identifiziert wurde, zeigen die neusten Erkenntnisse aus dieser Arbeit doch Unterschiede in Bezug auf ihre Rolle bei der Integration von MtrB.

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, weisen beide Proteasen ähnliche Funktionen auf. Die Ergebnisse legen nahe, dass MtrA eine Schutzfunktion für MtrB_{strep} aufweist, die sowohl in *E. coli* als auch in *S. oneidensis* zu beobachten ist. In beiden Stämmen ist eine Detektion von MtrB_{strep} in der Membran ohne die Koexpression von *mtrA* nicht möglich. Die zusätzliche Deletion der Proteasen *degQ* bzw. *degP* ermöglicht wiederum die Integration von MtrB_{strep} in die Membran (Abbildung 45). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Proteasen DegQ und DegP die Interaktion von MtrA und -B_{strep} kontrollieren, bzw. die Anwesenheit von MtrA den Abbau von MtrB_{strep} durch die Proteasen verhindert. Durch eine weitere Deletion von *degQ* bzw. *degP* lässt sich MtrB_{strep} erfolgreich in der Membran detektieren. Damit ist von einem Abbau von MtrB_{strep} in Abwesenheit von MtrA durch die jeweilige Protease in den beiden Organismen auszugehen.

Diese Versuche basieren jedoch alle auf einer strep-getaggen Version von MtrB. Bei einer Expression von *mtrB* ohne Strep-Tag ist es in einem *S. oneidensis* $\Delta mtrA$ Stamm nicht mehr möglich MtrB in der Membranphase zu detektieren (Abbildung 26). Dies lässt sich in *E. coli* jedoch nicht reproduzieren, da die Untersuchung des *E. coli* K12 pBAD*mtrB* Stammes ein Signal für MtrB in der äußeren Membran aufweist (Abbildung 27). Somit scheint eine Schutzfunktion von MtrA wie sie bei der MtrB_{strep} Variante zu beobachten ist, bei einem unveränderten MtrB in *E. coli* nicht nötig zu sein. Vielmehr ist kein Abbau von MtrB durch DegP zu beobachten (Abbildung 35). Dies spricht

jedoch nicht zwangsläufig für eine anderen Funktionsweise, da in *S. oneidensis* durch eine weitere Deletion von *degQ* kein Signal für MtrB in einem $\Delta mtrA$ Stamm auf dem Westernblot der Membranfraktion zu finden ist (Abbildung 26). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass MtrB in *S. oneidensis* von einer weiteren Protease abgebaut werden kann, welche in *E. coli* nicht vergleichbar vorkommt. MtrA scheint auch im Fall eines wildtypischen MtrBs eine Schutzfunktion zu haben, da nur eine Deletion von *mtrA* zum Abbau von MtrB führt. Ungeklärt bleibt, ob DegQ in *S. oneidensis* überhaupt eine Interaktion mit MtrB eingeht oder sich dieser Abbau nur auf die MtrB_{strep} Variante bezieht. Auch wenn sich in *E. coli* noch kein Beweis für einen Abbau von MtrB durch DegP finden ließ, so konnten Interaktionen der beiden Proteine belegt werden. Die durch den Stressfaktor σ^E hoch regulierten Gene *skp* und *degP* scheinen in *E. coli* im Gegensatz zu SurA eine wichtige Rolle bei der Integration von MtrB zu spielen (Redford & Welch, 2006). Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.2. zeigen, ist eine Detektion von MtrB in der Probe eines *E. coli* $\Delta skp \Delta degP$ pBAD*mtrB* Stammes (Expression ohne *mtrA*) nicht möglich. Die Deletion von *surA* scheint

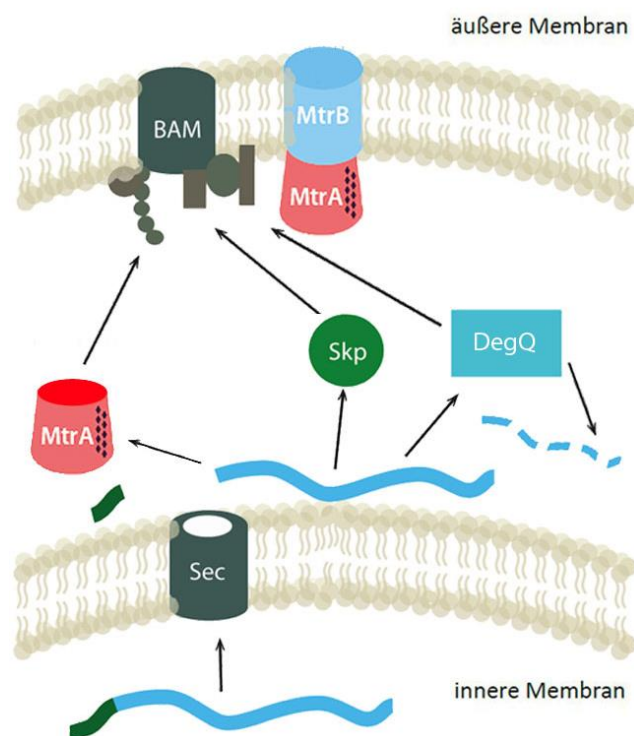


Abbildung 46.: Angepasste Version der drei möglichen Integrationswege von MtrB in die äußere Membran von *E. coli* über das Chaperon Skp, die Protease DegP und das Cytochrom MtrA auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit. Im Vergleich zu Stephan's Schema ist hier MtrA eine mögliche Option und SurA als Transporter fällt weg. Bisher wurde angenommen, dass MtrA in drei MtrB-Transportkomplexen durch das Periplasma eine essenzielle Rolle spielt.

jedoch keinen Einfluss auf die Integration von MtrB zu haben. Dies deutet auf einen Integrationsweg über das Chaperon Skp sowie die Protease DegP hin, welche ebenfalls mit MtrA in Wechselwirkung treten (Abbildung 46). Bei Stämmen, in denen lediglich zwei der drei genannten Gene deletiert bzw. nicht exprimiert waren, konnte MtrB detektiert werden (Abbildung 31).

Dies deutet auf eine ähnliche Funktion der drei Proteine hin. Da für DegP schon chaperonähnliche Eigenschaften gezeigt werden konnten, ist davon auszugehen, dass diese auch bei MtrB angewendet werden (Jiang *et al.*, 2008). Leider war die Herstellung einer vergleichbaren Mutante in *S. oneidensis* nicht möglich, da die Doppelmutation $\Delta skp \Delta degQ$ für die Zelle letal ist. Somit ist nicht zu klären, ob die homologen Proteine in *S. oneidensis* einen vergleichbaren Integrationsmechanismus bilden, wie er in *E. coli* zu beobachten ist. Jedoch konnten die Gene *skp* und *degQ* einzeln in *S. oneidensis* deletiert werden und die Zellen auf die Integration von MtrB sowie die Funktionsfähigkeit des MtrABC-Komplexes überprüft werden. Dabei konnten keine Unterschiede zum WT festgestellt werden (Kapitel 3.2.). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in *E. coli*, bei denen die Deletion von *degP* zu einem Abbau von MtrB führt, wenn eine Koexpression von *mtrA* vorliegt (Abbildung 35). Dies lässt vermuten, dass die Interaktion von MtrA und -B in *E. coli* durch die Protease DegP beeinflusst wird. Diese Beeinflussungen beziehen sich sowohl auf den Abbau als auch auf den Einbau von MtrB und scheinen auch für die Interaktion von MtrA und -B relevant zu sein. So wird ein MtrB_{strep} ohne den Schutz durch MtrA von DegP abgebaut. Jedoch ist eine Integration von MtrB ohne MtrA in einem *E. coli* Δskp Stamm nur durch die Anwesenheit von DegP möglich. Eine zusätzliche Deletion von DegP führt zu einem Abbau des β -Fass-Proteins (Abbildung 31). So scheint auch eine Deletion der Protease zu Problemen bei der Integration zu führen. Da es nicht möglich ist, MtrB zusammen mit MtrA und Skp in *E. coli* $\Delta degP$ zu integrieren, lässt dies vermuten, dass Skp allein die Interaktion von MtrA und -B nicht katalysieren kann und den Abbau initiiert. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen in *S. oneidensis*, bei denen lediglich ein Abbau von MtrB_{strep} zu beobachten ist. Somit hat DegP entweder eine andere Funktionsweise als DegQ oder spezifische MtrB Integrationsfaktoren sind in *E. coli* nicht

vorhanden. Rückschließend auf diesen Ergebnissen, ist ein Stattfinden ungezielter Interaktionen zwischen MtrB und periplasmatischen Proteinen denkbar.

Diese Theorie von spezifischen Integrationsfaktoren in *S. oneidensis*, welche in *E. coli* nicht vorhanden sind, wird insoweit durch die Versuche bestärkt, dass in einem Komplementationsversuch, durch die Expression von *degQ* in einem *E. coli* $\Delta degP$ Stamm ein identisches Bandenmuster auf dem Westernblot zu sehen war. Bei diesem Versuch in Kapitel 3.3. wurde die Integration von MtrB in die äußere Membran von *E. coli* überprüft. Dabei wurde über das pMAL Plasmid zusätzlich *degQ* exprimiert sowie die verschiedenen Varianten von *mtrB* über das pBAD Plasmid. Verglichen wurde dabei die Integration, der verschiedenen Varianten von *mtrB* bzw. *mtrAB* unter der zusätzlichen Expression von *degQ* in einem *E. coli* K12 WT (Abbildung 35) mit einem *E. coli* $\Delta degP$ (Abbildung 38). In beiden Fällen ist lediglich keine Bande für MtrB_{strep} zu sehen. Dies zeigt, dass die Deletion von *degP* durch die zusätzliche Expression von *degQ* komplementiert werden kann und eine vergleichbare Interaktion mit MtrB eingeht. So scheinen die beiden Proteasen auch lediglich auf MtrB_{strep} zu reagieren und durch die Koexpression von *mtrA* vom Abbau abgehalten zu werden.

Diese Schutzfunktion lässt sich in den gezeigten Ergebnissen in Abbildung 37 nicht beobachten. Bei diesen Versuchen wurde ein *E. coli* K12 Stamm mit den verschiedenen Versionen von *mtrB* ausgestattet und zusammen mit *degQ* exprimiert. In diesem Falle befinden sich beide Proteasen DegP aus *E. coli* und DegQ aus *S. oneidensis* zusammen mit MtrB im Periplasma. In dieser Konstellation ist es weder möglich in einem Stamm mit *mtrB*_{strep} noch mit *mtrAB*_{strep} ein Signal für MtrB zu detektieren. Auch die zusätzliche Induktion des pEC86 Plasmid für die verbesserte Maturation von MtrA führt nicht zu einer Integration von MtrB. MtrA scheint somit nur gegen eine der Proteasen eine Schutzfunktion zu haben, jedoch nicht gegen beide zum selben Zeitpunkt. Dies spricht für zwei unterschiedliche Wirkungsweisen der beiden Proteasen. Für die Unterschiede gibt es drei Hypothesen. Zum einen könnten DegQ und DegP auf unterschiedliche Signale mit dem Abbau von MtrB reagieren und somit einen vollständigen Abbau dieses Proteins einleiten. Zum anderen wäre es

möglich, dass die Interaktionen der beiden Proteasen mit MtrB zum selben Zeitpunkt zu Komplikationen führt, welche einen Abbau zur Folge hat. Eine dritte Hypothese beruht darauf, dass durch MtrA lediglich eine Hemmung der Abbaurrate durch DegQ und DegP eingeleitet wird und die zusätzliche Expression von DegQ zu einem Anstieg der Proteasenkonzentration im Periplasma geführt hat, welche die gesunkene Abbaurrate komplementieren kann.

Zusammenfassend ermöglichen die Erkenntnisse aus dem Vergleich der Proteasen DegQ und DegP kein klares Modellsystem über die Interaktionen der Proteasen mit MtrB bzw. über deren Einbauweg. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass weitere Faktoren in *S. oneidensis* für die Integration mitverantwortlich sind. Zudem wird aus den Ergebnissen ersichtlich, dass eine Interaktion der Proteasen mit MtrB durch das Strep-Tag initiiert wird. Abschließen ist von einem weiteren Protein auszugehen, die in *S. oneidensis* den gezielten Abbau von MtrB einleitet. Diese zusätzlichen Erkenntnisse ermöglichen die Aufstellung neuer theoretischer Intergrationsmodelle.

4.1.2. Unbekannte Protease

Wie bereits im Kapitel zuvor erwähnt, scheint die von Schickelberger *et al.* (2011) entdeckte Schutzfunktion von MtrA für MtrB vor DegQ bzw. DegP in *E. coli* sich lediglich auf das Strep-Tag zu beziehen. Somit ist davon auszugehen, dass eine weitere Protease in *S. oneidensis* die Interaktion von MtrA und -B kontrolliert.

Die Ergebnisse der Versuche mit einem ungetaggen MtrB in einer $\Delta mtrA$ Mutante ermöglichten keine Detektion von MtrB in der Membran. Auch eine zusätzliche Deletion von *degQ* in *S. oneidensis*, welche bisher als Kontrollprotease für die Interaktion von MtrA und -B vermutet wurde (Schickelberger *et al.*, 2011), zeigte keinen Einfluss. MtrA weist eine etwaige Schutzfunktion für MtrB_{strep} vor DegQ auf, jedoch lässt sich der Abbau von MtrB in einem *S. oneidensis* $\Delta mtrA \Delta degQ$ Stamm immer noch beobachten. Dies deutet auf eine vergleichbare, wenn auch unspezifische Schutzfunktion des

Strep-Tags hin. Die bis jetzt noch unbekannte Protease scheint durch das C-terminale Tag daran gehindert zu werden, den Abbau einzuleiten. Eine potenzielle Erklärung könnte die zusätzliche Aminosäuresequenz des Tags sein, welche die an drittletzter Stelle befindliche aromatische Aminosäure Tyrosin verdeckt. Aromatische Aminosäuren am C-terminalen Ende von β -Fass-Proteinen dienen oftmals als Erkennungssignal für die an der Integration beteiligten Proteine (de Cock *et al.*, 1997). Somit könnte postuliert werden, dass der Abbau durch das ausbleibende Erkennungssignal verhindert wird. Der genaue mechanistischen Einfluss dieses C-terminalen Tags kann jedoch nur in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Ungeklärt bleibt ebenfalls, ob der Integrationsweg und damit auch der Abbau über DegQ katalysiert wird oder ob es sich um ein streptaginduziertes Artefakt handelt, wobei weitere, bisher unbekannte Proteine beteiligt sind. Auf dieser Grundlage lassen sich zwei weitere Theorien ableiten, wobei in beiden Fällen von einer weiteren (unbekannten) Protease ausgegangen wird. Die erste Theorie bezieht sich auf eine Kontrolle der Interaktion von MtrA und -B durch DegQ im Periplasma. Die Deletion von MtrA führt zum Abbau von MtrB bzw. MtrB_{strep} (Abbildung 47). Im weiteren Verlauf der Integration von MtrB kommt es zu einer

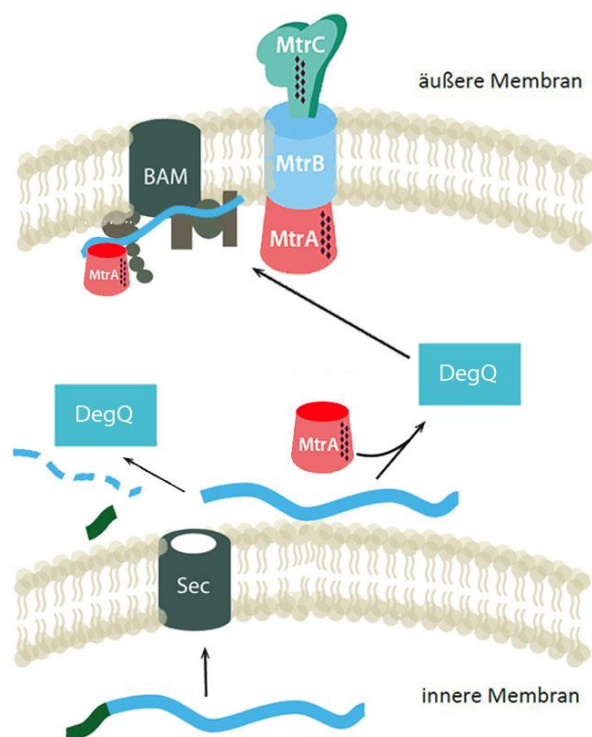


Abbildung 47.: Schematische Darstellung zur Kontrolle der Interaktion von MtrA und -B bei der Integration von MtrB über den BAM-Komplex in die äußere Membran von *S. oneidensis*.

erneuten Kontrolle der Interaktion von MtrA und -B durch die bisher unbekannte Protease. In diesem Fall schützt das Strep-Tag MtrB vor dem Abbau und es kommt zur Integration in die Membran.

Bis jetzt konnte noch kein weiterer Kontrollschritt bei der Integration identifiziert werden. Jedoch scheint eine Kontrollfunktion von DegQ eher unrealistisch, da eine Interaktion der Proteine DegQ und DegP mit MtrB ohne MtrA in *E. coli* nicht gezeigt werden konnte. Dazu wurden *degQ* in einem *E. coli* zusammen mit *mtrB* exprimiert und anschließend auf die Integration durch einen Westernblot untersucht (Abbildung 37). Die Detektion von MtrB in diesem Stamm zeigt, dass eine Integration möglich war und kein Abbau stattfand. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass durch Interaktionen mit *E. coli* eigenen Chaperonen ein Schutz für MtrB vorliegt, scheint DegQ aus *S. oneidensis* nicht auf MtrB allein zu reagieren. Zusätzlich scheinen DegQ und DegP gezielt MtrB_{strep} abzubauen wie in den Proben der strep-getaggten MtrB-Versionen zu sehen ist. Somit ist eher von einer einzelnen Kontrolle durch eine unbekannte Protease auszugehen, welche die zweite Hypothese begründet (Abbildung 47).

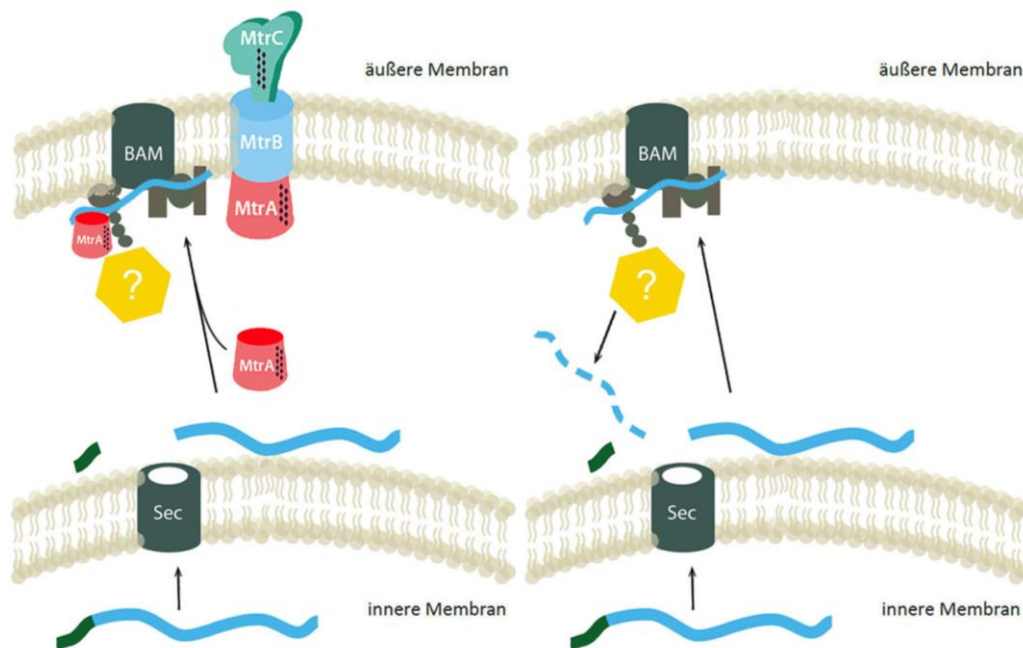


Abbildung 48.: Schematische Darstellung der Integration von MtrB in *S. oneidensis* über den Kontrollschritt durch die bisher unbekannte Protease (gelb). (Links) Nach dem Transport der Aminosäurekette von MtrB in das Periplasma und der Interaktion mit MtrA kontrolliert die Protease diese Interaktion. (Rechts) Im Falle einer ausbleibenden Interaktion führt die Protease den Abbau von MtrB durch und verhindert die Integration des OMPs.

In dieser zweiten Theorie hat die Protease die von Schickelberger *et al.* (2011) beschriebene Funktion für DegQ inne. Dabei wird die Interaktion von MtrA und MtrB überprüft und bei einem Ausbleiben dieser führt sie zum Abbau. Der Strep-Tag scheint diesen Abbau zu verhindern. Denkbar wäre, dass die zusätzlichen Aminosäuren an der Interaktionsstelle von MtrA sitzen und so der Mechanismus, der kontrollierenden Protease ausgesetzt wird. Der sich auf den Abbaumechanismus von MtrB_{strep} durch DegQ bzw. DegP betreffende, vergleichbare Phänotyp von *E. coli* und *S. oneidensis*, basiert dann lediglich auf der künstlich herbeigeführten Interaktion von MtrB und DegQ durch das Strep-Tag.

Auch wenn keine der beiden Theorien eindeutig zu belegen ist, bleibt die Aufgabe der Identifizierung der Protease. Dafür bietet sich bisher nur die Deletion der vermeintlichen Kandidaten in *S. oneidensis* an. Durch die bisherigen Erkenntnisse des strukturell ähnlich aufgebauten Komplexes aus LptD und LptE aus *E. coli*, welcher die Synthese der Liposacharidschicht ermöglicht, könnten zwei potenzielle Proteasen abgeleitet werden (S. I. Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017) (Literatur). Dieser Komplex besteht aus LptD, einem β -Fass-Protein in der äußeren Membran, und LptE, welches ähnlich wie MtrA in MtrB durch LptD in der äußeren Membran verankert wird. Es konnte das gleiche Phänomen beobachtet werden, bei welchem eine Deletion von LptE zu einem Abbau von LptD führt (S. Narita *et al.*, 2013; Schickelberger *et al.*, 2011).

Die Erkenntnisse in *E. coli* zeigen, dass die erste Kontrolle bzw. das Geleit durch das Periplasma mit Hilfe der Chaperoneigenschaft von DegP stattfindet. Bei der Interaktion von LptD mit dem BAM-Komplex kontrolliert die Protease YcaL den Ablauf. Für die anschließende Interaktion von LptD und LptE führt BepA die Kontrolle durch und baut fehlerhafte Proteine ab (Soltes *et al.*, 2017). Die bisherigen Versuche dieser Arbeit in *S. oneidensis* konnten DegQ als Homolog zu DegP noch nicht als essenziellen Teil der Integration identifizieren, jedoch konnten die homologen Proteine von YcaL und BepA auch in *S. oneidensis* gefunden werden. Leider war es nicht möglich eine Doppelmutante der Proteasen in einem $\Delta mtrA$ Stamm herzustellen. Jedoch konnten die Proteasen einzeln ausgeschaltet werden und die weitere

periplasmatische Protease *bepA* in einem $\Delta degQ$ Stamm deletiert werden. So war es nicht möglich den Abbau von MtrB durch diese Proteasen in einem $\Delta mtrA$ Stamm zu belegen, jedoch scheint ein simultaner Ablauf für die Integration von MtrAB wie bei LptDE unwahrscheinlich, da die Deletionsmutanten weder einen Faltungsdefizit (Kapitel 3.2.1.) aufweisen noch eine geringere Reduktionsrate zeigen (Kapitel 3.2.2.). Trotzdem müsste für eine genaue Aussage die Detektion von MtrB in den Doppelmutanten $\Delta mtrA\Delta ycaL$ und $\Delta mtrA\Delta bepA$ überprüft werden. Der Versuch einer Koexpression der Protease *ycaL* (in *S. oneidensis yfgC*) mit den verschiedenen Versionen von *mtrB* in *E. coli* führte zu keiner veränderten Detektion von MtrB zu einem Stamm ohne dessen Expression (Abbildung 39). Daher ist nicht davon auszugehen, dass das YfgC einen Kontrollfunktion für MtrB aufweist. Jedoch sollte die Koexpression von BepA aus *S. oneidensis* noch getestet werden, um beide Proteasen zu überprüfen.

Auch wenn diese Methode eine schnelle Überprüfung ermöglicht, kann sie die Beeinflussung der *E. coli* eigenen Chaperone nicht umgehen. So könnte die bereits beobachtete Chaperoneigenschaft von DegP für MtrB einen Einfluss haben und den Abbau verhindern. Es ist ebenfalls unklar welche Proteine mit MtrB interagieren und welchen Einfluss diese auf die Chaperone und Proteasen von *S. oneidensis* bei einer Koexpression haben. Aus diesem Grund ist es unabdingbar zu verstehen, wie die Integration in *E. coli* stattfindet. Diese Erkenntnisse bilden eine Basis für die weitere Forschung an dem MtrABC-Komplex und der Integration des Komplexes in *E. coli*.

4.2. Integration von MtrB in *E. coli*

Auch wenn schon Unterschiede zu der Integration des β -Fass-Proteins MtrB zwischen *S. oneidensis* und *E. coli* gefunden wurden, so begrenzen sich die Erkenntnisse zu der Integration dieser Proteingruppe auf die Systeme von *E. coli*. Der Fokus der Forschung an *S. oneidensis* bezieht sich nur wenig auf die Funktionsweise der Integration von OMPs. Jedoch bieten die Erkenntnisse von *E. coli* durch die enge Verwandtschaft der beiden Gammaproteobakteria

Anhaltspunkte, um ein besseres Verständnis im *S. oneidensis* System zu erlangen, jedoch können die Einzelheiten nicht vollständig abgeleitet werden und müssen zunächst eigenständig überprüft werden. Zusätzlich dienen die Informationen über den Einbau von MtrB in *E. coli* als Grundlage für eine zukünftige Nutzung des MtrABC-Komplexes in diesem Organismus als Biosensor oder bioelektronisches System. Aus diesem Grund wird im Folgenden der theoretische Ablauf der Integration an Hand der neuen Erkenntnisse chronologisch aufgezeigt.

Die Expression der *mtrABC* Gene, sowie die anschließende Translation ist auch in *E. coli* ohne weitere Codonoptimierung möglich. Ebenso ist der Transport der ungefalteten Proteine durch die innere Membran, über das Sec-System, heterolog kompatibel. Im Periplasma bedarf es einem ersten zusätzlichen Eingriff. So weist *E. coli* eine deutlich geringere Cytochromkonzentration auf als *S. oneidensis*, welches theoretisch 41 Cytochrome in seinem Genom kodiert (Meyer *et al.*, 2004). Aus diesem Grund ist die Maturation der Hämgruppen in *S. oneidensis* deutlich effektiver. Durch die zusätzliche Induktion der *c*-Typ-Cytochrom Maturations Gene auf dem pEC86 Plasmid in *E. coli* kann diese verbessert und eine höhere Hämkonzentration erreicht werden (Arslan *et al.*, 1998; Carpentier *et al.*, 2005). Durch diesen Schritt ist die Maturation von MtrA und MtrC, den beiden Cytochromen des MtrABC-Komplex möglich. Diese lässt sich durch eine Rotfärbung der Zellen beobachten. Für MtrC, welches in *S. oneidensis* durch das Typ-II-Sekretionssystem an die Zelloberfläche gelangt, konnte keine heterologe Funktionalität in *E. coli* beobachtet werden. Scheinbar kann das *E. coli* eigene Typ-II-Sekretionssystem die Aufgabe des Typ-II-Sekretionssystems aus *S. oneidensis* nicht vollständig übernehmen (Liang Shi *et al.*, 2008). Eine zusätzliche, experimentelle Zugabe von MtrC ist möglich, um den Komplex zu vervollständigen, da MtrC nach der Sekretion durch das Typ-II-Sekretionssystem selbstständig die Interaktion mit MtrAB eingeht (L. Shi *et al.*, 2008). Die Integration von MtrAB ist also unabhängig von der Typ-II-Sekretionsfunktion und der Komplex kann dennoch genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Nutzung einer mutierten Variante von *mtrAB*. Bei dieser Variante führt die Mutation in MtrA zu einem Austausch von

N₂₉₀, sowie in MtrB von N₂₁₉ durch die Aminosäuren Lysin (Bücking *et al.*, 2012). Diese Veränderung ermöglicht *S. oneidensis* eine Reduktion von Fe³⁺ ohne weiteres Cytochrom auf der Zelloberfläche (Bücking *et al.*, 2012). Durch die Expression dieser mutierten Variante, könnte in *E. coli* auf die Verwendung von MtrC als Terminale Reduktase verzichtet werden. Unklar ist, in wie weit die volle Funktionalität von MtrA gegeben ist, da diese nicht durch einen Reduktionstest kontrolliert werden kann. Ebenfalls ist bisher keine Aussage über die Faltung von MtrA in *E. coli* möglich, da wissenschaftlich ungeklärt bleibt, in wie weit die Faltung zu *S. oneidensis* vergleichbar ist. Eine Kristallisation von MtrA aus *E. coli* könnte diese Unklarheiten, durch den Vergleich mit der Kristallstruktur von *S. baltica* beantworten und dadurch weitere Erkenntnisse über den Ablauf und Funktionsweise der Ccm-Proteine aufzeigen (Edwards *et al.*, 2020). Wissenschaftlich belegt ist, dass sich die Systeme in der Anzahl der Gene und dem Aufbau der Gencluster unterscheiden (Cianciotto *et al.*, 2005; M Jin *et al.*, 2013). Unklar ist, an welchem Punkt MtrA und MtrB interagieren.

Die Ergebnisse von Kapitel 3.2. deuten auf eine Interaktion des Chaperon Skp und der Protease DegP hin. MtrA ist ebenfalls in der Lage den Einbau von MtrB zu begünstigen. Da lediglich in einer Doppelmutante $\Delta skp\Delta degP$ ohne die Expression von *mtrA* kein MtrB detektiert werden konnte (Abbildung 31), aber die Zugabe eines der Proteine wieder zum Einbau führte, scheinen die drei Proteine eine ähnliche Funktion inne zu haben. Es ist davon auszugehen, dass die Interaktion von MtrA und -B im Periplasma auf dem Weg zum BAM-Komplex stattfindet, da für Skp und DegP dieses Verhalten schon beobachtet werden konnte (Sklar *et al.*, 2007).

Unklar bleibt ob die Interaktion von MtrA und MtrB in *E. coli* vollständig funktioniert. Auffällig ist, dass bei *S. oneidensis* $\Delta mtrA$ im Gegensatz zum WT, die Detektion von MtrB mittels eines Westernblots bei Proben möglich war, die lediglich bei 37°C inkubiert wurden und nicht wie sonst erforderlich bei 95°C (Abbildung 28). Dies ist nur der Fall, wenn MtrB durch einen Strep-Tag, wie bereits im Kapitel 4.1.2. erwähnt, geschützt ist und die Protease DegQ deletiert wurde. Dabei ist von einer Fehlfaltung von MtrB auszugehen, bei der das Epitop des Antikörpers, im Gegensatz zum funktional gefalteten MtrB, frei zugänglich

ist. In diesem Fall ist die Denaturierung bei 95°C der Probe nicht von Nöten, um ein positives Westernblotsignal zu erhalten. Dieses Phänomen konnte bisher nur in einem $\Delta mtrA$ Stamm in *S. oneidensis* beobachtet werden. Somit scheint die ausbleibende Interaktion mit MtrA zu dieser Fehlfaltung zu führen. Jedoch weist *E. coli* in allen Versuchen ein Signal bei 37°C behandelten Proben auf (Abbildung 29), sowie im *S. oneidensis* $\Delta mtrA$. Daher ist in *E. coli* von einer generellen fehlerhaften Interaktion von MtrA und MtrB auszugehen, die normalerweise in *S. oneidensis* zum Abbau des β -Fass-Proteins führt, welcher lediglich in einem $\Delta mtrA \Delta degQ$ Stamm durch die Anheftung eines Strep-Tags verhindert werden kann. Auch wenn der Abbau in *E. coli* unter bestimmten Bedingungen möglich ist, so scheint es keine direkte Kontrolle der Interaktion zu geben. Denkbar wäre eine ähnliche Interaktion wie bei LptD und -E, bei der sich das β -Fass-Protein um LptE zusammensetzt (S. Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017). Bei einer Integration von MtrB ohne das ausfüllende MtrA könnte der Druck der umgebenden Membran den Kollaps der Fass-Struktur herbeiführen und so das Epitop freilegen. Nichtsdestotrotz ist eine Interaktion zu beobachten, da der Einbau von MtrB in einem $\Delta skp \Delta degP$ Stamm nur durch die Expression von *mtrA* möglich ist.

Der Einbau von MtrB ließ sich jedoch auch durch DegP beobachten, da sich dies in Proben eines Δskp Stammes detektieren lässt, auch wenn MtrA nicht vorhanden war. Jedoch ist die Protease nicht essenziell für den Einbau, da eine Detektion von MtrB auch in einem $\Delta degP$ Stamm möglich war. Zudem konnte kein Signal für die Koexpression von *mtrA* in einem $\Delta degP$ Stamm detektieren werden. So scheint Skp ohne DegP nicht in der Lage zu sein MtrB mit MtrA zur Integration in die Membran zu geleiten (Abbildung 31). Damit scheint der Transportweg durch das Periplasma über die Proteine Skp und DegP in *E. coli* eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Proteine bilden eine Art Stressantwort, da sie durch den Stressfaktor σ^E hoch reguliert sind (Redford & Welch, 2006). Durch die Expression von *mtrB* könnte eben dieser σ^E -Faktor ausgelöst werden. Zum einen wäre denkbar, dass durch die fehlende Fähigkeit zum korrekten Einbau von MtrB, die ungefalteten Proteine im Periplasma aggregieren. Des Weiteren könnten sich die lipophilen Aminosäuren von MtrB selbstständig in die Membran einlagern und diese instabilisieren (Raivio &

Silhavy, 1999). Auch wenn Interaktionen zwischen *E. coli* eigenen Chaperonen und MtrB beobachtet werden konnten, zeigte sich, dass das Protein fehlerhaft gefaltet wurde. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die fehlerhaften MtrB Proteine, zu einer Schädigung der Membran führen und dadurch die Stressantwort des σ^E -Faktors bzw. des cpx-Faktors auslösen. Diese cpx-Stressantwort führt zu einer Erhöhung der Expression von *nlpE*, die die anschließende Hochregulation der Gene *skp* und *degP* initiiert (Delhaye *et al.*, 2019; Duguay & Silhavy, 2004; Raivio & Silhavy, 1999). Diese vermeintliche Reaktion, der *E. coli* Zellen könnte den Zusammenhang von MtrB und den Proteinen Skp und DegP, für die Integration erklären. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine unspezifische MtrB-Reaktion von *E. coli* hin, wobei abschließend nicht geklärt werden kann, ob die Interaktion inkorrekt abläuft oder gar ganz ausbleibt.

Ein weiteres wichtiges Indiz für die fehlerhafte Integration von MtrB in *E. coli*, könnte das hoch konservierte Motiv in den Homologen von MtrB sein. Innerhalb der ersten 24 Aminosäuren nach der Signalsequenz für das Sec-System konnte in drei Proteinen ein CKXC Motiv gefunden werden, welches auf eine Disulfidbrücke hinweist (Wee *et al.*, 2014). Da kein vergleichbar stark konserviertes Motiv in MtrA und seinen Homologen gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieser Bereich für die Integration oder Stabilität von MtrB verantwortlich ist und nicht als Interaktionsstelle zwischen MtrA und -B zuständig ist (Edwards *et al.*, 2020). Das CKXC Motiv bildet das Ende des Epitops des Anti-MtrB-I-Antikörpers, so dass zu vermuten ist, dass eine Detektion von MtrB nur möglich ist, wenn diese Brücke nicht vorhanden ist. Dies ist sowohl durch die Behandlung der Proben bei 95°C mit dem SDS-Ladepuffer der Fall wie auch durch das Mercaptoethanol, welches als Reduktionsmittel diese Disulfidbrücken aufbrechen kann. Durch die Detektion von MtrB bei den 37°C behandelten Membranproben von *E. coli*, lässt sich vermuten, dass diese Brücke nie gebildet wird. Um den Faktor der Temperatur auszuschließen wurden in Kapitel 3.5. verschiedene Reduktionsmittel und Temperaturen getestet. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung eines stärkeren Reduktionsmittels zu einer Detektion von MtrB aus *S. oneidensis* WT bei 37°C behandelten Proben führt. Ein Ladepuffer ohne Reduktionsmittel führt auch bei

95°C behandelten Proben nicht zu einer Detektion. Somit ist davon auszugehen, dass diese Disulfidbrücke gebildet wird und die Anlagerung des Antikörpers im intakten Zustand des Proteins durch dessen Tertiärstruktur verhindert wird. *E. coli* scheint diese Brücke nicht ausbilden zu können. Ob dies schlussendlich einen Einfluss auf die Interaktion mit MtrA hat oder nur ein zusätzlicher Faktor bei der Integration ist, kann nicht ausreichend geklärt werden. Auffällig ist jedoch, dass die an der Disulfidbrückenbildung beteiligten Proteine auch für die Ausbildung der Hämgruppen verantwortlich sind. Es wäre also zu klären, ob der Unterschied der Cytochrom maturierenden Proteine von *S. oneidensis* und *E. coli* auch den Unterschied in der Disulfidbrückenausbildung in MtrB bewirkt. Dennoch bleibt nicht vollständig geklärt ob dieser Faltungsunterschied allein durch die Disulfidbrücke entsteht oder ob nicht auch die an der Faltung beteiligten Proteine des BAM-Komplexes Einfluss nehmen.

Zusätzlich weisen weitere Komponenten der beiden BAM-Komplexe von *S. oneidensis* und *E. coli* große Unterschiede auf. BamC von *E. coli* weist dabei eine größere Ähnlichkeit zu dem BamD von *S. oneidensis* auf als zu dem eigentlichen Homolog BamD selbst. Gleiches gilt für BamD von *E. coli* zu BamC aus *S. oneidensis*. Es scheint als wären die beiden Proteine auf Grund der Position ihrer Gene im Genom umgekehrt benannt. Zwischen BamC aus *E. coli* und BamD von *S. oneidensis* größere Unterschiede auf, da ein Abgleich lediglich eine Identität von 23,81% bei einem BlastP ergibt. Auch wenn sich aus dieser Erkenntnis keine Rückschlüsse auf den Ablauf der Integration treffen lassen, so zeigt dies, dass ein umfassenderes Verständnis über die Integration von MtrB in *S. oneidensis* und somit weitere Forschung unabdingbar ist.

4.3. Integration von MtrB in *S. oneidensis*

Die bisherige Forschung zu *S. oneidensis* konzentrierte sich primär auf die Funktionsweise der Elektronenübertragung auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren und nur wenig auf die Integration der verantwortlichen Komplexe. Auch wenn die heterologe Expression des Komplexes in dem nahe verwandten Bakterium *E. coli* einfach erscheint, so konnten mehrere Hürden festgestellt werden, die es nur mit einem weitreichenden Verständnis über die Abläufe der Integration in *S. oneidensis* zu bewältigen gilt. Im folgenden Kapitel wird auf die Grundlage der Erkenntnisse dieser Arbeit ein Modell der Abläufe in *S. oneidensis* aufgestellt.

Nach der Transkription und Translation im Cytoplasma werden die drei Proteine MtrA, -B und -C über das Sec-System durch die innere Membran in das Periplasma geleitet, wo die Sekretionssequenz entfernt wird. An diesem Punkt spaltet sich der Weg der Proteine auf. Während MtrB seinen Weg an die äußere Membran findet, werden die beiden Cytochrome MtrA und MtrC mit dem Hämgruppen ausgestattet. Im Allgemeinen lassen sich Cytochrome in die vier Gruppen a, b, c und d unterteilen (Kranz *et al.*, 2009). Die Cytochrome von *S. oneidensis* werden der Gruppe der c-Typ-Cytochrome zugeordnet, für deren Maturation bis jetzt drei verschiedene Systeme bekannt sind (Fu *et al.*, 2015). Für *S. oneidensis* konnte gezeigt werden, dass die Maturation über das System I abläuft (M Jin *et al.*, 2013). Dabei sind die Proteine CcmABCDEFGHI an der Synthese der Hämgruppen beteiligt (Cianciotto *et al.*, 2005). Dieses System ist in der Gruppe der γ -Proteobacteria weit verbreitet, jedoch hebt sich *S. oneidensis* von den anderen Organismen ab (Cianciotto *et al.*, 2005). Während die Gencluster der *ccm*-Gene bei den meisten γ -Proteobacteria unter einem Operon organisiert sind, teilen sich bei *S. oneidensis* die Gene *ccmABCDE* und *ccmFGHI* auf zwei entgegengesetzte Operons auf (Cianciotto *et al.*, 2005). Zusätzlich stehen die Gene *scyA* und *SO0265* unter einem eigenen Operon (Fu *et al.*, 2015). Nach der Synthese der Hämgruppen (Abbildung 47), im Periplasma werden diese in die Apocytochrome eingesetzt. Die Apocytochrome weisen an den Integrationstellen meist ein CXXCH Motiv auf, welches zuvor von den DsbABCD Proteinen mit einer Disulfidbrücke

zwischen den beiden Cysteinen ausgestattet wird bevor die Hämgruppe an dieser Stelle integriert wird (Sambongi & Ferguson, 1994; Jin *et al.*, 2013).

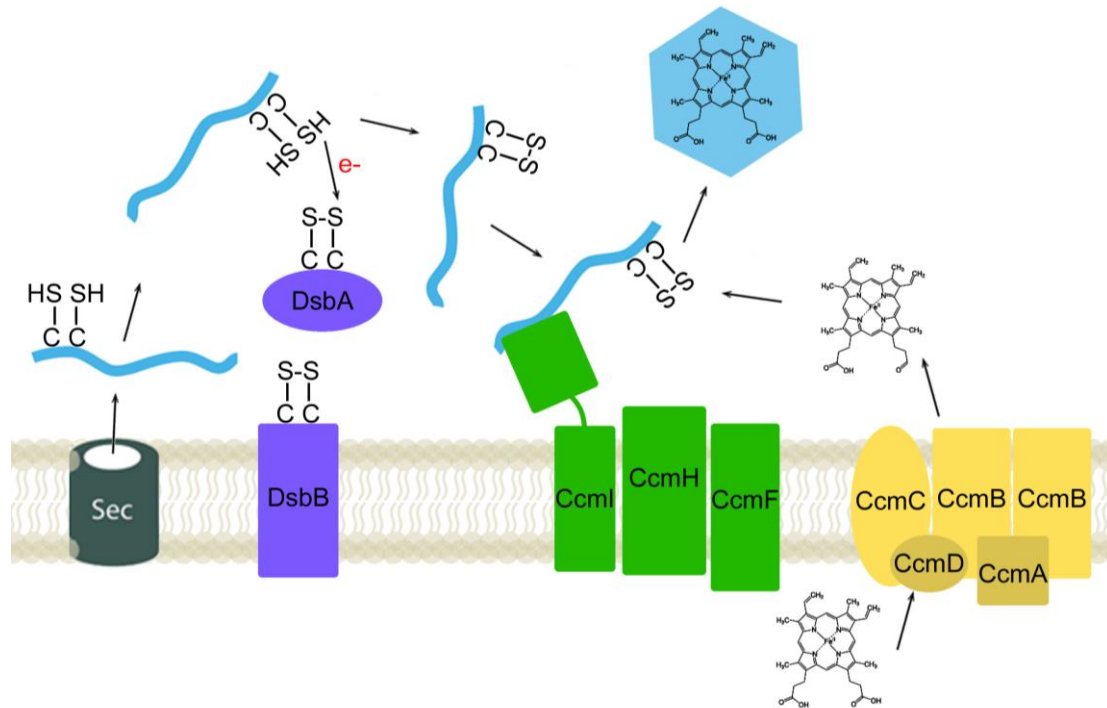


Abbildung 49.: Schematische Darstellung der c-Typ Cytochrom Maturation. Nach dem Transport des Apocytochrom in das Periplasma wird durch die Proteine DsbA und -B die Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen ausgebildet. Die über die Ccm-Proteine in das Periplasma transportierte Hämgruppe wird über die Proteine CcmFHI an die Disulfidbrücke des Cytochroms gesetzt und so das fertige Cytochrom in das Periplasma abgegeben (verändert nach Stevens *et al.*, 2011).

Auch wenn wenig über den genauen Ablauf der Maturation der c-Typ-Cytochrome bekannt ist, weisen die Besonderheiten der Anordnung und Anzahl der *ccm*-Gene in *S. oneidensis* auf einen eigenständigen Syntheseweg, der sich von den anderen Organismen deutlich unterscheidet.

Bereits bekannt ist, dass die Sekretion von MtrC über das Typ-II-Sekretionssystem abläuft. MtrC interagiert anschließend auf der Zelloberfläche mit MtrAB (Shi *et al.*, 2008).

Für das im Periplasma lokalisierte MtrA ist davon auszugehen, dass es nach dem Transport durch die innere Membran vollständig gefaltet wird und mit MtrB assoziiert. An diesem Punkt vereinen sich die beiden Wege und es kommt zur Integration von MtrB in die äußere Membran. Unklar sind jedoch der genaue Ablauf sowie die Art der Interaktion. Die für die Ausbildung der Disulfidbrücken beteiligten Proteine DsbABCD könnten nicht nur einen Einfluss auf die Maturation der Hämgruppen bei MtrA haben, sondern auch auf das

konservierte CKXC Motiv in MtrB reagieren (Guo *et al.*, 2019). So ähnelt dieses Motiv dem CXXC Motiv der DsbA und DsbD Proteine, dass an dieser Stelle ebenfalls eine Disulfidbrücke aufweisen kann (Denoncin & Collet, 2013). Die kovalente Bindung der Disulfidbrücken bedarf für die Vorbereitung der Proben für ein SDS-Gel eines Reduktionsmittels wie β -Mercaptoethanol und einer erhöhten Temperatur von 95°C, um diese Bindungen zu öffnen. Nur durch die Öffnung dieser Bindungen ist eine vollständige Denaturation möglich. Zusätzlich könnten noch ausgebildete Disulfidbrücken das Laufverhalten im SDS-Gel beeinflussen und die spätere Detektion mit einem Antikörper beeinträchtigen, wenn diese im Epitop des Antikörpers eine Bindung verhindern. Die Versuche von Kapitel 3.5. sollten ermitteln, ob die Detektion von MtrB in den Proben der Stämme mit Faltungsdefiziten (alle *E. coli* Stämme und der *S. oneidensis* *mtrB*_{strep} Δ *mtrA* Δ *degQ* Stamm) ein Reduktionsmittel benötigen, um die Bindung des Antikörpers zu ermöglichen. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine die Detektion von MtrB durch ein stärkeres Reduktionsmittel (Dithionit) ohne die erhöhte Temperatur von 95°C auskommt und schon bei 37°C Inkubation eine Detektion ermöglicht. In Abbildung 42 und Abbildung 43 ist zu sehen, dass die Detektion von MtrB aus einer WT-Probe abhängig von Temperatur und Oxidationsmittel ist. So zeigen Dithionit behandelte Proben schon ein Signal bei einer 37°C-Inkubation, während Proben ohne Oxidationsmittel auch bei einer Behandlung bei 95°C kein Signal zeigen. Daher ist davon auszugehen, dass MtrB im Periplasma mit einer Disulfidbrücke an dem CKXC Motiv ausgestattet wird. Diese scheint die Bindung des Antikörpers, dessen Epitop dieses Motiv miteinschließt, bei geschlossener Disulfidbrücke zu verhindern (Abbildung 50).

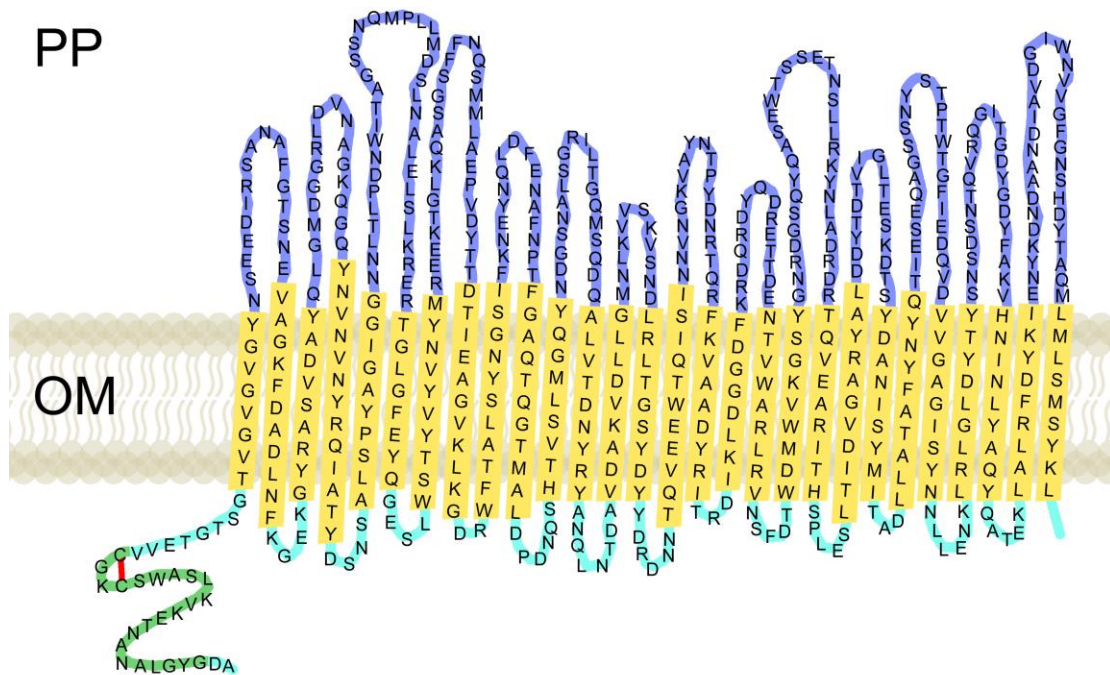


Abbildung 50.: Schematische Darstellung von MtrB in der äußeren Membran. Die großen Loops, welche in das Periplasma gerichtet sind, sind blau dargestellt. Die β -Faltblattstrukturen, welche die Membran durchspannen, sind gelb abgebildet. Türkis sind die kleinen Loops, welche auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, dargestellt. Grün ist das Epitop des Anti-MtrB-Antikörpers markiert. Rot symbolisiert die Disulfidbrücke im CKXC Motiv.

Die Proben aus *E. coli* benötigen im Gegensatz zu dem MtrB aus einem *S. oneidensis* WT keine Inkubation bei 95°C und weisen eine Detektion von MtrB bei einer Inkubation bei 37°C auf. Diese Erkenntnis spricht für ein Ausbleiben der Disulfidbrücke und somit keinen negativen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers. Gleiches konnte für die Proben des *S. oneidensis* *mtrB*_{strep} Δ *mtrA* Δ *degQ* Stammes beobachtet werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken im Zusammenhang mit MtrA steht. Da eine Detektion von MtrB in einem *S. oneidensis* *mtrB*_{strep} Δ *degQ* Stamm bei 37°C inkubierten Proben nicht möglich war. Das CKXC Motiv könnte eine potenzielle Interaktionsstelle von MtrB und MtrA sein. Jedoch konnte in den homologen Proteinen von MtrA in *S. oneidensis* kein konserviertes Motiv gefunden werden. Sollte es sich bei dem CKXC Motiv um eine Interaktionsstelle handeln, so würde man von einer ähnlich konservierten Sequenz in den Interaktionspartner ausgehen. Dies spricht also gegen die Theorie, dass das CKXC Motiv eine Interaktionsstelle zwischen MtrA und -B

darstellt. Der Bereich, in dem sich dieses Motiv befindet, konnte in der Kristallisation von MtrB aus *S. baltica* nicht als Interaktionsstelle der beiden Proteine identifiziert werden. Viel mehr scheinen die ersten vier β -Faltblätter von MtrB eine Struktur zwischen MtrA und der Innenseite von MtrB zu bilden, deren Funktion noch ungeklärt ist (Edwards *et al.*, 2020). Denkbar wäre daher eine Interaktion von MtrB mit einer der Hämgruppen von MtrA. Auffällig ist, dass ein Austausch der Cysteine durch ein Alanin im Einzelnen für das C₄₂ zum Verlust der Eisenreduktion führt, während der Austausch bei C₄₅ keine Veränderung zeigt (Wee *et al.*, 2014). Dabei ist jedoch ungeklärt, ob diese Mutation zum Verlust der Funktion führt oder gar der Einbau von MtrB nicht mehr möglich ist. Zweiteres könnte durch die fehlende Interaktion mit MtrA ausgelöst werden. Somit könnte die Funktion dieses Motiv für eine Interaktion der beiden Protein wichtig sein, auch wenn die eigentlich Interaktion an einer anderen Stelle stattfindet bzw. keine feste Bindung eingeht oder nach der Integration, die die äußere Membran wieder öffnet. Auch wenn sich die genaue Interaktionsstelle nicht abschließend klären lässt, so zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine starke Abhängigkeit zwischen MtrA und -B auf.

Es ist bei MtrA davon auszugehen, dass es mit dem noch ungefalteten MtrB im Periplasma interagiert. Dieser Schritt scheint durch eine Protease kontrolliert zu werden, da die Integration von MtrB ohne die Anwesenheit von MtrA nicht möglich ist, wie die Versuche von Kapitel 3.1. zeigen. Es scheint so als würden MtrA und -B im Periplasma interagieren wobei MtrA dabei als Chaperon für MtrB fungiert. Diese Funktion konnte in *E. coli* beobachtet werden, da in einem $\Delta skp\Delta degP$ Stamm eine Detektion von MtrB nur möglich war, wenn MtrA ebenfalls vorhanden war. Die zusätzliche Expression von *skp* oder *degP* ermöglichte eine Detektion auch ohne die Anwesenheit von MtrA, wie in Kapitel 3.2. zu sehen ist. Daher ist davon auszugehen, dass die Chaperonfunktion von Skp und DegP auch von MtrA übernommen werden kann. Bis jetzt konnte auch keine Interaktion der bekannten Chaperone aus *S. oneidensis* mit MtrB beobachtet werden. Die Detektion von MtrB war in allen Deletionsmutanten möglich und zeigte keinen Einfluss auf die Faltung des β -Fass-Proteins. Zusätzlich wurde in Kapitel 3.2. die Funktion des MtrABC-Komplexes überprüft und kein Unterschied in der Reduktionsrate zum WT festgestellt. Auf Grund

dieser Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass die getesteten Chaperone keinen essenziellen Einfluss auf die Integration von MtrB haben bzw. eine überlappende Funktion parallele Wege ermöglicht. Zusätzlich konnte keine Verbesserung der Faltung von MtrB durch die heterologe Expression der *S. oneidensis* eigenen Chaperone in *E. coli* festgestellt werden (Kapitel 3.4.). Somit ist eher nicht von einer Interaktion von MtrB mit einem der Chaperone auszugehen, sondern es scheint als wäre nur MtrA für den Transport durch das Periplasma nötig und für den Schutz von MtrB verantwortlich. Jedoch ist nicht von einer uneingeschränkten Funktion der *S. oneidensis* Chaperone in *E. coli* auszugehen und somit keine eindeutige Aussage zu treffen.

Ebenfalls unklar ist, welche der periplasmatischen Proteasen den Abbau von MtrB durchführt, bzw. an welchem Punkt die Interaktion von MtrA und -B überprüft wird. In *E. coli* konnte bereits ein strukturell ähnlicher Komplex identifiziert werden. Dieser Komplex besteht wie bereits erwähnt aus den Proteinen LptD und LptE, die für die Synthese der Liposacharidschicht verantwortlich sind (Dong *et al.*, 2014). LptD selbst ist ein β -Fass-Protein, das wie MtrB in der äußeren Membran sitzt (Chng *et al.*, 2010). Es besteht aus 26 β -Faltblättern und ist damit in der Größe der Pore vergleichbar mit MtrB, welches mit 28 β -Faltblättern die äußere Membran durchspannt (Beliaev & Saffarini, 1998; Qiao *et al.*, 2014). Wie auch bei MtrB scheinen N- und C-Terminus der Proteine nicht miteinander zu agieren um die Fass-Struktur zu schließen (Qiao *et al.*, 2014). Die wichtigste Gemeinsamkeit besteht in der Interaktion mit einem kleineren Protein, welches durch das β -Fass-Protein in die äußere Membran verankert wird. So interagiert LptD mit LptE, welches zusätzlich einen großen Einfluss auf die Stabilität des β -Fass-Protein hat, da eine geringere Konzentration an LptE zu einem Abbau von LptD führt (Chimalakonda *et al.*, 2011). Diese Parallelen zu MtrAB könnten helfen, ein besseres Verständnis für deren Integration zu erlangen. Wie für MtrAB schon bekannt ist, werden LptE und -D ebenfalls nach der Transkription über das Sec-System in das Periplasma transportiert, um anschließend über den BAM-Komplex in die äußere Membran integriert zu werden (Soltes *et al.*, 2017). Auf dem Weg bis hin zur äußeren Membran konnten drei Kontrollschritte gefunden werden, die durch die Proteasen DegP, BepA und YcaL durchgeführt

werden (S. Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017). Dabei scheint DegP den Transport durch das Periplasma zu kontrollieren, während YcaL die Interaktion des ungefalteten OMP mit dem BAM-Komplex überprüft, bevor BepA die Faltung und Integration des OMPs überwacht und im Falle von LptD den Abbau einleitet, wenn LptE nicht vorhanden ist (Soltes *et al.*, 2017). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden die beiden Proteasen BepA und YcaL auch in *S. oneidensis* über BlastP gesucht. Es konnte eine homologe Protease mit einer Identität von 44,28% zu BepA gefunden werden, die mit der ursprünglichen Bezeichnung YfgC benannt ist, sowie ein Homolog zu YcaL mit einer Identität von 27,27%, das bis jetzt noch ohne Benennung ist. Leider war es nicht möglich, diese Proteasen in einem *S. oneidensis* $\Delta mtrA$ zusätzlich zu deletieren, um anschließend die Integration von MtrB zu überprüfen und somit den Kontrollmechanismus zu identifizieren. Lediglich die Deletion im WT war möglich, jedoch zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1. keinen Einfluss der Deletionen auf die Faltung oder Funktion des MtrABC-Komplexes. Auch wenn die Versuche bis jetzt noch keinen klareren Zusammenhang der Proteasen mit MtrB feststellen konnten, deuten die starken Parallelen auf ein ähnliches System hin. So könnte YfgC für die Kontrolle der Interaktion von MtrA und -B verantwortlich sein und damit die bisher in DegQ vermutete Funktion innehaben. Zwar konnten bei der Koexpression von *yfgC* in *E. coli* kein Einfluss auf die MtrB-Varianten festgestellt werden, jedoch bleibt dabei unklar, ob die *E. coli* eigenen Chaperone und Proteasen eine Interaktion verhindern bzw. die Unterschiede der beiden BAM-Komplexe zu groß ist, damit eine Interaktion mit dem heterologen Protein stattfinden kann. Da BepA in *E. coli* mit BamD assoziiert ist, ist davon auszugehen, dass in *S. oneidensis* eine ähnliche Funktion vorliegt (Daimon *et al.*, 2017). Jedoch zeigen die beiden BamD Homologe aus *E. coli* und *S. oneidensis* kaum Ähnlichkeiten, so dass vermutlich eine Interaktion bei heterologer Expression nicht möglich ist. Das Gleiche gilt für die homologe Protease YcaL in *S. oneidensis*, die nur auf eine Identität von 23,23% kommt, jedoch scheint diese nicht mit dem BAM-Komplex zu interagieren, sondern über einen Lipidanker in der äußeren Membran verankert zu sein (Soltes *et al.*, 2017). Auch wenn für beide Proteasen eine Chaperoneigenschaft festgestellt werden konnte, scheint diese bei MtrB nicht

essenziell zu sein, da eine Deletion keinen Einfluss auf die Funktion des Komplexes hat (S. Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017). Auch wenn die Versuche zu YfgC keine großen Erkenntnisse zuließen, bleibt diese Protease für den Einbau von MtrB interessant. So scheint sie die Faltung der β -Fass-Protein noch während der Integration in die äußere Membran zu kontrollieren, im Fall von LptE und -D kontrolliert sie die Interaktion der beiden Proteine und die anschließende Faltung der β -Fass-Proteins um das integrierte LptE (Daimon *et al.*, 2017; S. Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017). Sollte die homologe Protease YfgC aus *S. oneidensis* eine vergleichbare Funktion besitzen, so könnte dies das Faltungsdefizit von MtrB im *S. oneidensis mtrB_{strep} Δ mtrA Δ degQ* Stamm erklären. Die Abwesenheit von MtrA sollte zur Degradation von MtrB durch die Protease YfgC führen. Hierbei scheint jedoch das Strep-Tag an MtrB diesen Abbau zu verhindern, wie die Versuche von Kapitel 3.1. zeigen. In diesem Fall wird MtrB ohne MtrA in die Membran integriert und die Detektion von MtrB ist in Proben, welche lediglich bei 37°C inkubiert wurden, möglich (Abbildung 26). Wie schon erwähnt scheint dies auf eine fehlende Ausbildung der Disulfidbrücke zurückzuführen zu sein, welche das sonst verschlossene Epitop des Antikörpers frei legt. Somit scheint MtrA nicht nur für die Ausbildung der Disulfidbrücke relevant zu sein, sondern ebenfalls für die Gesamtstruktur des Komplexes eine wichtige Rolle spielen zu können. Auf Grundlage der Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass ohne MtrA, um das die β -Faltblattstrukturen gesetzt werden können, die Stabilität von MtrB nicht gegeben ist und der Außendruck durch die äußere Membran zu einem Kollaps des Proteins führt. Die sich ausbildenden Wasserstoffbrücken zwischen der C-terminalen Hälfte von MtrA und der Innenseite von MtrB könnten nicht nur der Fixierung von MtrA dienen, sondern zusätzlich für die Faltung der einzelnen β -Faltblätter um MtrA herum von Nöten sein. Die fehlende Interaktion von C- und N-Terminus des β -Fass-Proteins könnte eben diesen Kollaps erklären, da so kein fester Ringschluss möglich ist und die Struktur an dieser Stelle leicht einfallen könnte. Durch die Integration des kollabierten bzw. inkorrekt gefalteten β -Fass-Proteins in die äußere Membran ist es für Proteasen nicht mehr zugänglich, da diese nicht in die lipophile Membran eindringen können, um die Aminosäurekette abzubauen. Aus diesem

Grund ist die Detektion von MtrB auch in dieser Form möglich. Zusätzlich erklärt die fehlende Tertiärstruktur die Freilegung der Epitope und es wird keine erhöhte Temperatur bei der Behandlung der SDS-Gel-Proben benötigt, um dieses frei zu legen. Eine genaue Aussage über die Funktion und die Auswirkungen der vermeintlichen Disulfidbrücke, des CKXC-Motivs lässt sich mit der aktuellen Ergebnislage noch nicht treffen, jedoch zeigt das Phänomen der Fehlfaltung von MtrB in *E. coli* deutlich, dass weitere Erkenntnisse über die Integration von MtrB gewonnen werden müssen, bevor es zu einem Einsatz in *E. coli* kommen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten einen wichtigen Schritt beim Einbau von MtrB im Zusammenhang mit DegQ genauer aufklären und neue vermeintliche Interaktionspartner, wie YfgC, identifizieren. Zugleich ermöglichten die neuen Erkenntnisse wichtige Anhaltspunkte für die Interaktion von MtrA und -B, durch das CKXC Motiv aufzeigen. Auch die Aufdeckung der Unterschiede bei der Integration von MtrB in *E. coli* und *S. oneidensis* bilden die Grundlage für eine weitere Forschung und spätere Anwendung eines zur Eisenreduktion befähigten *E. coli* Stammes.

4.4. Ausblick

Auch wenn eine Interaktion zwischen MtrB und DegQ nicht völlig ausgeschlossen werden kann, so deuten die Ergebnisse auf die Beteiligung einer weiteren Protease hin. Die bisherigen Erkenntnisse über die Integration von β -Fass-Proteinen rückt dabei die Protease YfgC in den Vordergrund (Chimalakonda *et al.*, 2011; Chng *et al.*, 2010; S. I. Narita *et al.*, 2013; Soltes *et al.*, 2017). Diese könnte die Interaktion von MtrA und -B kontrollieren. Die Herstellung eines *S. oneidensis* $\Delta mtrA\Delta yfgC$ Stamm und die anschließende Überprüfung der Integration von MtrB könnte genauere Aufschlüsse über die Funktionsweise der Protease erbringen. Zusätzliche Untersuchungen zur Überprüfung aller an dem Einbau von MtrB beteiligten Proteine sind unabdingbar für die Aufstellung eines genauen Modells der Integration. So gilt es das besondere System der Hämgruppenausbildung bei *S. oneidensis* genauer zu verstehen.

Die einzigartige Organisation der *ccm*-Gene, unter zwei Operons deuten auf ein speziell auf die hohe Hämkonzentration angepasstes System, bei *S. oneidensis* hin (Cianciotto *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2019; Miao Jin *et al.*, 2013). Denkbar ist dabei, dass die *E. coli* eigenen Ccm-Proteine nicht in der Lage sind die Cytochrome von *S. oneidensis* korrekt zu maturieren. Aus diesem Grund sollte durch den Vergleich der Kristallstrukturen der an dem Elektronentransport beteiligten Cytochrome die korrekte Maturation in *E. coli* überprüft werden. Zusätzlich wäre die Herstellung eines optimierten Plasmids der *ccm*-Gene von *S. oneidensis* von Vorteil, um das pEC86 Plasmid mit den *ccm*-Genen von *E. coli* ersetzen zu können (Arslan *et al.*, 1998).

In diesem Schritt sollte auch die Funktion und Ausbildung der Disulfidbrücke in MtrB genauer untersucht werden. Die Beteiligung der DsbABCD Proteine und deren Funktion könnten ebenfalls für die Übertragung des MtrABC-Komplexes in *E. coli* relevant sein, da diese scheinbar ein essenzieller Punkt für die Interaktion von MtrA und -B ist, sowie für die Faltung und damit für die Funktion von MtrB. Dazu sollte die genaue Funktion des CKXC Motives verstanden sein. Die Funktion könnte über die einfache Mutation des Motivs zu einem AKXC bzw. CKXA, wie Wee *et al.* (2014) bereits durchgeführt haben ermittelt werden.

Dabei wurden die Cysteine durch Alanine ersetzt. Jedoch wurden die mutierten Zellen lediglich auf die Reduktion von Fe^{3+} getestet und nicht auf die Integration von MtrB. Dazu sollten die mutierte Sequenz in *S. oneidensis* exprimiert werden und anschließend die Auswirkungen auf MtrB und die Interaktion mit MtrA überprüft werden. Somit könnte geklärt werden ob das Motiv nur für den Elektronentransport relevant ist oder eine Schlüsselfunktion für die Interaktion mit MtrA innehat. Schlussendlich ist zu klären, ob die Funktion des BAM-Komplexes von *E. coli* trotz der strukturellen Unterschiede kompatibel für den Einbau von MtrB ist.

Ohne ein solches weitreichendes Verständnis über die beteiligten Proteine, deren genaue Funktionsweise und den Ablauf jedes einzelnen Schrittes, ist von einer Nutzung eines zur extrazellulären Elektronenübertragung befähigten *E. coli* nicht zu rechnen. Daher trägt diese Arbeit zu der wichtigen Grundlagenforschung bei, die in Zukunft eine Nutzung von EET ermöglichen kann.

Danksagung

In erster Linie danke ich der gesamten Arbeitsgruppe von Professor Gescher, die mir diese Arbeit ermöglichte und im Besonderen bei Problemen immer zur Stelle war, sowie immer wieder mit Tipps und Ideen half die Hürden zu überwinden.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Johannes Gescher, der mir nicht nur diese Abschlussarbeit ermöglichte, sondern stets mit neuen Ideen, erweiterten Blickwinkeln und frischer Motivation zur Stelle war. Vielen Dank für deinen Einsatz, Johannes.

Danken möchte ich aber auch für die unzähligen kleinen Momente, die vielleicht nicht gerade direkt Einfluss auf die Ergebnisse meiner Arbeit genommen haben, aber immer für neue Kraft und Energie sorgten. Danke für den Schinken, für die Kreativpausen und die daraus entstandenen Kunstwerke, für die Gemälde, besonders für den reitenden Astronauten, dafür, dass ihr euch an meinem PC wie zuhause fühlt und den Spontankauf der Espressomaschine, für die Gratisproben und „gern geschehen“, für den schönsten Büro-Adventskalender und die kurzen Ausflüge in die Kindheit, für „ich probiere das mal aus!“ und das neu organisierte Photometer, für die Hindenburg und alle anderen geteilten Momente, für die Zielscheibe und das Befüllen der Messzylinder, für 16 A und 12 V, für Gespräche über Gott und die Welt und einen brüderlich geteilten Schreibtisch, für ein offenes Ohr und ein loses Mundwerk, für eine endlose Geschichte auf den Laborplätzen und für die cooleren Ninja-Pinguine, für die Runden am Kicker und für jedes unmarkierte Bier, auf das ich aufmerksam gemacht wurde und für alle vergessenen Momente.

Aber ich möchte mich auch bei allen bedanken, die abseits von dieser Arbeit meine Abwesenheit, Launen, Verspätungen, Müdigkeit und Rastlosigkeit voller Verständnis ertragen haben.

5 Literatur

- Adkins, S. & Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in Agarose Gels as Migrating Colored Bands: Applications for Preparative Gels and Educational Demonstrations. *Analytical Biochemistry*, 240(1), 17–23.
- Albrecht, R., Schütz, M., Oberhettinger, P., Faulstich, M., Bermejo, I., Rudel, T. *et al.* (2014). Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(6), 1779–1789. International Union of Crystallography.
- Albrecht, R. & Zeth, K. (2011). Structural basis of outer membrane protein biogenesis in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27792–27803.
- Alcock, F. H., Grossmann, J. G., Gentle, I. E., Likić, V. A., Lithgow, T. & Tokatlidis, K. (2008). Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochemical Journal*, 409(2), 377–387.
- Alves, M. N., Neto, S. E., Alves, A. S., Fonseca, B. M., Carrêlo, A., Pacheco, I. *et al.* (2015). Characterization of the periplasmic redox network that sustains the versatile anaerobic metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in microbiology*, 6, 665. Frontiers Media SA.
- Arié, J. P., Sassoon, N. & Betton, J. M. (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 39(1), 199–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02250.x>

- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. & Thöny-Meyer, L. (1998). Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-Type Cytochrome Subunits of the cbb3 Oxidase in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(3), 744–747.
- Bakelar, J., Buchanan, S. K. & Noinaj, N. (2016). The structure of the β -barrel assembly machinery complex. *Science*, 351(6269), 180–186. American Association for the Advancement of Science.
- Beeumen, J. J. Van, Leys, D., Tsapin, A. S., Nealson, K. H., Meyer, T. E. & Cusanovich, M. A. (1999). Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Nature Structural Biology*, 6(12), 1113–1117.
- Behrens-Kneip, S. (2010). The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(7), 421–428.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X. & Gross, C. A. (2001). The SurA periplasmic PPlase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *The EMBO Journal*, 20(1), 285–294.
- Beliaev, A. S. & Saffarini, D. A. (1998). *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Journal of bacteriology*, 180(23), 6292–7.
- 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(3), 722–30.

- Bitto, E. & McKay, D. B. (2003). The Periplasmic Molecular Chaperone Protein SurA Binds a Peptide Motif That Is Characteristic of Integral Outer Membrane Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49316–49322.
- Bollati, M., Villa, R., Gourlay, L. J., Benedet, M., Dehò, G., Polissi, A. *et al.* (2015). Crystal structure of LptH, the periplasmic component of the lipopolysaccharide transport machinery from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Journal*, 282(10), 1980–1997. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. & Lovley, D. R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science*, 295(5554), 483–485.
- Bos, M. P., Robert, V. & Tommassen, J. (2007). Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 191–214.
- Bouhenni, R., Gehrke, A. & Saffarini, D. (2005). Identification of genes involved in cytochrome *c* biogenesis in *Shewanella oneidensis*, using a modified mariner transposon. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4935–7. American Society for Microbiology (ASM).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. Academic Press.
- Brokx, S. J., Ellison, M., Locke, T., Bottorff, D., Frost, L. & Weiner, J. H. (2004). Genome-wide analysis of lipoprotein expression in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of bacteriology*, 186(10), 3254–8. American Society for Microbiology (ASM).

- Brutinel, E. D. & Gralnick, J. A. (2012). Anomalies of the anaerobic tricarboxylic acid cycle in *Shewanella oneidensis* revealed by Tn-seq. *Molecular Microbiology*, 86(2), 273–283.
- Bücking, C., Piepenbrock, A., Kappler, A. & Gescher, J. (2012). Outer-membrane cytochrome-independent reduction of extracellular electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(8), 2144–2157. *Microbiology*.
- Bücking, 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(2), 144–151.
- Burgess, N. K., Dao, T. P., Stanley, A. M. & Fleming, K. G. (2008). β -Barrel Proteins That Reside in the *Escherichia coli* Outer Membrane *in Vivo* Demonstrate Varied Folding Behavior *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 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. *Analytical biochemistry*, 112(2), 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5209–5217.
- Calmettes, C., Judd, A. & Moraes, T. F. (2015). Structural Aspects of Bacterial Outer Membrane Protein Assembly (S. 255–270). Springer, Cham.

- Carpentier, W., De Smet, L., Van Beeumen, J. & Brigé, A. (2005). Respiration and growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 using vanadate as the sole electron acceptor. *Journal of bacteriology*, 187(10), 3293–301. American Society for Microbiology (ASM).
- Charlson, E. S., Werner, J. N. & Misra, R. (2006). Differential Effects of yfgL Mutation on *Escherichia coli* Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7186–7194.
- Chimalakonda, G., Ruiz, N., Chng, S. S., Garner, R. A., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2011). Lipoprotein LptE is required for the assembly of LptD by the β -barrel assembly machine in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), 2492–2497.
- Chng, S. S., Ruiz, N., Chimalakonda, G., Silhavy, T. J. & Kahne, D. (2010). Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), 5363–5368. National Academy of Sciences.
- Chum, A. P., Shoemaker, S. R., Fleming, P. J. & Fleming, K. G. (2019). Plasticity and transient binding are key ingredients of the periplasmic chaperone network. *Protein Science*, 28(7), pro.3641. John Wiley & Sons, Ltd.
- Cianciotto, N. P., Cornelis, P. & Baysse, C. (2005, Juni). Impact of the bacterial type I cytochrome *c* maturation system on different biological processes. *Molecular Microbiology*.
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A. C., Loch, C. *et al.* (2007). Structure of the Membrane Protein FhaC: A Member of the Omp85-TpsB Transporter Superfamily. *Science*, 317(5840), 957–961.

- Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J., Hall, A., White, G. F., Bradley, J. *et al.* (2011). Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9384–9389.
- de Cock, H., Struyvé, 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. *Journal of Molecular Biology*, 269(4), 473–478.
- Coursolle, D. & Gralnick, J. A. (2010). Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Molecular Microbiology*, 77(4), no-no.
- Coursolle, D. & Gralnick, J. A. (2012). Reconstruction of Extracellular Respiratory Pathways for Iron(III) Reduction in *Shewanella oneidensis* Strain MR-1. *Frontiers in Microbiology*, 3, 56.
- Cranford-Smith, T. & Huber, D. (2018). The way is the goal: how SecA transports proteins across the cytoplasmic membrane in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 365(11). Narnia.
- Daimon, Y., Iwama-Masui, C., Tanaka, Y., Shiota, T., Suzuki, T., Miyazaki, R. *et al.* (2017). The TPR domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the β -barrel assembly machinery complex. *Molecular Microbiology*, 106(5), 760–776. Blackwell Publishing Ltd.
- Dale, J. R., Wade, R., Dichristina, T. J. & 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(3), 1036–43. American Society for Microbiology (ASM).

- Deisenhofer, J., Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L. *et al.* (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature Structural Biology*, 6(1), 56–63.
- Delhaye, A., Laloux, G. & Collet, J. F. (2019). The lipoprotein NlpE is a cpx sensor that serves as a sentinel for protein sorting and folding defects in the *Escherichia coli* envelope. *Journal of Bacteriology*, 209(10). American Society for Microbiology.
- Denoncin, K. & Collet, J. F. (2013). Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: Major achievements and challenges ahead. *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc.
- Dong, H., Xiang, Q., Gu, Y., Wang, Z., Paterson, N. G., Stansfeld, P. J. *et al.* (2014). Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature*, 511(7507), 52–56. Nature Publishing Group.
- Driessen, A. J. M. & Nouwen, N. (2008). Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 643–667. Annual Reviews .
- Duguay, A. R. & Silhavy, T. J. (2004). Quality control in the bacterial periplasm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1694(1–3), 121–134.
- Edwards, M. J., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Richardson, D. J. & Clarke, T. A. (2012). Analysis of structural MtrC models based on homology with the crystal structure of MtrF. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1181–1185.
- Edwards, M. J., White, G. F., Butt, J. N., Richardson, D. J. & Clarke, T. A. (2020). The Crystal Structure of a Biological Insulated Transmembrane Molecular Wire. *Cell*, 181(3), 665-673.e10. Cell Press.

- Edwards, M. J., White, G. F., Norman, M., Tome-Fernandez, A., Ainsworth, E., Shi, L. *et al.* (2015). Redox Linked Flavin Sites in Extracellular Decaheme Proteins Involved in Microbe-Mineral Electron Transfer. *Scientific Reports*, 5(1), 11677. Nature Publishing Group.
- El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J. *et al.* (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18127–18131.
- Fairman, J. W., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. (2011). The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(4), 523–531.
- Firer-Sherwood, M. A., Bewley, K. D., Mock, J.-Y. & Elliott, S. J. (2011). Tools for resolving complexity in the electron transfer networks of multiheme cytochromes *c*. *Metallomics*, 3(4), 344.
- Flynn, C. M., Hunt, K. A., Gralnick, J. A. & Sreenc, F. (2012). Construction and elementary mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosystems*, 107(2), 120–128.
- Fonseca, B. M., Paquete, C. M., Neto, S. E., Pacheco, I., Soares, C. M. & Louro, R. O. (2013). Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochemical Journal*, 449(1), 101–108.
- Fu, H., Jin, M., Wan, F. & Gao, H. (2015). *S hewanella oneidensis* cytochrome *c* maturation component Ccml is essential for heme attachment at the non-canonical motif of nitrite reductase NrfA. *Molecular Microbiology*, 95(3), 410–425. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).

- Ge, X., Lyu, Z. X., Liu, Y., Wang, R., Zhao, X. S., Fu, X. *et al.* (2014). Identification of FkpA as a key quality control factor for the biogenesis of outer membrane proteins under heat shock conditions. *Journal of Bacteriology*, 196(3), 672–680.
- Gentle, I. E., Burri, L. & Lithgow, T. (2005). Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1216–1225.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. Nature Publishing Group.
- Goh, E.-B., Bledsoe, P. J., Chen, L.-L., Gyaneshwar, P., Stewart, V. & Igo, M. M. (2005). Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *Journal of bacteriology*, 187(14), 4890–9. American Society for Microbiology Journals.
- Gralnick, J. A. & Newman, D. K. (2007). Extracellular respiration. *Molecular microbiology*, 65(1), 1–11. Howard Hughes Medical Institute.
- 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*, 103(12), 4669–4674.
- Gu, Y., Li, H., Dong, H., Zeng, Y., Zhang, Z., Paterson, N. G. *et al.* (2016). Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. *Nature*, 531(7592), 64–69. Nature Publishing Group.

- Guo, K., Wang, W., Wang, H., Lu, Z. & Gao, H. (2019). Complex oxidation of apocytochromes c during bacterial cytochrome c maturation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(24). American Society for Microbiology.
- Hagan, C. L., Kim, S. & Kahne, D. (2010). Reconstitution of Outer Membrane Protein Assembly from Purified Components. *Science*, 328(5980), 890–892.
- Hagan, C. L., Silhavy, T. J. & Kahne, D. (2011). β -Barrel Membrane Protein Assembly by the Bam Complex. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 189–210.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557–80.
- Han'guk Sanöþ Misaengmul Hakhoe., B. H., Kim, H. J., Hyun, M. S. & Park, D. H. (1999). *Journal of microbiology and biotechnology. Journal of Microbiology and Biotechnology* (Band 9). Korean Society for Applied Microbiology.
- Hayashi, S. & Wu, H. C. (1990). Lipoproteins in bacteria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 22(3), 451–71.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. & Götz, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular microbiology*, 24(5), 1013–24.
- Heinz, E., Selkrig, J., Belousoff, M. J. & Lithgow, T. (2015). Evolution of the Translocation and Assembly Module (TAM). *Genome biology and evolution*, 7(6), 1628–43. Oxford University Press.

- Hennecke, G., Nolte, J., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J. & Behrens, S. (2005). The Periplasmic Chaperone SurA Exploits Two Features Characteristic of Integral Outer Membrane Proteins for Selective Substrate Recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23540–23548.
- Heuck, A., Schleiffer, A. & Clausen, T. (2011). Augmenting β -Augmentation: Structural Basis of How BamB Binds BamA and May Support Folding of Outer Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 406(5), 659–666.
- 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(13), 3345–3351.
- Iordanov, I., Renault, M., Réat, V., Bosshart, P. D., Engel, A., Saurel, O. *et al.* (2012). Dynamics of *Klebsiella pneumoniae* OmpA transmembrane domain: The four extracellular loops display restricted motion behavior in micelles and in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(9), 2344–2353.
- Jiang, J., Zhang, X., Chen, Y., Wu, Y., Zhou, Z. H., Chang, Z. *et al.* (2008). Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11939–11944. National Academy of Sciences.
- Jin, M., Jiang, Y., Sun, L., Yin, J. & Fu, H. (2013). Unique Organizational and Functional Features of the Cytochrome *c* Maturation System in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE*, 8(9), 75610.

- Jin, Miao, Jiang, Y., Sun, L., Yin, J., Fu, H., Wu, G. *et al.* (2013). Unique Organizational and Functional Features of the Cytochrome *c* Maturation System in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE*, 8(9), e75610. Public Library of Science.
- Jones, M. E., Fennessey, C. M., DiChristina, T. J. & Tallefert, 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(4), 938–950.
- Josts, I., Stubenrauch, C. J., Vadlamani, G., Mosbahi, K., Walker, D., Lithgow, T. *et al.* (2017). The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic β Taco Fold. *Structure*, 25(12), 1898-1906.e5. Cell Press.
- Kim, K. H., Aulakh, S. & Paetzel, M. (2012). The bacterial outer membrane β -barrel assembly machinery. *Protein Science*, 21(6), 751–768.
- Kim, K. H., Aulakh, S., Tan, W. & Paetzel, M. (2011). Crystallographic analysis of the C-terminal domain of the *Escherichia coli* lipoprotein BamC. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(11), 1350–1358.
- 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(5840), 961–964.
- Knowles, T. J., Bobat, S., Jeeves, M., Henderson, I. R. & Overduin, M. (2007). Secondary structure and ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the *Escherichia coli* YaeT POTRA domain. *Biomolecular NMR Assignments*, 1(1), 113–115.

- Knowles, T. J., McClelland, D. M., Rajesh, S., Henderson, I. R. & Overduin, M. (2009). Secondary structure and ¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignments of BamC, a component of the outer membrane protein assembly machinery in *Escherichia coli*. *Biomolecular NMR Assignments*, 3(2), 203–206.
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M. & Henderson, I. R. (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 206–214. Nature Publishing Group.
- Kotloski, N. J. & Gralnick, J. A. (2013). Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*, 4(1).
- Kranz, R. G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.-S. & Frawley, E. R. (2009). Cytochrome *c* biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(3), 510–28, Table of Contents.
- Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H. R., Ehrmann, M. & Clausen, T. (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, 453(7197), 885–890. Nature Publishing Group.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. Nature Publishing Group.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4414–4426.

- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S. *et al.* (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental science & technology*, 40(17), 5181–92.
- Logan, B. E. & Rabaey, K. (2012). Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science*, 337(6095), 686–690.
- Lundrigan, M. D. & Kadner, R. J. (1986). Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *The Journal of biological chemistry*, 261(23), 10797–801.
- 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. *Journal of Basic Microbiology*, 43(4), 312–327.
- Malinverni, J. C. & Silhavy, T. J. (2011). Assembly of Outer Membrane β -Barrel Proteins: the Bam Complex. *EcoSal Plus*, 4(2). NIH Public Access.
- 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*, 105(10), 3968–3973.
- Massai, F., Saleeb, M., Doruk, T., Elofsson, M. & Forsberg, Å. (2019). Development, Optimization, and Validation of a High Throughput Screening Assay for Identification of Tat and Type II Secretion Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 250. Frontiers Media SA.

- Meyer, T. E., Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., De Smet, L., Frishman, D., Neilson, K. H. *et al.* (2004). Identification of 42 Possible Cytochrome C Genes in the *Shewanella oneidensis* Genome and Characterization of Six Soluble Cytochromes. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 8(1), 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(4), 871–884.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–73.
- 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. *Journal of bacteriology*, 179(4), 1143–52.
- Myers, C. R. & Neilson, K. H. (1988). Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor. *Science*, 240(4857), 1319–1321.
- Myers, J. M. & Myers, C. R. (2002). Genetic complementation of an outer membrane cytochrome *omcB* mutant of *Shewanella putrefaciens* MR-1 requires *omcB* plus downstream DNA. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 2781–93.
- Nakae, T. (1976). Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(3), 877–84.

- Narita, S. I., Masui, C., Suzuki, T., Dohmae, N. & Akiyama, Y. (2013). Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of β -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), E3612-21.
- Narita, S., Masui, C., Suzuki, T., Dohmae, N. & Akiyama, Y. (2013). Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of β -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), E3612-21. National Academy of Sciences.
- Narita, S., Matsuyama, S. & Tokuda, H. (2004). Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 182(1), 1–6. Springer-Verlag.
- Narita, S. & Tokuda, H. (2006). An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Letters*, 580(4), 1164–1170. John Wiley & Sons, Ltd.
- Negm, R. S. & Pistole, T. G. (1999). The porin OmpC of *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages. *Canadian journal of microbiology*, 45(8), 658–69.
- Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *The Journal of biological chemistry*, 269(6), 3905–8.
- Noinaj, N., Fairman, J. W. & Buchanan, S. K. (2011). The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex. *Journal of Molecular Biology*, 407(2), 248–260.
- Onufryk, C., Crouch, M.-L., Fang, F. C. & Gross, C. A. (2005). Characterization of Six Lipoproteins in the E Regulon. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4552–4561.

- Pautsch, A. & Schulz, G. E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nature Structural Biology*, 5(11), 1013–1017.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A. *et al.* (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*, 111(35), 12883–12888. National Academy of Sciences.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27758–27765.
- Qiao, S., Luo, Q., Zhao, Y., Zhang, X. C. & Huang, Y. (2014). Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature*, 511(7507), 108–111. Nature Publishing Group.
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 374(1), 91–105.
- Raivio, T. L. & Silhavy, T. J. (1999). The $\sigma(E)$ and Cpx regulatory pathways: Overlapping but distinct envelope stress responses. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 159–165. Current Biology Ltd.
- Ranava, D., Caumont-Sarcos, A., Albenne, C. & Ieva, R. (2018a, Mai 1). Bacterial machineries for the assembly of membrane-embedded β -barrel proteins. *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press.

- Ranava, D., Caumont-Sarcos, A., Albenne, C. & Ieva, R. (2018b). Bacterial machineries for the assembly of membrane-embedded β -barrel proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 365(10). Narnia.
- Redford, P. & Welch, R. A. (2006). Role of sigma E-regulated genes in *Escherichia coli* uropathogenesis. *Infection and immunity*, 74(7), 4030–8. American Society for Microbiology (ASM).
- Ricci, D. P. & Silhavy, T. J. (2019). Outer Membrane Protein Insertion by the β -barrel Assembly Machine. *EcoSal Plus*, 8(2). American Society for Microbiology.
- Richter, K., Schicklberger, M. & Gescher, J. (2012). Dissimilatory Reduction of Extracellular Electron Acceptors in Anaerobic Respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 913–921.
- Ross, D. E., Ruebush, S. S., Brantley, S. L., Hartshorne, R. S., Clarke, T. A., Richardson, D. J. *et al.* (2007). Characterization of Protein-Protein Interactions Involved in Iron Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5797–5808.
- Rouvière, P. E. & Gross, C. A. (1996). SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes & development*, 10(24), 3170–82.
- Sambongi, Y. & Ferguson, S. J. (1994). Specific thiol compounds complement deficiency in c-type cytochrome biogenesis in *Escherichia coli* carrying a mutation in a membrane-bound disulphide isomerase-like protein. *FEBS Letters*, 353(3), 235–238. John Wiley & Sons, Ltd.

- Sandoval, C. M., Baker, S. L., Jansen, K., Metzner, S. I. & Sousa, M. C. (2011). Crystal structure of BamD: an essential component of the β -Barrel assembly machinery of gram-negative bacteria. *Journal of molecular biology*, 409(3), 348–57. NIH Public Access.
- Sawa, J., Malet, H., Krojer, T., Canellas, F., Ehrmann, M. & Clausen, T. (2011). Molecular adaptation of the DegQ protease to exert protein quality control in the bacterial cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30680–30690.
- Schicklberger, M., Bücking, C., Schuetz, B., Heide, H. & Gescher, J. (2011). Involvement of the *Shewanella oneidensis* Decaheme Cytochrome MtrA in the Periplasmic Stability of the β -Barrel Protein MtrB. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1520–1523.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7789–7796.
- Schütz, B., Seidel, J., Sturm, G., Einsle, O. & Gescher, J. (2011). Investigation of the electron transport chain to and the catalytic activity of the diheme cytochrome *c* peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6172–6180. American Society for Microbiology.
- Selkrig, J., Belousoff, M. J., Headey, S. J., Heinz, E., Shiota, T., Shen, H.-H. *et al.* (2015). Conserved features in TamA enable interaction with TamB to drive the activity of the translocation and assembly module. *Scientific Reports*, 5(1), 12905. Nature Publishing Group.

- Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C. T., Belousoff, M. J., Perry, A. J., Wells, T. J. *et al.* (2012). Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(5), 506–510.
- Shi, Liang, Deng, S., Marshall, M. J., Wang, Z., Kennedy, D. W., Dohnalkova, A. C. *et al.* (2008). Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. *Journal of Bacteriology*, *190*(15), 5512–5516. American Society for Microbiology (ASM).
- 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. *Frontiers in microbiology*, *3*, 50. Frontiers Media SA.
- Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), a000414. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sivadon, V., Rottman, M., Quincampoix, J. C., Prunier, E., Le Moal, M., De Mazancourt, P. *et al.* (2009). Partial atlE sequencing of *Staphylococcus epidermidis* strains from Prosthetic Joint Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(7), 2321–2324. American Society for Microbiology.
- Sklar, J. G., Wu, T., Gronenberg, L. S., Malinverni, J. C., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2007). Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(15), 6400–6405.

- Sklar, Joseph G, Wu, T., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2007). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes & development*, 21(19), 2473–84. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soltes, G. R., Martin, N. R., Park, E., Sutterlin, H. A. & Silhavy, T. J. (2017). Distinctive Roles for Periplasmic Proteases in the Maintenance of Essential Outer Membrane Protein Assembly. *Journal of bacteriology*, 199(20). American Society for Microbiology (ASM).
- Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), 339–47.
- Stegmeier, J. F. & Andersen, C. (2006). Characterization of Pores Formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry*, 140(2), 275–283.
- Stephan, S. (2015). *Untersuchung der Integration des MtrABC-Komplexes in die äußere Membran bei Shewanella oneidensis MR-1*. KIT.
- Stevens, J. M., Mavridou, D. A. I., Hamer, R., Kritsiligkou, P., Goddard, A. D. & Ferguson, S. J. (2011, November). Cytochrome c biogenesis System i. *FEBS Journal*. Wiley-Blackwell.
- 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*, 9(8), 1802–1811.

- Subramanian, P., Pirbadian, S., El-Naggar, M. Y. & Jensen, G. J. (2018). Ultrastructure of *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(14), E3246–E3255. National Academy of Sciences.
- Sugai, M. & Wu, H. C. (1992). Export of the outer membrane lipoprotein is defective in secD, secE, and secF mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 174(8), 2511–6.
- Tokuda, H. (2009). Biogenesis of Outer Membranes in Gram-Negative Bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(3), 465–473.
- Tokuda, H. & Matsuyama, S. (2004). Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1693(1), 5–13.
- Tsapin, A. I., Vandenberghe, I., Nealson, K. H., Scott, J. H., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. *et al.* (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. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3236–3244.
- Ureta, A. R., Endres, R. G., Wingreen, N. S. & Silhavy, T. J. (2007). Kinetic Analysis of the Assembly of the Outer Membrane Protein LamB in *Escherichia coli* Mutants Each Lacking a Secretion or Targeting Factor in a Different Cellular Compartment. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 446–454.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L. & Lovley, D. R. (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, 395(6697), 65–67.

- Volokhina, E. B., Grijpstra, J., Stork, M., Schilders, I., Tommassen, J. & Bos, M. P. (2011). Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*. *Journal of bacteriology*, 193(7), 1612–21. American Society for Microbiology Journals.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. *et al.* (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *The EMBO journal*, 20(23), 6735–41. European Molecular Biology Organization.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. & Tommassen, J. (2003). Role of a Highly Conserved Bacterial Protein in Outer Membrane Protein Assembly. *Science*, 299(5604), 262–265.
- Walton, T. A. & Sousa, M. C. (2004). Crystal Structure of Skp, a Prefoldin-like Chaperone that Protects Soluble and Membrane Proteins from Aggregation. *Molecular Cell*, 15(3), 367–374.
- Weber, K. A., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752–764.
- Wee, S. K., Burns, J. L. & DiChristina, T. J. (2014). Identification of a molecular signature unique to metal-reducing *Gammaproteobacteria*. *FEMS Microbiology Letters*, 350(1), 90–99. John Wiley & Sons, Ltd.
- White, G. F., Shi, Z., Shi, L., Wang, Z., Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J. *et al.* (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(16), 6346–51. National Academy of Sciences.

- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J. & Kahne, D. (2005). Identification of a Multicomponent Complex Required for Outer Membrane Biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, 121(2), 235–245.
- Xu, X., Wang, S., Hu, Y. X. & McKay, D. B. (2007). The Periplasmic Bacterial Molecular Chaperone SurA Adapts its Structure to Bind Peptides in Different Conformations to Assert a Sequence Preference for Aromatic Residues. *Journal of Molecular Biology*, 373(2), 367–381.
- Yang, C., Rodionov, D. A., Li, X., Laikova, O. N., Gelfand, M. S., Zagnitko, O. P. *et al.* (2006). Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), 29872–85. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Yin, J., Jin, M., Zhang, H., Ju, L., Zhang, L. & Gao, H. (2015). Regulation of nitrite resistance of the cytochrome cbb3 oxidase by cytochrome c ScyA in *Shewanella oneidensis*. *MicrobiologyOpen*, 4(1), 84–99. Blackwell Publishing Ltd.
- Zhong, M., Ferrell, B., Lu, W., Chai, Q. & Wei, Y. (2013). Insights into the function and structural flexibility of the periplasmic molecular chaperone SurA. *Journal of bacteriology*, 195(5), 1061–7. American Society for Microbiology (ASM).
- Zhou, A. Y., Baruch, M., Ajo-Franklin, C. M. & Maharbiz, M. M. (2017). A portable bioelectronic sensing system (BESSY) for environmental deployment incorporating differential microbial sensing in miniaturized reactors. *PloS one*, 12(9), e0184994. Public Library of Science.