



Stefanie Lohmiller

**TonB-abhängige Substrataufnahme bei
dem Gram-negativen Bakterium
*Caulobacter crescentus***



Cuvillier Verlag Göttingen



**TonB-abhängige Substrataufnahme bei dem Gram-negativen
Bakterium *Caulobacter crescentus***

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Stefanie Lohmiller
aus Herrenberg
vorgelegte

Dissertation

2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008
Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-593-4

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2008

Dekan: Prof. Dr. H. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-G. Hantke

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-593-4

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Membranphysiologie der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, für seine ständige Gesprächsbereitschaft und für seine großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit, für wertvolle Ratschläge und für seine Hilfsbereitschaft danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Benz vom Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg und Frau Elke Maier bedanke ich mich für die Durchführung der Kanalmessungen in künstlichen Membranen.

Prof. Dr. Urs Jenal vom Biozentrum in Basel danke ich für die Übersendung von *C. crescentus*-Stämmen sowie für viele hilfreiche Tipps.

Frau Dr. Heidi Neugebauer danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung der Stämme möchte ich Frau Claudia Menzel danken.

Christina Hermann danke ich für die Hilfe und die Durchführung vieler radioaktiver Transportversuche mit *C. crescentus*.

Für Ihre guten Ratschläge und ständige Hilfsbereitschaft möchte ich Frau Dr. Silke Patzer danken.

Bei Herrn Dr. Klaus Eisele möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit sowie für seine zahlreichen Tipps, seine Geduld und die große Unterstützung bedanken.

Frau Dr. Marianne Valdebenito, Silke Müller, Yvonne Sauermann, Beate Rudo, Janina Donisi und Dr. Thomas Gwinner danke ich für viele abwechslungsreiche Stunden im und außerhalb des Labors so wie für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Mikrobiologie/Membranphysiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ohne deren Hilfe sich manches schwieriger gestaltet hätte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Philipp.
Danke für deine Hilfsbereitschaft, für deine Unterstützung und für viele aufmunternde Worte!

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Bakterium <i>Caulobacter crescentus</i>	1
1.2	Nährstoffaufnahme bei Bakterien	2
1.2.1	Einfache Diffusion	3
1.2.2	Erleichterte Diffusion	4
1.2.3	Aktiver Transport	5
1.3	Energie-Transduktionskomplexe	5
1.4	TonB-abhängige Rezeptoren bei <i>C. crescentus</i>	9
1.5	Aufgabenstellung	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Medien	14
2.1.4	Medienzusätze	15
2.1.5	Lösungen und Puffer	16
2.1.5.1	Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	16
2.1.5.2	Lösungen für SDS-Page	17
2.1.5.3	Lösungen zur Isolierung der Gesamtmembranen	18
2.1.5.4	Lösungen zur Proteinaufreinigung für Ni-NTA-Spin- Säulen	18
2.1.5.5	Lösungen zur Proteinaufreinigung für Chitinbeads	19
2.1.6	Bakterienstämme	21
2.1.7	Klonierungsvektoren	22
2.1.8	Plasmide	23
2.1.9	Plasmidkonstruktionen	24
2.1.10	Synthetische Oligonukleotide	25
2.2	Methoden	33
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	33
2.2.1.1	Kulturbedingungen für <i>Caulobacter crescentus</i>	33
2.2.1.2	Konjugation	33
2.2.1.3	Wachstumstest	34
2.2.2	Molekularbiologische/-genetische Methoden	34
2.2.2.1	Isolierung chromosomaler DNA	34
2.2.2.2	Klonierungstechniken	34
2.2.2.3	Plasmidisolierung	35
2.2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.2.5	DNA-Sequenzierung	36

2.2.2.6	Überprüfung der <i>tonB</i> -Mutante HB2004	36
2.2.2.7	Chromosomale Knockout-Mutanten in <i>C. crescentus</i>	37
2.2.2.7.1	Die cc3508::Gm ^R -Mutante SL3508.....	37
2.2.2.7.2	Die Glucoamylase::Ω-Mutante SL2282.....	38
2.2.2.7.3	Die Transporter::Ω-Mutante SL2283	39
2.2.2.7.4	Die Regulator::Ω-Mutante SL2284.....	41
2.2.2.7.5	Die tonB2::Ω tonB3::Gm ^R -Doppelmutante SL8.....	42
2.2.2.7.6	Die tonB1::Ω-Mutante SL2334a	42
2.2.2.7.7	Die tonB1::Gm ^R tonB2::Ω-Mutante SL9	43
2.2.2.8	Punktmutagenese von Plasmid-DNA	44
2.2.2.9	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose	44
2.2.3	Proteintechniken	45
2.2.3.1	Proteinbestimmung	45
2.2.3.2	Überexpression von Proteinen	45
2.2.3.3	Isolierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i>	45
2.2.3.4	Aufreinigung von NagAHis ₆ über Ni-NTA-Säulen	46
2.2.3.5	Aufreinigung von NagAHis ₆ über Chitin Beads	47
2.2.3.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.2.3.7	Kanalmessung in „black lipid“ Membranen	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Suche nach einem zweiten TonB-Protein in <i>Caulobacter crescentus</i>	49
3.1.1	Überprüfung der <i>tonB2</i> -Mutante HB2004	50
3.1.2	Datenbankinformationen über CC2327	51
3.1.3	Identifizierung des <i>tonB3</i> -Gens in <i>C. crescentus</i> durch Sequenzvergleiche.....	52
3.1.4	Herstellung der Mutante <i>tonB3</i> ::Gm ^R -Mutante SL3508.....	54
3.1.4.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose und ¹⁴ C- markiertem GlcNAc in SL3508	55
3.1.5	Herstellung der Doppelmutante <i>tonB2</i> ::Ω <i>tonB3</i> ::Gm ^R -Mutante SL8	58
3.1.5.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose bzw. ¹⁴ C- markiertem GlcNAc in SL8	58
3.2	Ist ein TonB-Protein an der Maltodextrinaufnahme beteiligt?	60
3.2.1	Punktmutagenese in der TonB-Box von MalA.....	61
3.2.1.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose in HB2003pBB2287	61
3.3	Datenbankinformation über cc2334a.....	63
3.3.1	Herstellung der <i>tonB1</i> ::Ω-Mutante SL2334a.....	66
3.3.1.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose und ¹⁴ C- markiertem GlcNAc ..	66
3.3.1.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>tonB1</i> -Mutante SL2334a bezüglich der Maltodextrinaufnahme	68
3.3.2	Sequenzanalyse der TonB-Proteine	70
3.3.3	Herstellung der Doppelmutante <i>tonB1</i> ::Gm ^R <i>tonB2</i> ::Ω-Mutante SL9	75
3.3.3.1	Transportmessungen mit radioaktivem ¹⁴ C-GlcNAc	75
3.4	Charakterisierung des Genclusters um MalA	76
3.4.1	Herstellung der Glucoamylase::Ω-Mutante SL2282	79
3.4.1.1	Transportmessungen mit ¹⁴ C-markierter Maltose	79

3.4.1.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>malS</i> -Mutante SL2282 bezüglich der Maltodextrinaufnahme	83
3.4.1.3	Komplementationsversuch von <i>E. coli</i> RD58 mit CCMalS	84
3.4.2	Herstellung der Transporter:: Ω -Mutante SL2283	89
3.4.2.1	Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose	89
3.4.3	Herstellung der Regulator:: Ω -Mutante SL2284	90
3.4.3.1	Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose	91
3.5	Erfolgt die Substrataufnahme über NagA energieabhängig?	92
3.5.1	Wachstumstest verschiedener mutmaßlicher <i>tonB</i> -Mutanten von <i>C. crescentus</i> in GlcNAc, (GlcNAc) ₃ und (GlcNAc) ₅	94
3.5.2	Komplementation einer <i>nagA</i> Mutante SE0446	96
3.5.2.1	Transportmessungen mit ^{14}C -markiertem GlcNAc	97
3.5.3	Aufreinigung von NagAHis ₆	98
3.5.4	Einzelkanalmessungen von NagA an künstlichen Membranen	100
3.5.4.1	Einzelkanal-Leitfähigkeit	100
3.5.4.2	Titrationmessungen	102
4	DISKUSSION	104
4.1	Maltose wird TonB-abhängig aufgenommen	105
4.2	Das <i>mal</i> -Gencluster	115
4.3	Anpassung von <i>C. crescentus</i> an sein nährstoffarmes Habitat	122
4.4	Hypothese zur Maltodextrinaufnahme	127
4.5	GlcNAc-Aufnahme über NagA	128
5	ZUSAMMENFASSUNG	134
6	LITERATUR	136
7	ANHANG	153
8	ABKÜRZUNGEN	161

1 Einleitung

1.1 Das Bakterium *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, das in die Gruppe der α -Proteobakterien eingeordnet wird. Im Gegensatz zu vielen α -Proteobakterien, die parasitisch bzw. endosymbiontisch leben, findet man *C. crescentus* vor allem in nährstoffarmen Gewässern. In diesem Habitat zählt *C. crescentus* zu den am häufigsten vorkommenden nicht-pathogenen Mikroorganismen (Poindexter, 1964). Die im Moment engste phylogenetische Beziehung besteht zu dem α -Proteobakterium *Rickettsia prowazekii*, dem Erreger des Fleckfiebers. Unter den γ -Proteobakterien besitzt *P. aeruginosa* die größte Übereinstimmung zu *C. crescentus* (Niermann *et al.*, 2001).

Caulobacter crescentus zeichnet sich durch eine asymmetrische Zellteilung und einen dreiphasigen Zellzyklus aus und wird diesbezüglich als Modellorganismus für Differenzierungsstudien gesehen (Shapiro *et al.*, 2002; McAdams und Shapiro 2003). Pro Zyklus entstehen zwei Zelltypen, die sich in ihrer Morphologie, Beweglichkeit und der Fähigkeit einen neuen Zellzyklus einzuleiten, unterscheiden (Ireland *et al.*, 2002). Die frei schwimmende Tochterzelle trägt an einem Zellpol ein Flagellum und mehrere Pili. In diesem motilen Stadium kann die „Schwärmerzelle“ mit Hilfe eines chemokinetischen Apparates eine gezielte Bewegung auf neue, nährstoffreiche Regionen entlang eines Konzentrationsgradienten ausüben. Nach Freisetzung des Flagellums der „Schwärmerzelle“ bildet sich am selben Zellpol der Stiel („stalk“) der sessilen Zelle aus und es kann zur DNA-Replikation und Zellteilung kommen. Für den Eintritt in den Zellzyklus müssen die essentiellen Zellzyklusprozesse wie die Replikation des Chromosoms, die DNA-Methylierung und Zellteilung, sowie die dazu gehörenden morphologischen Änderungen reguliert werden (Phadke *et al.*, 2001). Neben der planktonischen Lebensform der „Schwärmerzelle“ findet man *Caulobacter crescentus* auch als Bestandteil von Biofilmen. Die Möglichkeit zur Biofilmbildung verdankt das Bakterium seinem Stiel. Er stellt eine zylindrische Extension der Zellwand dar, an dessen Spitze sich eine Art Flaschenhals

(„holdfast“) befindet, der die Anheftung an abiotische oder biotische Oberflächen vermittelt (Smith *et al.*, 2002). Der Stoffwechsel und die Substrataufnahme sind im Gegensatz zum Zellzyklus bei *C. crescentus* noch kaum untersucht.

Caulobacter crescentus ist ein obligat aerobes, heterotrophes Bakterium, das verschiedene Kohlenstoffquellen nutzen kann (Poindexter, J. S., 1964). Es ist das erste freilebende α -Proteobakterium, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Es besteht aus einem zirkulären Chromosom mit 4,016,942 bp, die für 3,767 Gene codieren und einen G/C-Gehalt von 67,2 % besitzt. Bei *C. crescentus* findet man eine enorm hohe Anzahl TonB-abhängiger äußerer Membranrezeptoren sowie sehr viele Proteine mit einem Molekulargewicht über 70 kDa (Niermann *et al.*, 2001; Agabian und Unger, 1978). In der Genomsequenz werden bis zu 67 TonB-abhängige Membranrezeptoren vorhergesagt (Neugebauer *et al.*, 2005); die damit eine der größten Proteinfamilien in diesem Organismus darstellen (Niermann *et al.*, 2001). Dagegen werden keine homologen Proteine des in *E. coli* vorkommenden Porintyps LamB, OmpF, OmpX, OmpG, OmpC, PhoE und Tsx vorhergesagt (Phadke *et al.*, 2001). In der großen Anzahl TonB-abhängiger Membranrezeptoren kann ein Ersatz der klassischen Porine, die eine Diffusion von Nährstoffen erlauben, gesehen werden (Ireland *et al.*, 2002). Homologievergleiche zu klassischen TonB-abhängigen Rezeptoren zeigen nur eine geringe Übereinstimmung.

1.2 Nährstoffaufnahme bei Bakterien

Um Nährstoffe und Substrate aufnehmen zu können, müssen diese zuerst die bakterielle Zellhülle passieren. Morphologisch unterscheidet sich die Zellhülle Gram-negativer Bakterien gegenüber Gram-positiven Bakterien in dem Fehlen einer dicken Mureinschicht und in dem Vorhandensein einer zweiten äußeren Membran. Diese ähnelt der Cytoplasmamembran (CM), ist jedoch anders zusammengesetzt und besteht aus Proteinen, Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS). Die Proteine können über einen Lipidanker in der

Membran fixiert sein oder einfach in die Membran eingebettet sein (Nikaido, 1996A). Sie dienen der Zellhüllenstabilisierung, der Proteintranslokation, der Signaltransduktion und dem Export von antimikrobiellen Stoffen. Sie können enzymatische Aktivität besitzen und den Transport von Nährstoffen und Substraten vermitteln (Buchanan, 1999; Koechnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000). Nährstoffe und Substrate müssen daher bei Gram-negativen Bakterien erst die äußere Membran, das Periplasma und zuletzt noch die CM überwinden, um in das Zellinnere zu gelangen. Um daher überhaupt Substrate aufnehmen zu können, gibt es sowohl für die äußere Membran, als auch für die Cytoplasmamembran verschiedene Durchtritts - bzw. Transportmöglichkeiten. Für diesen Stoffaustausch gibt es die klassische Einteilung in einfache Diffusion, erleichterte Diffusion sowie den aktiven Transport von Substraten.

1.2.1 Einfache Diffusion

Das unspezifische Eindringen von Stoffen in die Zelle entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand wird als einfache oder passive Diffusion bezeichnet (Delcour, 2003). Die Aufnahmegeschwindigkeit ist sehr gering und es kann zu keiner Substratanhäufung im Zellinneren kommen. Verantwortlich für den passiven Substrattransport sind integrale Membranproteine in der äußeren Membran, die als Porine bezeichnet werden. Sie bilden einen „offenen“ Kanal, durch den hydrophile Moleküle, die kleiner als 600 Dalton sind, in die Zelle diffundieren können (Nikaido, 1994). Diese unspezifische Proteinklasse umfasst in *E. coli* die Proteine OmpF, OmpC und PhoE (Nikaido, 1996A). Porine bestehen aus Trimeren, wobei jedes Monomer einen eigenen wassergefüllten Kanal bildet (Klebba und Newton, 1998; Schirmer, 1997). Antiparallele β -Faltblätter bilden die tonnenartige Struktur der Kanäle mit einer Verengung in der Mitte. Extrazelluläre Schleifen („loops“) stülpen sich nach außen und vergrößern die Oberfläche der Porine. Loop 3 faltet sich in das Innere der Porine zurück, wodurch die Kanalverengung gebildet wird und reguliert die Durchlässigkeit der Porine (Koechnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000; Cowan *et al.*, 1992). Intrazelluläre Schleifen („turns“) verbinden

die β -Faltblätter auf der periplasmatischen Seite (Schirmer, 1997). Geladene Aminosäurereste in der zentralen Kanalverengung verhindern über elektrostatische Kräfte den Durchtritt lipophiler Moleküle (Nikaido, 1994).

1.2.2 Erleichterte Diffusion

Wie bei der passiven Diffusion kann auch bei der erleichterten Diffusion ein Substrat nicht gegen seinen Konzentrationsgradienten in der Zelle angehäuft werden. Die Transportgeschwindigkeit ist von der Substratkonzentration im Medium abhängig und verläuft ohne Energieverbrauch. Für die Aufnahme sind spezifische Porine verantwortlich, die ebenfalls Trimere bilden, jedoch eine hohe Affinität zu ihrem jeweiligen Substrat besitzen. Bei einer geringen Nährstoffkonzentration im Medium erhöht die spezifische reversible Bindung eines Substrats an das Porin dessen Aufnahme. Ein Beispiel für die erleichterte Diffusion ist die Aufnahme von Maltose bei dem Gram-negativen Bakterium *E. coli*. Hier werden Maltose und Maltodextrine durch erleichterte Diffusion über den Membranrezeptor LamB in die Zelle aufgenommen (Benz, 1994). LamB besteht aus 18 antiparallelen β -Faltblättern und bildet eine Tonnenstruktur in der äußeren Membran. Auch hier wird die Durchlässigkeit über extrazelluläre Loops, die sich in das Innere des β -Barrels zurückfalten, reguliert (Schirmer *et al.*, 1995; Schirmer, 1997; Braun *et al.*, 2001). Im Zentrum der Kanalverjüngung befindet sich die Substratbindestelle (Dutzler *et al.*, 1996), an der eine Abfolge von 6 aromatischen Aminosäureresten eine Kette entlang der Längsachse des β -Barrels bilden und als „greasy slide“ bezeichnet werden. Sie dienen der Substratbindung und -weiterleitung, wobei die Maltodextrine am distalen Ende der „greasy slide“ gebunden werden und durch den Kanal zum periplasmatischen Ende konzentrationsabhängig diffundieren (Van Gelder *et al.*, 2002). Ebenfalls über erleichterte Diffusion werden Nukleoside über das spezifische Phagen T6-Rezeptorporin Tsx aufgenommen (Schneider *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1988; Fsihi *et al.*, 1993), während Sucrose über das Plasmid codierte spezifische ScrY-Porin aufgenommen wird (Hardesty *et al.*, 1991; Koebnik *et al.*, 2000).

1.2.3 Aktiver Transport

Bei dem aktiven Transport können Substrate entgegen ihres Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch in der Zelle angehäuft werden. Vor allem essentielle Nährstoffe mit einem Molekulargewicht über 600 Dalton oder stark hydrophobe Substanzen können so aufgenommen werden. Die für den Transport verantwortlichen äußeren Rezeptorproteine besitzen eine sehr hohe Affinität für ihr jeweiliges Substrat. Dieser aktive, energieabhängige Transport wurde bisher sehr gut für die Eisen und Vitamin B₁₂-Aufnahme in *E. coli* untersucht und wird durch TonB-abhängige Membranrezeptoren vermittelt.

1.3 Energie-Transduktionskomplexe

Für den Transport diverser Stoffe durch die Cytoplasmamembran ist das Protonenpotential die treibende Energie. Dieses Potential wird durch das ständige Hinauspumpen von Protonen und anderen Ionen aus der Zelle aufrechterhalten. Da die äußere Membran aufgrund der Porine für Ionen durchlässig ist, ist sie für die Ladungstrennung ungeeignet. Um dennoch Substrate aktiv über die äußere Membran in die Zelle aufnehmen zu können, nutzen Gram-negative Bakterien die protonenmotorische Kraft der CM (Postle und Kadner, 2003). Bisher wurden in *E. coli* zwei Proteinsysteme nachgewiesen, welche die Energie des elektrochemischen Gradienten der CM für den energieabhängigen Transport von Substraten über die äußere Membran nutzen. Dabei handelt es sich zum einen um das Tol/Pal-System mit den Proteinen TolQ, TolR, TolA, TolB und Pal sowie um das TonB-ExbB/D-System, welches sich aus den Proteinen TonB, ExbB und ExbD zusammensetzt. Das Tol/Pal-System ist in vielen Gram-negativen Bakterien vorhanden (Sturgis, 2001) und für den Import von Colicinen der A-Gruppe sowie für den Zusammenbau von Zellhüllenkomponenten verantwortlich (Braun, 1994; Lazdunski *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2000; Cascales *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die Stabilität der Zellhülle eng mit dem Tol/Pal-System verbunden (Bernadac *et al.*, 1998;

Cascales *et al.*, 2002). Die Proteine TolQ, TolR und TolA sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert. TolB befindet sich im Periplasma und das Pal-Protein ist in der äußeren Membran verankert und reicht in das Periplasma hinein. TolQ und TolR nutzen das elektrochemische Potential der Cytoplasmamembran und energetisieren TolA, welches die Energie für energieabhängige Prozesse an der äußeren Membran zu Verfügung stellt (Cascales *et al.*, 2001). Die Proteine des Flagellenmotors MotA und MotB zeigen funktionelle Homologien zu der Transmembrandomäne von TolQ und TolR. Sie befinden sich am basalen Ende des in der Cytoplasmamembran verankerten Flagellums (Cascales *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese Proteine den Stator des Flagellenmotors bilden (Zhou *et al.*, 1998a) und der Protonengradient auch hier von MotA und MotB genutzt wird, um ein Drehmoment im Motor der Geißel zu erzeugen (Braun *et al.*, 1999).

Der zweite Energietransduktionskomplex ist das TonB-ExbB/D-System, welches für den energieabhängigen Transport von Eisensiderophoren und Vitamin B₁₂ in die Zelle verantwortlich ist. Zudem ist es für die Aufnahme von Colicinen der B-Gruppe und der rezeptorvermittelten Infektion einiger Bakteriophagen notwendig (Lazdunski *et al.*, 1998; Braun, 1994). ExbB und ExbD sind in der Cytoplasmamembran verankert, wobei ein großer Teil des ExbD-Proteins in das Periplasma hineinragt (Kampfenkel und Braun, 1993; Kampfenkel und Braun, 1992). Auch die beiden Proteine ExbB/D zeigen eine Homologie zu den Proteinen des Flagellenmotors MotA/B (Zhai *et al.*, 2003). TonB ist über seinen N-Terminus in der CM verankert und erstreckt sich ins Periplasma. Über seinen C-Terminus kann es mit der TonB-Box der äußeren Membranrezeptoren in Wechselwirkung treten (Kadner, 1990; Postle, 1993; Pawelek *et al.*, 2006; Shultis *et al.*, 2006). Dafür ist eine korrekte Faltung des C-Terminus nötig, welche vermutlich über die Proteine ExbB/D kontrolliert wird (Larson *et al.*, 2007). Die Bindung von TonB an äußere Membrantransporter wurde genetisch durch Suppressionsanalysen (Braun, 1994) und chemisch durch Formaldehydvernetzung (Moeck *et al.*, 1997) sowie durch die *in vivo* Bildung von Disulfidbrücken (Cadieux *et al.*, 1999; Ogierman und Braun, 2003) gezeigt. In vielen Gram-negativen Bakterien finden sich homologe TonB- und

ExbB/D-Proteine (Moeck und Coulton, 1998; Larson *et al.*, 1996). Die Funktion von TonB ist für die Energetisierung der äußeren Membran essentiell, während die Funktionen von ExbB und ExbD teilweise durch TolQ und TolR ersetzt werden können (Braun und Herrmann, 1993). Der genaue Mechanismus der Energieübertragung von der Cytoplasmamembran auf die Membranrezeptoren ist noch nicht vollständig untersucht. Zwei Modelle werden aktuell diskutiert: das „Propeller-Modell“ und das „Shuttle-Modell“. Im ersten Modell bleibt das TonB-Protein an die CM gebunden, während sich der C-Terminus, angetrieben durch ExbB/D und der Protonenkraft, wie ein Propeller dreht und schließlich an den Rezeptor der äußeren Membran binden kann (Chang *et al.*, 2001). Das zweite Modell setzt die komplette Dissoziation des TonB-Proteins von der Cytoplasmamembran voraus (Peacock *et al.*, 2007; Postle und Kadner, 2003; Larson *et al.*, 2003). Hier ist das nicht energetisierte TonB-Protein an den ExbB/D-Komplex in der Cytoplasmamembran gebunden. Die Energie aus dem Protonenpotential wird über die Proteine ExbB/D auf das TonB-Protein übertragen. Das energetisierte TonB-Protein kann mit seinem C-Terminus mit dem Rezeptor der äußeren Membran interagieren und diesen durch eine weitere Konformationsänderung in eine energetisierte Form überführen, wodurch das gebundene Substrat vom Rezeptor freigelassen werden kann (Moeck und Coulton, 1998). Die eigentliche Energieübertragung zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran geschieht durch eine Reihe von Konformationsänderungen des Proteins TonB (Letain und Postle, 1997). Die Konformation des energetisierten TonB's unterscheidet sich von dem unenergetisierten Zustand des Proteins. Die Konformationsänderungen des TonB-Proteins hängen vermutlich von der protonenmotorischen Kraft der Cytoplasmamembran ab (Larsen *et al.*, 1999). Erst nach dem Erreichen des Rezeptors wird das Protein TonB aus der CM freigesetzt. Nach der Energieübertragung auf den Rezeptor kann das TonB-Protein wieder in die Cytoplasmamembran integrieren (Postle und Kadner, 2003). TonB-abhängige Rezeptoren Gram-negativer Bakterien befinden sich in der äußeren Membran und sind mit Hilfe des TonB-ExbB/D-Systems für den Transport von Substraten in die Zelle verantwortlich. Der Aufbau dieser hochaffinen Transportproteine

wurde über Röntgenstrukturanalysen bestimmt. Sie durchspannen die äußere Membran mit einer Barrel-Domäne, die aus 22 antiparallelen β -Faltblättern gebildet wird und damit einen Kanal in der Membran bilden. Von der periplasmatischen Seite stülpt sich der N-Terminus des β -Barrels zurück und bildet die Korkdomäne, die den Kanal verschließt (Ferguson und Deisenhofer, 2004; Schalk *et al.*, 2004; Wiener 2005; Ferguson *et al.*, 1998B; 2002; Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999; Chimento *et al.*, 2003). Bislang sind TonB-abhängige, energiegekoppelte Transportsysteme bei *E. coli* und anderen γ -Proteobakterien nur für die Eisen und Vitamin B₁₂-Versorgung nachgewiesen worden. Eisen muss aufgrund seiner Unlöslichkeit mit Hilfe von Siderophorkomplexen, Häm, Hämoglobin, Hämopexin, Myoglobin, Transferrin und Lactoferrin in die Zelle aufgenommen werden (Braun *et al.*, 1998; 2002; Andrews *et al.*, 2003; Postle und Kadner, 2003). Für eine diffusionskontrollierte Aufnahme sind Eisenkomplexbindungen zu groß und liegen in zu geringer Konzentration vor, wodurch eine ausreichende Eisenversorgung der Zellen nicht gewährleistet wäre (Ferguson *et al.*, 1998). Daher werden Eisenkomplexbindungen an der Zelloberfläche über hochaffine Rezeptorproteine gebunden und aktiv mittels Energieverbrauch auch entgegen des Konzentrationsgradienten durch die äußere Membran in das Periplasma transportiert. Von dort wird das Eisen oder die Eisensiderophorkomplexe über ABC-Transporter durch die CM in das Innere der Zelle transportiert. Die K_M-Werte für den aktiven Transport durch die äußere Membran liegen im nanomolaren Bereich (Newton *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003). Bei *E. coli* sind bisher sieben TonB-abhängige Rezeptoren für die Eisen(III)-Siderophorkomplex-Aufnahme beschrieben worden. Die Rezeptoren FhuA, FhuE und IutA binden die Hydroxamat-Siderophore Ferrichrom, Coprogen und Rhodotorulasäure bzw. das von *E. coli* selbst gebildete Aerobactin (Fecker und Braun, 1983; Sauer *et al.*, 1987; Krone *et al.*, 1985). Das zu den Catechol-Siderophoren gehörende, ebenfalls von *E. coli* synthetisierte Enterobactin wird von dem Rezeptorprotein FepA aufgenommen (Lundrigan und Kadner, 1986). Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure, zwei Vorstufen der Enterochelin-Synthese, werden über die Rezeptoren FiuA und CirA transportiert

(Nau und Konisky, 1989). Für die Aufnahme von Eisencitrat, ein Siderophor des Hydroxycarboxylat-Typs, dient der TonB-abhängige Rezeptor FecA (Pressler *et al.*, 1988). Im Rahmen der Genomsequenzierung von *E. coli* konnte mit YncD mindestens ein weiteres hypothetisches Rezeptorprotein mit bisher unbekannter Substratspezifität identifiziert werden (Blattner *et al.*, 1997). Außerdem wurden homologe Proteine des Häm-Rezeptors HemR von *Yersinia enterocolitica* in *E. coli* gefunden. Ein weiteres, TonB-abhängiges äußeres Rezeptorprotein in *E. coli* ist BtuB, welches für den Vitamin B₁₂-Transport verantwortlich ist (Bassford *et al.*, 1976; Heller und Kadner, 1985). Durch die Bestimmung der Kristallstrukturen der Rezeptoren FhuA, FecA, FepA und BtuB (Ferguson *et al.*, 1998B, 2001, 2002; Locher *et al.*, 1998; Chimento *et al.*, 2003) wurden Studien zur Aufklärung der Transportmechanismen ermöglicht. Einige dieser Membrantransporter dienen zusätzlich als Bindestelle und Eintrittspforte für Bakteriophagen (Luria und Delbrück, 1943; Matsushiro, 1963) und Colicine (Lazdunski *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu *E. coli* und *P. aeruginosa* sind in anderen Bakterienarten TonB-abhängige Rezeptoren bzw. Transportprozesse wenig charakterisiert. Die fortschreitende Sequenzierung der Bakteriengenome bestätigt allerdings, dass TonB-abhängige Transportsysteme weit verbreitet sind und oft in einer hohen Anzahl in den jeweiligen Bakterienarten zu finden sind.

1.4 TonB-abhängige Rezeptoren bei *C. crescentus*

Seit 2001 ist das Genom von *Caulobacter crescentus* CB15 durch das Institute for Genome Research in Rockville, MD, USA komplett sequenziert. Mit einer vorhergesagten Anzahl von 67 TonB-abhängigen Rezeptoren der äußeren Membran besitzt *C. crescentus* sehr viele TonB-abhängige Proteine. Nur in dem Genom von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* werden noch mehr TonB-abhängige Proteine vorhergesagt. Die Genomanalyse ergab hier eine vorhergesagte Anzahl von bis zu 72 TonB-abhängige- bzw. TonB-ähnliche Rezeptoren (Blanvillain *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* besitzt lediglich 34 TonB-abhängige Rezeptoren (Stover *et al.*, 2000; Niermann *et al.*, 2001) und

in uropathogenen *E. coli* Stämmen werden zw. 17 und 18 TonB-abhängige Rezeptoren vorhergesagt (Torres *et al.*, 2001). Alle anderen bisher sequenzierten Genome enthalten nicht mehr als 13 TonB-abhängige Proteine (Ireland *et al.*, 2002). Da in *Caulobacter crescentus* eine so große Anzahl von Transportern vorhergesagt wird und kaum Porine zu finden sind, die eine Diffusion von Substraten erlauben, ist es wahrscheinlich, dass diese Rezeptoren nicht nur für die Eisen und Vitamin B₁₂-Versorgung benötigt werden, sondern auch andere Substrate und Nährstoffe energieabhängig über TonB-abhängige Rezeptoren in die Zelle transportiert werden. Es weisen auch nur 19 der vorhergesagten 67 TonB-abhängigen Rezeptoren die klassische Operonstruktur auf, die man sonst bei Eisen-transportierenden äußeren Membranrezeptoren findet (Phadke *et al.*, 2001). Auch bei *Bacteroides thetaiotaomicron* wurden äußere Membranproteine identifiziert, die Ähnlichkeiten zu TonB-abhängigen Rezeptoren der Eisensiderophoraufnahme zeigen, jedoch für die Aufnahme von Stärke, Maltooligosacchariden (Reeves *et al.*, 1996) und Chondroitinsulfaten (Cheng *et al.*, 1995) verantwortlich sind. Tatsächlich wurden bei *Caulobacter crescentus* TonB-abhängige Rezeptoren identifiziert, die für die Aufnahme von Maltose (Neugebauer *et al.*, 2005) und N-Acetyl-β-D-glucosamin (Eisenbeis *et al.*, 2008) verantwortlich sind. MalA, der äußere Membranrezeptor für Maltose von *C. crescentus*, weist keine Sequenzhomologie zu SusC, dem Rezeptorprotein für Maltooligosaccharide und Stärke von *B. thetaiotaomicron* oder LamB, dem Protein für die Maltoseaufnahme bei *E. coli*, auf.

1.5 Aufgabenstellung

Die Genomsequenz von *Caulobacter crescentus* sagt 67 TonB-abhängige Membranrezeptoren voraus, die neben der Eisen- und Vitamin B₁₂-Versorgung auch für die Aufnahme von Maltose, Maltooligosacchariden, N-Acetyl-β-D-glucosamin (GlcNAc) sowie dessen höhere Homologe verantwortlich sind. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ist in der äußeren Membran jeweils ein Protein identifiziert worden, dessen Expression durch Maltose

(MalA) bzw. durch GlcNAc (NagA) induzierbar ist. MALDI-TOF-Analysen zeigten, dass es sich dabei um TonB-abhängige Proteine handelt. Chromosomale Deletionsmutanten dieser Gene und anschließende Wachstumstests der Mutanten mit Maltodextrinen bzw. Chitinoligosacchariden bewiesen, dass MalA für die Aufnahme von Maltodextrinen und NagA für die Aufnahme von Chitinoligosacchariden verantwortlich sind. In beiden Fällen konnte die vorhergesagte TonB Abhängigkeit von MalA und NagA nicht bestätigt werden. Eine Inaktivierung des in der Datenbank vorhergesagten *tonB*-Gens zeigte keinen Einfluß auf die Maltodextrin- und Chitinoligosaccharidaufnahme. Hergestellte ExbB/D-Deletionsmutanten von *C. crescentus* sprachen jedoch für eine ExbB/D- bzw. energieabhängige Aufnahme dieser Substrate.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob es sich bei der Aufnahme von Maltooligosacchariden und Chitinoligosacchariden über die äußere Membran von *Caulobacter crescentus* um einen TonB-abhängigen Transport handelt. Dazu soll das verantwortliche *tonB*-Gen im Genom von *C. crescentus* gesucht werden und anschließend eine Deletionsmutante hergestellt werden. Die Funktion dieses Proteins soll mittels radioaktiver ¹⁴C-Maltose- bzw. ¹⁴C-GlcNAc-Aufnahme sowie phänotypisch mittels Wachstumstests überprüft werden.

Zusätzlich sollen die angrenzenden Gene des äußeren Membranrezeptors MalA, der *mal*-Locus, anhand von erstellten Deletionsmutationen und radioaktiven Transportmessungen näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Amersham Biosciences, Freiburg:

PD10-Säulen

Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA:

Photometer Novaspec II

Amicon, Beverly MA, USA:

Zentrifugationsfiltrerröhrchen Centriprep YM-30

Biometra, Göttingen:

PCR Personal Cyclers, Gelelektrophoresekammer für Polyacrylamidgele

Eppendorf AG, Köln:

Tischzentrifuge, Eppendorf Photometer 1101 M

Heraeus Instruments GmbH, Hanau:

Sepatech Biofuge 15, Megafuge 1.0 R

Life Technologies Inc., Rockville, MD., USA:

Flachbett-Elektrophoreseapparatur Modell Horizon 58 und 11-14

Qiagen GmbH, Hilden:

Ni-NTA-Spin-Säulen

SLM Instruments Inc., Rochester, N.Y., USA:

French Pressure Cell Press

Satorius AG, Göttingen:

Feinwaagen

Sorvall GmbH, Bad Homburg:

Sorvall Zentrifuge Typ RC 5B Plus

2.1.2 Chemikalien

Amersham Biosciences, Freiburg:

Molekulargewichtsstandard

AppliChem, Darmstadt:

SDS

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe:

Acrylamid Rotiphoese Gel A (30 %), Bisacrylamid Rotiphoese Gel B (2 %), Ammoniumpersulfat, Agarose, Agar, Glycerin, Glycin, Tris, Chloroform

Difco Laboratories, Detroit MI, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Hefe-Extrakt

Invitrogen, Groningen, Niederlande:

DNA-Längenstandard (1 kb-Leiter), Easy-DNA-Kit

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren:

Nucleobond AX-100 Kit, NucleoSpin Extract Kit

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot:

Proteinstandard

MWG-Biotech, Ebersberg:

Synthetische Oligonukleotide

New England Biolabs GmbH, Schwalbach:

Restriktionsendonukleasen und -puffer

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen:

Plasmidisolierungskits, Taq DNA-Polymerase und -Puffer

Pierce, Rockford, Illinois, USA:

BCA Protein Assay

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim:

Alkalische Phosphatase und -puffer, Complete, DNase, T4 DNA-Ligase, Restriktionsendonukleasen, High Fidelity PCR Kit, Long Template PCR Kit

Satorius AG, Göttingen:

Nitrocellulosefilter 0,45 µm

Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg:

APS, Servablau R250 und G250, Temed und -puffer

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

Ampicillin, BSA, Chloramphenicol, Gentamycin, IPTG, L-Arabinose,
Lysozym, Maltodextrine, PMSF, SDS, Tetracyclin, Triton X-100, LDAO

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der
Firma **E. Merck AG**, Darmstadt.

2.1.3 Medien

M2-Salze (10 x)	Na ₂ HPO ₄	17,4 g
	KH ₂ PO ₄	10,6 g
	NH ₄ Cl	5 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml
M2-Minimalmedium	M2-Salze (10 x)	100 ml
(M2G) bzw. (M2M) bzw. (M2C)	Glucose (30 %) bzw. Maltose (30 %)	
	bzw. NADG (40 %)	10 ml
	MgCl ₂ (50 mM)	10 ml
	CaCl ₂ (50 mM)	10 ml
	FeSO ₄ (1 mM) in 0,8 mM EDTA, pH 6,8	10 ml
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml
M9-Minimalmedium	M9-Salze	100 ml
	MgSO ₄ (1 M)	1 ml
	CaCl ₂ (0,1 M)	1 ml
	Thiamin (1 M)	1 ml
	Glucose (30 %) bzw. Maltose (30 %)	10 ml
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml
PYE	Bacto Pepton	2 g
	Hefe Extrakt	1 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml

Zugabe nach dem Autoklavieren

CaCl ₂ (0,1 M)	5 ml
MgSO ₄ (1 M)	800 µl

TY

Bacto Trypton	8 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O dest.	ad 1000 ml

SOC-Medium

Bacto Trypton	20 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
MgCl ₂ (1 M)	2,03 g
MgSO ₄ (1 M)	2,46 g
Glucose	3,96 g
H ₂ O dest.	ad 1000 ml
	pH = 7,0

2.1.4 Medienzusätze

Antibiotika

E. coli

C. crescentus

(stock solution)

		Flüssigmedien	Platten
Ampicillin (5 mg/ml)	50 µg/ml	7,5 µg/ml	50 µg/ml
Chloramphenicol (4mg/ml)	25 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
Tetracyclin (12 mg/ml)	12 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
Gentamycin (10 mg/ml)	20 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml
Spectinomycin (10 mg/ml)	50 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
Streptomycin (3 mg/ml)	30 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
Kanamycin (50 mg/ml)	30 µg/ml	resistent	resistent
Nalidixinsäure (2 mg/ml)	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml

Die Antibiotika wurden in H₂O dest. gelöst. Chloramphenicol und Tetracylin wurden in 70 % Ethanol gelöst. Alle Antibiotika wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren den entsprechenden Medien zugegeben.

Agar	Für Platten	15 g/l
	Für Topagar	7,5 g/l
IPTG 100 mM		(24 mg/ml)
X-Gal (gelöst in N,N-dimethylformamid) 50 mM		(20 mg/ml)
Saccharose		3 %
Glucose		0,1 %
(198 g/mol)		
Maltose		0,1 %
(360 g/mol)		
Maltotriose		0,1 %
(504 g/mol)		
Maltotetraose		0,1 %
(667 g/mol)		
Maltopentaose		0,1 %
(829 g/mol)		
Maltohexaose		0,1 %
(991 g/mol)		
NADG (N-Acetyl-β-D-Glucosamin)		0,2 %

2.1.5 Lösungen und Puffer

2.1.5.1 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50 x)	Tris/HCl pH 7,9	242 g
	Eisessig	57 ml
	EDTA	36 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml

Auftragspuffer (5 x)	Saccharose	25 %
	SDS	0,1 %
	Tris	50 mM
	Bromphenolblau	0,05 %
Ethidiumbromid (10 mg/ml)		2 µg/ml

2.1.5.2 Lösungen für SDS-Page

Sammelgel	Acrylamid (30 %)	1,25 ml
	Bisacrylamid (2 %)	0,5 ml
	Sammelgelpuffer	6,3 ml
	(0,25 M Tris/HCl, pH 6,8)	
	H ₂ O dest.	4 ml
	SDS (10 %)	120 µl
	APS (100 mg/ml)	80 µl
	TEMED	30 µl
Trenngel (13 %)	Acrylamid (30 %)	8,6 ml
	Bisacrylamid (2 %)	2,6 ml
	H ₂ O dest.	3,3 ml
	Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8)	5 ml
	SDS (10 %)	400 µl
	APS (100 mg/ml)	100 µl
	TEMED	50 µl
SDS-Auftragspuffer (2 x)	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4 %
	Glycerin	20 %
	β-Mercaptoethanol	10 %
	Bromphenolblau	0,02 %
	H ₂ O dest.	ad 50 ml

Elektrophoresepuffer (10 x)	Tris	12,1 g
	Glycin	57,8 g
	SDS	4 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml
Färbeblösung	Serva Blau G	0,17 %
	Ethanol	45 %
	Essigsäure	10 %
Entfärbelösung	Ethanol	10 %
	Essigsäure	10 %
	H ₂ O dest.	80 %

2.1.5.3 Lösungen zur Isolierung der Gesamtmembranen

Frenchpresspuffer (für <i>E. coli</i>)	Tris/HCl, pH 8,0	0,2 M
	DNase (1 mg/ml)	300 µl/15 ml
	Complete (25 x)	600 ml/15 ml
Extraktionspuffer	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Triton X-100	2 %

2.1.5.4 Lösungen zur Proteinaufreinigung für Ni-NTA-Spin-Säulen

Solubilisierungspuffer	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	Detergenz (z.B. SDS, LDAO)	1 %
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0	50 mM
	NaCl	0,3 M

	Imidazol	10 mM
	SDS bzw. LDAO	0,2 %
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
	SDS bzw. LDAO	0,2 %
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
	SDS bzw. LDAO	0,2 %

2.1.5.5 Lösungen zur Proteinaufreinigung für Chitinbeads

Solubilisierungspuffer	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	LDAO bzw. SDS	1 %
	NaCl	500 mM
Equilibrierungspuffer	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	LDAO bzw. SDS	0,2 %
	NaCl	500 mM
Waschpuffer I	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	LDAO bzw. SDS	0,2 %
	NaCl	500 mM
Waschpuffer II	DTT	30 mM
	Tris/HCl pH 8,0	50 mM

	EDTA	1 mM
	LDAO bzw. SDS	0,2 %
	NaCl	500 mM
Elutionspuffer I	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	LDAO bzw. SDS	0,2 %
	NaCl	500 mM
Elutionspuffer II	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	LDAO bzw. SDS	0,2 %
	NaCl	500 mM
	GlcNAc	1 %

2.1.6 Bakterienstämme

Tab. 1: *Caulobacter crescentus*

Stamm	Merkmale	Herkunft
NA1000	<i>syn-1000</i> , Derivat von <i>Caulobacter crescentus</i> Wildtyp-Stamm CB15	Evinger und Agabian, 1977
JS1003	NA1000 <i>rsaA::KSAC</i> Km ^R – Kasette, Amp ^R	Edwards und Smit, 1991
UJ2602	CB15 <i>DrsaA</i>	Jenal, 2004
HB2003	JS1003 <i>malA::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Amp ^R , Spc ^R , Str ^R	Neugebauer, 2005
HB2004	JS1003 <i>tonB2::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Amp ^R , Spc ^R , Str ^R	Neugebauer, 2005
SL3508	JS1003 <i>tonB3::Gm^R</i> -Kasette, Km ^R , Amp ^R , GM ^R	diese Arbeit
SL8	HB2004 <i>tonB3::Gm^R</i> -Kasette, Km ^R , Amp ^R , Spc ^R , Str ^R GM ^R	diese Arbeit
SL9	HB2004 <i>tonB1::Gm^R</i> -Kasette, Km ^R , Amp ^R , Spc ^R , Str ^R GM ^R	diese Arbeit
SL2282	UJ2602 <i>malS::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
SL2283	UJ2602 <i>malY::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
SL2284	UJ2602 <i>malI::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
SL2334a	UJ2602 <i>tonB1::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
SE0446	UJ2602 <i>nagA::Ω</i> -Kasette, Km ^R , Spc ^R , Str ^R	Eisenbeis, 2006

Tab. 2: *Escherichia coli*

Stamm	Merkmale	Herkunft
DH5α	$\Delta(lacZYA-argF)U196$ <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+) <i>supE44 thi-1 gyrA relA1</i> ($\Phi 80$ $\Delta lacZ \Delta M15$) <i>deoR nal^R</i>	Hanahan, 1983
BL21 (DE) <i>omp8</i>	<i>hsdS B(rB⁻ mB⁻) gal ompT dcm</i> (DE3) $\Delta lamB$ <i>ompF::Tn5 $\Delta ompA \Delta ompC$ neo^R</i>	Prilipov <i>et al.</i> , 1998
BL21 <i>degP omp8</i>	<i>hsdS B(rB⁻ mB⁻) gal ompT dcm</i> (DE3) $\Delta lamB$ <i>ompF::Tn5 $\Delta ompA \Delta ompC$ neo^R degP</i>	Max-Planck Institut, Tübingen
S17-1λpir	<i>hsdR⁻ hsdM⁺ RP4-2-Tc::Mu Km::Tn7</i> (Tp^R , Sm^R) Tra^+ λ pir	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> ($r_K^- - m_K^+$), <i>relA1, supE44, Δ (lac – proAB), [F⁻, traD36, proAB, laqIqZΔM15]</i>	Promega
RD58	$\Delta malS$ Tet^R <i>malS::Tn10</i> (P1 von <i>malS::Tn10</i> in MC4100-1)	W. Boos, Konstanz
RD59	$\Delta malS$ Tet^R <i>malS::Tn10</i> (P1 von <i>malS::Tn10</i> in JB3018-2) <i>malTc</i>	W. Boos, Konstanz
JB3018-2	MC4100-1 <i>malTc</i>	W. Boos, Konstanz
MC4100-1	F- Δ (arg-lac)UJ69 <i>araD139 rpsLI50 ptsF25 flbB5301 rbsR deoC relA</i>	W. Boos, Konstanz

2.1.7 Klonierungsvektoren

Tab. 3: Klonierungsvektoren

Vektor	Merkmale	Herkunft
pDRIVE Cloning Vector	PCR-Klonierungsvektor, Km^R , Amp^R	Quiagen
pGEMTeasy	PCR-Klonierungsvektor, Amp^R	Promega
pBAD/myc-HisB	L-Ara-induzierbarer Expressionsvektor, Amp^R	Invitrogen

2.1.8 Plasmide

Tab. 4: Plasmide

pNPTS138Tet	Kan ^R derivative of pLITMUS with <i>sacB</i> and <i>oriT</i> mit Km ^R , Tet ^R	Neugebauer, 2005
pBSL202	R6K <i>oriV</i> , RP4 <i>oriT</i> , Amp ^R , Gm ^R	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pHP45Ω	enthält Ω-Kassette (Spc ^R , Str ^R) Amp ^R	Prentki und Krisch, 1984
pJS14	pBBRI-based Cam ^R broad host range-Vektor	Skerker (Jenal und Fuchs, 1998)
pBBR1-MCS2	Broad host range cloning Vektor, Kan ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1994 (Jenal und Fuchs, 1998)
pBAD0446His	pBAD/Myc-HisB <i>ccnagA</i> mit His-Tag, Amp ^R	diese Arbeit
pHB139	pNPTS138Tet <i>cc2326Ωcc2328</i> ; Km ^R , Tet ^R , Spc ^R , Str ^R	Neugebauer, 2005
pSL3508	pNPTS138Tet <i>cc3507Gm^Rcc3509</i> ; Km ^R , Tet ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pSL2282	pNPTS138Tet <i>cc2281Ωcc2283</i> ; Km ^R , Tet ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
pSL2283	pNPTS138Tet <i>cc2282Ωcc2284</i> ; Km ^R , Tet ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
pSL2284	pNPTS138Tet <i>cc2283Ωcc2285</i> ; Km ^R , Tet ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
pSL2334a	pNPTS138Tet <i>cc2333Ωcc2335</i> ; Km ^R , Tet ^R , Spc ^R , Str ^R	diese Arbeit
pSL2334Gma	pNPTS138Tet <i>cc2333Gm^Rcc2335</i> ; Km ^R , Tet ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pBB2287	pBBR1-MCS2 mit mutiertem <i>ccmaIA</i> (V15P), Kan ^R	diese Arbeit
pBBmaIA	pBBR1-MCS2 <i>cc2287</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pBBmaIS	pBBR1-MCS2 <i>cc2282</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pBBmaIY	pBBR1-MCS2 <i>cc2283</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pBBmaII	pBBR1-MCS2 <i>cc2284</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pBBtonB1	pBBR1-MCS2 <i>cc2334a</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pBBnagA	pBBR1-MCS2 <i>cc0446</i> , Kan ^R	diese Arbeit

2.1.9 Plasmidkonstruktionen

Tab. 5: Plasmidkonstruktionen

Plasmid	Konstruktion
pBAD0446His	3 kb <i>XhoI/HindIII</i> -PCR Fragment mit den Primern 0446f <i>XhoI</i> und 0446r <i>HindIII</i> in pBADMyc/HisB
pSL3508	<i>cc3507Gm^Rcc3509</i> über <i>EcoRI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.7.1)
pSL2282	<i>cc2281Ωcc2283</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.7.2)
pSL2283	<i>cc2282Ωcc2284</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.7.3)
pSL2284	<i>cc2283Ωcc2285</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.7.4)
pSL2334a	<i>cc2333Ωcc2335</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.7.6)
pSL2334Gma	<i>cc2333Gm^Rcc2335</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.7.6)
pBB2287	3 kb <i>EcoRV/SpeI</i> mit den Primern 2287for <i>EcoRV</i> und 2287rev <i>SpeI</i> in pBBRI-MCS2
pBBmalA	3 kb <i>EcoRV/SpeI</i> mit den Primern 2287for <i>EcoRV</i> und 2287rev <i>SpeI</i> in pBBRI-MCS2
pBBmalS	2,4 kb <i>SpeI/EcoRI</i> mit den Primern 2282Kfor <i>SpeI</i> und 2282Krev <i>EcoRI</i> in pBBRI-MCS2
pBBmalY	1,6 kb <i>SpeI/EcoRI</i> mit den Primern 2283Kfor <i>SpeI</i> und 2283rev <i>EcoRI</i> in pBBRI-MCS2
pBBmall	1,1 kb <i>EcoRI/SpeI</i> mit den Primern 2284Kfor <i>EcoRI</i> und 2284K <i>SpeI</i> in pBBRI-MCS2
pBBtonB1	740 bp <i>SpeI/EcoRI</i> mit den Primern 2334aKfor <i>SpeI</i> und 2334aKrev <i>EcoRI</i> in pBBRI-MCS2
pBBnagA	3 kb <i>XhoI/HindIII</i> -PCR Fragment mit den Primern 0446f <i>XhoI</i> und 0446r <i>HindIII</i> in pBBRI-MCS2

2.1.10 Synthetische Oligonukleotide

Die unterstrichenen Sequenzbereiche stellen die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme dar. Die Querstriche kennzeichnen die Schnittstelle.

Tab. 6: Synthetische Oligonukleotide

Primer für die Überprüfung von HB2004

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
CCP1for <i>SpeI</i>	5'-GA/CTAGTGTGTTCCGGAACTGGGATTTTCAG AAG-3'	2529101- 2529128
CCP2rev <i>SpeI</i>	5'-GA/CTAGTCATGGTCGCGGCTTATCTGACGGGT GATAAC-3'	2532268- 2532299
CCPfor	5'-GCATGTGCTCAGGAGTCACCGATCATAGTTAA CCC-3'	2530016- 2530050
CCPrev	5'-GGTCAGCCGCGAAATGATCCTGAACTTCATCG CTG-3'	2531051- 2531085
TonBrSL	5'-GCTTCATCTTGAAGAACCAGGAGATTTTCAGC- 3'	253829- 253860
P-Ω	5'-ACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGC-3'	bindet an beiden Enden der Spc ^R /Str ^R - Box aus pHP45Ω nach außen gerichtet

Primer für die Konstruktion und Überprüfung von SL3508

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
3508fA/ <i>f</i> II	5'-C/TTAAGAAGGCGGTCCCGGAAAGCGCGATGC AA-3'	3750783- 3750809
3508r <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCTCAGCCACAAGAGATAGGCG GGTA-3'	3752001- 3752024
3508f <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCATCGTCTGAGGCTCTGCAAC GAGAGGA-3'	3753097- 3753124

3508r <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCAACAAGATCGAGGTCCAGATTGGTG-3'	3754334-3754356
3508for	5'-TACCCGCCTATCTCTTGTGGCTGA-3'	3752001-3752024
3508rev	5'-TCCTCTCGTTGCAGAGCCTCAGACGAT-3'	3753097-3753124
P-Gm	5'-GCCCTCATGGATTTGACTTGGTCAGGG-3'	552-578 in Gm ^R aus pBSL202

Primer für die Konstruktion und Überprüfung von SL2282

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
2282f <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTAATAGGATCTTGGCCAAGCGAT-3'	2478134-2478155
2282r <i>SmaI</i>	5'-TCCCCC/GGGAAAAAGTGCGCGACAATGT-3'	2479198-2479216
2282f <i>SmaI</i>	5'-TCCCCC/GGGAGGACCTCGTCAGGCTTGAA-3'	1481544-2481563
2282r <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTATGCTGACCAACTGGTTCGA-3'	2482588-2482607
2282f <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCAATAGGATCTTGGCCAAGCGAT-3'	2478134-2478155
2282for	5'-ACATTGTCGCGCACTTTTTGGCCCCT-3'	2479198-2479223
2282rev	5'-TCCTTTTCCTTCAAGCCTGACGAGGTCCT-3'	1481572-2481563
P-Ω	5'-ACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGC -3'	bindet an beiden Enden der Spc ^R /Str ^R -Box aus pHP45Ω nach außen gerichtet

Primer für die Klonierung von cc2282 in pBBR1-MCS2

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
2282fK <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTGACATTGTCGCGCACTTTTTG-3'	2478960- 2478980
2282Rk <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCTTCAAGCCTGACGAGGTCCTC-3'	2479197- 2479217

Primer für die Konstruktion und Überprüfung von SL2283

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
2283f <i>SpeI</i>	5'-GGCGCA/CTAGTTTCAGCATCTTGCCGTAGAAC GCCTTCAGCT-3'	2480189- 2480219
2283r <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCTCCTTTTCCTTCAAGCCTGAC GAGGT-3'	2481547- 2481572
2283f <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCTTGCTTGAGCAATTCGGCG CGAT-3'	2483201- 2483224
2283r <i>SpeI</i>	5'-GGCGCA/CTAGTTCAACCTGGGCGGTGAGGGG CAGAT-3'	2484453- 2484477
2283f <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCTTTCAGCATCTTGCCGTAGAACGCCT TCAGCT-3'	2480189- 2480219
2283for	5'-ACCTCGTCAGGCTTGAAGGAAAAGGA-3'	2481547- 2481572
2283rev	5'-ATCGCGCCGAAATTGCTCAAGCAA-3'	2483201- 2483224
P-Ω	5'-ACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGC -3'	bindet an beiden Enden der Spc ^R /Str ^R -Box aus pHP45Ω nach außen gerichtet

Primer für die Klonierung von cc2283 in pBBR1-MCS2

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
2283fK <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTGAAGGTTTTCAACGTGCGCATGGC GAG-3'	2481519- 2481545
2283rK <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCTCATCTTTGAAAACCTTTGCAAAGAG TCGC-3'	2483273- 2483302

Primer für die Konstruktion und Überprüfung von SL2284

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
2284f <i>SpeI</i>	5'-GGCGCA/CTAGTAACTGGCGCATGGTCTTGGG CATACGGAAGA-3'	2482156- 2482186
2284r <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCTTCGGATCGAAATTCATCTTT GAAAA-3'	2483290- 2483315
2284f <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCACGGATCTGATCATCCGGGA AAGCT-3'	2484383- 2484408
2284r <i>SpeI</i>	5'-GGCGCA/CTAGTTGAACCTGCACAATCCCGCA GTCCAGGAA-3'	2485457- 2485485
2284f <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCAACTGGCGCATGGTCTTGGGCATAC GGAAGA-3'	2482156- 2482186
2284for	5'-TTTTCAAAGATGAATTTGATCCGAA-3'	2483290- 2483315
2284rev	5'-AGCTTTCCCGGATGATCAGATCCGT-3'	2484383- 2484407
P-Ω	5'-ACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGC-3'	bindet an beiden Enden der Spc ^R /Str ^R -Box aus pHP45Ω nach außen gerichtet

Primer für die Klonierung von *cc2284* in pBBR1-MCS2

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
2284fK <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCAATTCGGCGCGATGCGCTTTGACTGA-3'	2483211-2483237
2284rK <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTTGGCTGGACGCTGATCGACGGCGTCAACCT-3'	2484513-2484542

Primer für die Konstruktion und Überprüfung von SL2334a

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
2334af <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTTTTCATGGAAATGGCTCAACAGGTCGTG-3'	2535961-2535987
2334ar <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCGACTCCGGGGCGTTTTCCGTCAAAACATC-3'	2537497-2537526
2334af <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCTGCTCGGGCGTATTTTGATCA-3'	2538275-2538296
2334ar <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTGGCGGACTATTCAGAGTTAGG-3'	2539726-2539746
2334af <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCTTTCATGGAAATGGCTCAACAGGTCGTG-3'	2535961-2535987
2334afor	5'-GATGTTTTGAACGGAAAACGCCCCGGAGTC-3'	2537497-2537526
2334arev	5'-TGATCAAAATACGCCCCGAGCA-3'	2538275-2538296
P-Ω	5'-ACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGC -3'	bindet an beiden Enden der Spc ^R /Str ^R -Box aus pHP45Ω nach außen gerichtet

Primer für die Klonierung von *cc2334a* in pBBR1-MCS2

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
2334fK <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTCGTTGTCTTTAGTGGGATCGCCCT TCGGGATCA-3'	2537452- 2537484
2334rK <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCTTTACGTCTCGATCAAACAGTCGGG GCAGCTCTACCTTG-3'	2538509- 2538538

Primer für die Konstruktion und Überprüfung von SL9

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
2334af <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTTTTCATGGAAATGGCTCAACAGGTC GTG-3'	2535961- 2535987
2334ar <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCGACTCCGGGGCGTTTTCCGT TCAAACATC-3'	2537497- 2537526
2334af <i>EcoRV</i>	5'-CTGGAAGAT/ATCTGCTCGGGCGTATTTTGATC A-3'	2538275- 2538296
2334ar <i>SpeI</i>	5'-GGA/CTAGTGGCGGACTATTCAGAGTTAGG-3'	2539726- 2539746
2334af <i>EcoRI</i>	5'-GG/AATTCTTTTCATGGAAATGGCTCAACAGGTC GTG-3'	2535961- 2535987
2334afor	5'-GATGTTTTGAACGGAAAACGCCCGGAGTC-3'	2537497- 2537526
2334arev	5'-TGATCAAATACGCCCGAGCA-3'	2538275- 2538296
P-Gm	5'-GCCCTCATGGATTTGACTTGGTCAGGG-3'	552-578 in Gm ^R aus pBSL202

Primer für die Klonierung von *cc0446* in pBADMyHisB und pBBR1-MCS2

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
0446f <i>XhoI</i>	5'-GGGC/TCGAGTCATACCAATAACGACTCGGTCT GCAATTG-3'	461800- 461829
0446r <i>HindIII</i>	5'-GGGA/AGCTTAAGGTCACGCAGCCTCGCAGGA AAGGTCGT-3'	464797- 464806

Primer für die Klonierung von *cc2287* in pBBR1-MCS2

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
<i>EcoRV</i> for	5'-GGG <u>GAT/ATC</u> GTGGCGCAAAGAAGACACACAT CG-3'	2487989- 2488014
<i>SpeI</i> rev	5'-GGGA/ <u>CTAGT</u> AGACTGCAGGAGGAGGCTTGG- 3'	2490911- 2490931

Primer für die ortsspezifische Mutagenese in der TonB-Box von *MalA*

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
TonBbox- for	5'-ACCAAGGTCGAGGAACCGGTCATCACCGGC-3'	2488210- 2488239
TonBbox- rev	5'-GCCGGTGATGACCGGTTCTCGACCTTGGT-3'	2488210- 2488239

Sequenzierprimer

Primer	Sequenz	Position im CC- Genom
3508Seq1	5'-AAGCCATCATGTCCGAGGTGT-3'	3751600- 37516020
3508Seq2	5'-AATCTGGCCCTGGCAGGCGGTGTCCTCG-3'	3751928- 3751955
3508Seq3	5'-ACCTTCCCGTTCAACCTGACGAT-3'	3753245- 3753267
2282Seq1	5'-TACTGATTGGTGAGCTGTGA-3'	2478960- 2478980
2282Seq2	5'-AACAAAGGCCTCCGCCCGTGA-3'	2479100- 2479121
2283Seq1	5'-ATCGAGAACCAGACCTTCGACA-3'	2481352- 2401374
2283Seq2	5'-AATAGGCCCGAGGTCGTAGGCG-3'	2401452- 2401473
2284Seq1	5'-TGGTTCGCAAAATTTTTCATCT-3'	2483121- 2483142
2284Seq2	5'-TGA CTGACCCAGTGATCCGAC-3'	2483230- 2483251
2334a Seq1	5'-AATCTAGCGCTCTAACCAACTGAGCTAAGC-3'	2537407- 2537436

2334a Seq2	5'-CGTTATCTTCTACAACTACTT-3'	2538846- 2538865
0446Seq1	5'-CTGACTGCAAGCATGGAGCT-3'	464731- 464750
0446Seq2	5'-TCTATAATCACGGCAGAAAA-3'	151-170 in pBADMyc HisB
0446Seq3	5'-TCGAGAAAATTCCGTCACAGTCGCCTCCCG-3'	461851- 461880
0446Seq4	5'-ATCAATGCGCAATGACCGGAGACTTCGGAT-3'	464692- 464721
2287Seq1	5'-ATGAACACCCCAATTTTCGCGCCGTCGCGCCTG GCTGATGGCC -3'	2488159- 2488199
2287Seq2	5'-GATGGTCTGGCGCTGATCGTTGTTGTCGTA -3'	2490841- 2490870
2287Seq3	5'-CAATTTCCATTGCGCCATTCAGGCTG -3'	3379- 3413 in pBBR1- MCS2
2287Seq4	5'-TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA G -3'	3016- 3040 in pBBR1- MCS2
P-Gm	5'-GCCCTCATGGATTTGACTTGGTCAGGG-3'	552-578 in Gm ^R aus pBSL202
P-Ω	5'-ACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGC-3'	bindet an beiden Enden der Spc ^R /Str ^R -Box aus pHP45Ω nach außen gerichtet

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kulturbedingungen für *Caulobacter crescentus*

C. crescentus wurde in dem Komplexmedium PYE bzw. in dem Minimalmedium M2 mit entsprechender C-Quelle (Glucose, Maltose, Maltodextrine, N-Acetyl- β -D-glucosamin oder Chitinoligosacchariden) bei 30 °C in Kolben mit Schikane inkubiert. Auf PYE-Agarplatten war ein Wachstum der Bakterien nach 1-2 Tagen sichtbar. Bei M2-Agarplatten mit entsprechender C-Quelle war das Wachstum erst nach 2 bis 3 Tagen zu sehen.

2.2.1.2 Konjugation

Die Übertragung von Plasmid-DNA in *C. crescentus* erfolgte über Konjugation. Als Donor wurde der *E. coli* Stamm S17-1 λ pir gewählt. Dieser besitzt die zur Konjugation nötigen *tra*-Gene auf seiner chromosomalen DNA. Für die Konjugation wurde 1 ml ÜNK des Rezipienten *C. crescentus* mit 100 μ l ÜNK des Donors, welcher die gewünschte Plasmidsequenz enthielt vermischt und für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit suspendiert und auf einen auf einer PYE-Platte liegenden Nitrozellulosefilter (0,45 μ M, Satorius) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 4 h bei 30 °C wurden die Bakterien mit 1,5 ml PYE-Medium von den Filtern gewaschen und bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Nach Resuspendierung der Pellets in der verbliebenen Flüssigkeit wurden die Zellen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Nalidixinsäure wirkte gegen den Donor *E. coli* und Tet, Spc und Str bzw. Tet und Gm selektionierte auf die Insertion des entsprechenden Plasmids in das Chromosom von *C. crescentus*. Konjuganten wuchsen bei einer Inkubation von 30 °C nach 4 bis 5 Tagen.

2.2.1.3 Wachstumstest

Für Wachstumstests mit Maltodextrinen und Chitinoligosacchariden wurde eine ÜNK des zu untersuchenden Stammes oder eines Indikatorstammes auf eine Zelldichte von OD_{578} 1,0 eingestellt. Hiervon wurden 100 µl mit 3 ml vorgewärmtem Topagar (47. °C) gemischt und auf eine Agarplatte gegossen. Nach Abkühlen des Topagars wurden Filterplättchen (Ø 6 mm, Schleicher & Schuell), die zuvor mit 10 µl der zu testenden Substanz getränkt und anschließend getrocknet worden waren, aufgelegt.

Für Wachstumstests in Flüssigkultur wurden die zu testenden Stämme entweder in M2-Medium mit Maltose und höheren Maltodextrinen angezogen oder in M2-Medium mit GlcNAc, (GlcNAc)₃ oder (GlcNAc)₅ angezogen. Anschließend wurden die Zellen in M2-Medium ohne C-Quelle gewaschen und auf eine OD_{578} von 0,2 in den zu testenden Medien angeimpft.

2.2.2 Molekularbiologische/-genetische Methoden

2.2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte mit Hilfe des Easy-DNATM-Kits nach Angaben des Herstellers Invitrogen (Groningen, NL).

2.2.2.2 Klonierungstechniken

Restriktionsverdau, Behandlung mit alkalischer Phosphatase oder Klenow-Fragment und Ligation wurden nach Angaben der Hersteller (Roche Diagnostics, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach) bzw. nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in 1 % Agarosegelen erfolgte unter Verwendung von Flachbett-Elektrophoreseapparaturen der Firma Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA. Zur Anfärbung der DNA wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid (2 µg/ml) zugesetzt. Die DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese durch

langwelliges UV-Licht auf einem Transilluminator sichtbar und konnten fotografiert werden. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand eines 1 kb-DNA-Standards (Invitrogen, Groningen, NL) bestimmt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kits der Macherey-Nagel GmbH, Düren. Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der von Dagert und Ehrlich (1979) beschriebenen CaCl_2 -Methode. Die Transformation wurde nach Anleitung von Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt. Dabei wurden die kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA zuerst für 30 min auf Eis gestellt, anschließend für 90 sec bei 42 °C inkubiert und in Folge wiederum für 10 min auf Eis gestellt. Vor dem Ausplattieren erfolgte eine 30 - 90 minütige Inkubation in 1,5 ml TY-Medium bei 37 °C zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz der transformierten Zellen. Abschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen.

2.2.2.3 Plasmidisolierung

Die Plasmid-DNA wurde mit dem E.Z.N.A Plasmid-Kit nach Angaben des Herstellers (Pierce, Erlangen) isoliert. Um größere Mengen an DNA zu gewinnen wurden Nucleobond AX100-Säulen nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) verwendet.

2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik (Saiki *et al.* 1988) wurde angewandt, um plasmid- und chromosomal-codierte Gensequenzen zu amplifizieren. Dabei werden 3 Reaktionen (Denaturierung, Annealing, Elongation) zu einem Zyklus verbunden und 20 bis 40 Mal wiederholt. Ein PCR-Ansatz (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

10 ng	Plasmid DNA, chromosomale DNA
10 pmol	Primer
10 pmol	Gegenprimer

0,2 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10 %	10 x Reaktionspuffer
10 %	DMSO
1 U	DNA-Polymerase [Taq(Peqlab, Erlangen); Expand High Fidelity und Expand Long Template PCR System (Roche, Basel)]

Die Amplifikation erfolgte im Personal Cyclyer der Firma Biometra, Göttingen. Um Gensequenzen von *E. coli* zu amplifizieren wurde die Template-DNA zunächst für 3 min bei 94 °C denaturiert. Es folgten 35 Amplifikationszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94 °C, 2 min Annealing bei 54 °C, 3 min Elongation bei 72 °C und abschließend 10 min bei 72 °C. Um die GC-reichen Gensequenzen von *Caulobacter crescentus* zu amplifizieren wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt. Die Parameter waren dieselben wie bei *E. coli*, nur die Annealingtemperatur startete bei 65 °C und verringerte sich mit jedem Zyklus um 0,5 °C. Somit konnte eine optimale Annealingtemperatur erreicht werden.

2.2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach dem Prinzip der Didesoxy-Methode (SANGER *et al.*, 1977) mit dem Auto Read Sequencing-Kit der Firma Pharmacia Amersham Biotech, Freiburg, durchgeführt. Die anschließende Auftrennung erfolgte im A.L.F. DNA Sequencer von Pharmacia.

2.2.2.6 Überprüfung der *tonB*-Mutante HB2004

Durch eine Touch-down PCR (siehe 2.2.2.4) wurde die Mutante HB2004 mit Hilfe der Primer CCP1for*SpeI*/CCP2rev*SpeI* und CCPfor/CCPrev und CCPfor/TonBrSL sowie den Primern CCP1for*SpeI*/P-Ω und CCP2rev*SpeI*/P-Ω, getestet.

2.2.2.7 Chromosomale Knockout-Mutanten in *C. crescentus*

Die chromosomale Mutagenese erfolgte in Anlehnung an U. Jenal und T. Fuchs (1998). Nach dem Prinzip der homologen Rekombination wurde das entsprechende Gen in 2 Schritten durch eine Resistenzkassette ersetzt. Bei dem verwendeten Vektor pNPTS138Tet handelte es sich um einen suicide Vektor, welcher ausschließlich nach einer Integration in das Genom von *C. crescentus* repliziert wird. Es wurde ein Plasmid konstruiert, welches die stromauf- und -abwärts liegenden Genbereiche des zu deletierenden Gens enthält. Diese beiden angrenzenden Genbereiche wurden durch eine Resistenzkassette (Spc^R , Str^R bzw. Gm^R) miteinander verbunden. Im ersten Rekombinationsereignis inserierte das suicide Plasmid über homologe Genbereiche vollständig in das Chromosom von *C. crescentus*. Im zweiten Rekombinationsereignis diente das *sacB*-Gen des verwendeten Vektors pNPTS138Tet als Marker für die positive Selektion auf den Verlust des Vektoranteils. *SacB* stammt aus *B. subtilis*, codiert für die Levansucrase und ist nur in Gegenwart seines Induktors Saccharose für Gram-negative Bakterien letal. Durch das zweite homologe Rekombinationsereignis wurde im Idealfall das intakte chromosomale Gen durch die auf dem Vektor codierte Resistenzkassette ersetzt. Anhang 1 zeigt die schematische Darstellung der Konstruktion der im Folgenden beschriebenen chromosomalen Knockout-Mutanten.

2.2.2.7.1 Die *cc3508::Gm^R*-Mutante SL3508

Für die *cc3508*-Deletion (*cc3508*) wurden die 1,2 kb (*cc3507*) bzw. 1,25 kb (*cc3509*) großen angrenzenden DNA-Bereiche über PCR mit Hilfe der Primer P1f*Afl*/P1r*EcoRV* bzw. P2f*EcoRV*/P2r*EcoRI* amplifiziert. Nachdem die PCR-Produkte mit *EcoRV* verdaut und ligiert wurden, konnte das Ligationsprodukt als Template für die Amplifikation des 2,45 kb großen DNA-Fragments *cc3507cc3509* mit den Primern P1f*Afl* und P2r*EcoRI* verwendet werden. Es folgte die Zwischenklonierung des PCR-Produktes in den Vektor pDrive. Das Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert und mit Klenow-Fragment behandelt.

Darauf hin konnte über Blunt-End das Gm^R-Gen (0,6 kb *Mlu*I-Fragment aus pBSL202, mit Klenow-Fragment behandelt) zwischen *cc3507* und *cc3509* inserieren. Das *cc3507*Gm^R*cc3509*-Fragment wurde über *Eco*RI herausgeschnitten und in den *Eco*RI-linearisierten Vektor pNPTS138Tet kloniert. Das resultierende Plasmid pSL3508 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1 λ pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* JS1003 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde auf den Rezipienten und mit Gentamycin auf die Integration von pSL3508 selektioniert, so dass lediglich Kolonien des Rezipientenstammes mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Mit 3 % Saccharose und Gm wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *cc3508*-Gen selektioniert. Die Kolonien wurden auf Tet^S getestet und abschließend über PCR mit den Primern P1f*Af*II/P2r*Eco*RI und 3508for/3508rev und P2r*Eco*RI/P-Gm kontrolliert. Im Falle von *cc3508::Gm^R* zeigte das PCR-Produkt des Primerpaares P1f*Af*II/P2r*Eco*RI eine Größe von 3,1 kb im Vergleich zum 3,6 kb großen Wildtyp PCR-Fragment. Das PCR-Produkt der Primer 3508for/3508rev zeigte bei der *cc3508-Gm^R*-Mutante eine Größe von 0,6 kb im Gegensatz zur Wildtyp-Bande von 1,1 kb. Bei dem Primerpaar P2r*Eco*RI/P-Gm zeigte nur die *cc3508-Gm^R*-Mutante ein PCR-Produkt der Größe von 1,2 kb. Die *cc3508*-Deletion wurde abschließend durch Sequenzierung überprüft. Die resultierende *cc3508::Gm^R*-Mutante wurde SL3508 genannt.

2.2.2.7.2 Die Glucoamylase:: Ω -Mutante SL2282

Die 1,08 kb (*cc2281*) bzw. 1,06 kb (*cc2283*) großen, an das Gen der Glucoamylase (*cc2282*) angrenzenden Genabschnitte wurden über PCR mit Hilfe der Primer P1f*Spe*I/P1r*Sma*I bzw. P2f*Sma*I/P2r*Spe*I amplifiziert. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit *Sma*I und anschließender Ligation wurde der Ligationsansatz als Template für die Amplifikation des 2,15 kb großen DNA-Fragmentes *cc2281cc2283* mit den Primern P1f*Spe*I und P2r*Spe*I eingesetzt. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM zwischenkloniert. Das

hierdurch erhaltene Plasmid wurde mit *Sma*I linearisiert, damit die Ω -Kassette (2 kb-*Sma*I- Fragment aus pHP45 Ω ; Spc^R/Str^R) über die Blunt-end Schnittstelle zwischen *cc2281* und *cc2283* inserieren konnte. Nach Amplifikation von *cc2281* Ω *cc2283* mittels der Primer P1f*Spe*I und P2r*Spe*I und anschließendem *Spe*I-Verdau wurde das DNA-Fragment in den *Spe*I-linearisierten Vektor pNPTS138Tet (pNPTS138 mit 1,4 kb *Mlu*I-Tet-Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pSL2282 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1 λ pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* UJ2602 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde gegen den Donor *E. coli* und mit Spectinomycin/Streptomycin und Tetracyclin auf die Integration von pSL2282 in das Genom von *C. crescentus* selektioniert. Nur Kolonien des Stammes UJ2602 mit integriertem Plasmid konnten auf diesen Antibiotikaplatten wachsen. Mit 3 % Saccharose, Spc und Str wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und damit auf den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *cc2282*-Gen selektioniert. Die so erhaltenen Kolonien wurden auf ihre Tet-Sensitivität getestet und abschließend über PCR mit den Primern P1f*Spe*I/P2r*Spe*I und 2282for/2282rev und P1f*Spe*I/P- Ω und P2r*Spe*I/P- Ω kontrolliert. Im Falle von *cc2282::\Omega* wies das PCR-Produkt des Primerpaars P1f*Spe*I/P2r*Spe*I eine Größe von 4,1 kb im Vergleich zum 4,5 kb großen Wildtyp PCR-Fragment auf. Das PCR-Produkt der Primer 2282for/2282rev zeigte bei der *cc2282::\Omega*-Mutante eine Größe von 2,05 kb im Gegensatz zur Wildtyp-Bande von 2,4 kb. Bei dem Primerpaar P1f*Spe*I/P- Ω und P2r*Spe*I/P- Ω zeigte nur die *cc2282::\Omega*-Mutante ein PCR-Produkt der Größe von 1 kb. Die *cc2282*-Deletion wurde schließlich durch Sequenzierung überprüft. Die resultierende *cc2282::\Omega*-Mutante wurde SL2282 genannt.

2.2.2.7.3 Die Transporter:: Ω -Mutante SL2283

Auch hier wurden zunächst die an das Gen des Transporters (*cc2283*) angrenzenden Genabschnitte über PCR mit Hilfe der Primer P1f*Spe*I/P1r*Eco*RV (1,4 kb, *cc2282*) bzw. P2f*Eco*RV/P2r*Spe*I (1,3 kb, *cc2284*) amplifiziert. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit *Eco*RV und anschließender Ligation wurde

das Ligationsprodukt als Template für die Amplifikation des 2,7 kb großen DNA-Fragmentes *cc2282cc2284* mit den Primern *P1fSpeI* und *P2rSpeI* verwendet. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pDRIVE zwischenkloniert. Dieses konstruierte Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert, damit die Ω -Kassette (2 kb-*SmaI*- Fragment aus pHP45 Ω ; *Spc^R/Str^R*) über die Blunt-end Schnittstelle zwischen *cc2282* und *cc2284* inserieren konnte. Nach Amplifikation von *cc2282 Ω cc2284* mittels der Primer *P1fSpeI* und *P2rSpeI* und anschließendem *SpeI*-Verdau wurde das DNA-Fragment in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet (pNPTS138 mit 1,4 kb *MluI*-Tet-Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pSL2283 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1 λ pir eingeschleußt und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* UJ2602 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde gegen den Donor *E. coli* und mit Spectinomycin/Streptomycin und Tetracyclin auf die Integration von pSL2283 in das Genom von *C. crescentus* selektioniert. Nur Kolonien des Stammes UJ2602 mit integriertem Plasmid konnten auf diesen Antibiotikaplatten wachsen. Mit 3 % Saccharose, *Spc* und *Str* wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und damit auf den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *cc2283*-Gen selektioniert. Die so erhaltenen Kolonien wurden auf ihre Tet^S getestet und abschließend über PCR mit den Primern *P1fSpeI/P2rSpeI* und 2283for/2283rev und *P1fSpeI/P- Ω* und *P2rSpeI/P- Ω* kontrolliert. Im Falle von *cc2283:: Ω* wies das PCR-Produkt des Primerpaars *P1fSpeI/P2rSpeI* eine Größe von 4,7 kb im Vergleich zum 4,3 kb großen Wildtyp PCR-Fragment auf. Das PCR-Produkt der Primer 2283for/2283rev zeigte bei der *cc2283:: Ω* -Mutante eine Größe von 2 kb im Gegensatz zur Wildtyp-Bande mit einer Größe von 1,6 kb. Bei dem Primerpaar *P1fSpeI/P- Ω* und *P2rSpeI/P- Ω* zeigte nur die *cc2283:: Ω* -Mutante ein PCR-Produkt der Größe von 1,4 kb bzw. 1,3 kb. Die *cc2283*-Deletion wurde schließlich durch Sequenzierung überprüft. Die resultierende *cc2283:: Ω* -Mutante wurde SL2283 genannt.

2.2.2.7.4 Die Regulator:: Ω -Mutante SL2284

Die an das Regulatorgen (*cc2284*) angrenzenden Genbereiche wurden mittels PCR mit Hilfe der Primer P1f*SpeI*/P1r*EcoRV* (1,2 kb, *cc2283*) bzw. P2f*EcoRV*/P2r*SpeI* (1,1 kb, *cc2285*) amplifiziert. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit *EcoRV* und anschließender Ligation diente das Ligationsprodukt als Template für die Amplifikation des 2,3 kb großen DNA-Fragmentes *cc2283cc2285* mit den Primern P1f*SpeI* und P2r*SpeI*. Nach einer Zwischenklonierung dieses PCR-Produktes in den pDRIVE-Klonierungsvektor wurde das Plasmid mit *EcoRV* linearisiert, damit die Ω -Kassette (2 kb-*SmaI*-Fragment aus pHP45 Ω ; Spc^R/Str^R) über die blunt-Schnittstelle zwischen *cc2283* und *cc2285* inserieren konnte. Nach Amplifikation von *cc2283* Ω *cc2285* mittels der Primer P1f*SpeI* und P2r*SpeI* und anschließendem *SpeI*-Verdau wurde das DNA-Fragment in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet (pNPTS138 mit 1,4 kb *MluI*-Tet-Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pSL2284 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1 λ pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* UJ2602 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde auf den Rezipienten und mit Spectinomycin/Streptomycin und Tetracyclin auf die Integration von pSL2284 in das Genom von *C. crescentus* selektioniert. Nur Kolonien des Stammes UJ2602 mit integriertem Plasmid konnten auf diesen Antibiotikaplatten wachsen. Mit 3 % Saccharose, Spc und Str wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und damit auf den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *cc2284*-Gen selektioniert. Die so erhaltenen Kolonien wurden auf ihre Tet-Sensitivität getestet und abschließend über PCR mit den Primern P1f*SpeI*/P2r*SpeI* und 2284for/2284rev und P1f*SpeI*/P- Ω und P2r*SpeI*/P- Ω kontrolliert. Im Falle von *cc2284*:: Ω wies das PCR-Produkt des Primerpaars P1f*SpeI*/P2r*SpeI* eine Größe von 4,2 kb im Vergleich zum 3,3 kb großen Wildtyp PCR-Fragment auf. Das PCR-Produkt der Primer 2284for/2284rev zeigte bei der *cc2284*:: Ω -Mutante eine Größe von 2 kb im Gegensatz zur Wildtyp-Bande von 1,1 kb. Bei dem Primerpaar P1f*SpeI*/P- Ω und P2r*SpeI*/P- Ω zeigte nur die *cc2284*:: Ω -Mutante ein PCR-Produkt der Größe von

1,2 kb bzw. 1,1 kb. Die *cc2284*-Deletion wurde schließlich durch Sequenzierung überprüft. Die resultierende *cc2284::Ω*-Mutante wurde SL2284 genannt.

2.2.2.7.5 Die *tonB2::Ω tonB3::Gm^R*-Doppelmutante SL8

Die Konstruktion der *tonB2::Ω cc3508::Gm^R*-Mutante SL8 erfolgte wie unter 2.2.2.7.1 beschrieben, wobei als Rezipient der Stamm HB2004 verwendet wurde. Die *tonB2*-Deletion (*cc2327*) sowie die *cc3508*-Deletion (*cc3508*) wurden durch Sequenzierung überprüft. Die *tonB2::Ω cc3508::Gm^R*-Mutante wurde SL8 genannt.

2.2.2.7.6 Die *tonB1::Ω*-Mutante SL2334a

Die 1,56 kb (*cc2333*) bzw. 1,43 kb (*cc2335*) großen, an das zu deletierende Gen (*cc2334a*) angrenzenden Genabschnitte wurden über PCR mit Hilfe der Primer P1f*SpeI*/P1r*EcoRV* bzw. P2f*EcoRV*/P2r*SpeI* amplifiziert. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit *EcoRV* und anschließender Ligation wurde der Ligationsansatz als Template für die Amplifikation des 2,99 kb großen DNA-Fragmentes *cc2333cc2335* mit den Primern P1f*SpeI* und P2r*SpeI* eingesetzt. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pDRIVE zwischenkloniert. Das hierdurch erhaltene Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert, damit die Ω -Kassette (2 kb-*SmaI*- Fragment aus pHP45 Ω ; Spc^R/Str^R) über die blunt-Schnittstelle zwischen *cc2333* und *cc2334* inserieren konnte. Nach Amplifikation von *cc2333Ωcc2335* mittels der Primer P1f*SpeI* und P2r*SpeI* und anschließendem *SpeI*-Verdau wurde das DNA-Fragment in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet (pNPTS138 mit 1,4 kb *MluI*-Tet-Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pSL2334a wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1 λ pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* UJ2602 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde gegen den Donor *E. coli* und mit Spectinomycin/Streptomycin und Tetracyclin auf die Integration von pSL2334a in das Genom von *C. crescentus* selektioniert. Nur Kolonien des Stammes UJ2602 mit integriertem Plasmid konnten auf diesen

Antibiotikaplatten wachsen. Mit 3 % Saccharose, Spc und Str wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und damit auf den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *cc2334a*-Gen selektioniert. Die so erhaltenen Kolonien wurden auf ihre Tet-Sensitivität getestet und abschließend über PCR mit den Primern P1f*SpeI*/P2r*SpeI* und 2334Vfor/2334rev und P1f*SpeI*/P- Ω und P2r*SpeI*/P- Ω kontrolliert. Im Falle von *cc2334a::\Omega* wies das PCR-Produkt des Primerpaares P1f*SpeI*/P2r*SpeI* eine Größe von 5,04 kb im Vergleich zum 3,79 kb großen Wildtyp PCR-Fragment auf. Das PCR-Produkt der Primer 2334Vfor/2334rev zeigte bei der *cc2334a::\Omega*-Mutante eine Größe von 2 kb im Gegensatz zur Wildtyp-Bande von 803 bp. Bei dem Primerpaar P1f*SpeI*/P- Ω und P2r*SpeI*/P- Ω zeigte nur die *cc2334a::\Omega*-Mutante ein PCR-Produkt der Größe von 1,6 kb bzw. 1,4 kb. Die *cc2334a::\Omega*-Mutante wurde schließlich durch Sequenzierung überprüft. Die resultierende *cc2334a::\Omega* -Mutante wurde SL2334a genannt.

2.2.2.7.7 Die *tonB1::Gm^R tonB2::\Omega*-Mutante SL9

Die 1,56 kb (*cc2333*) bzw. 1,43 kb (*cc2335*) großen, an das zu deletierende Gen (*cc2334a*) angrenzenden Genabschnitte wurden über PCR mit Hilfe der Primer P1f*SpeI*/P1r*EcoRV* bzw. P2f*EcoRV*/P2r*SpeI* amplifiziert. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit *EcoRV* und anschließender Ligation wurde der Ligationsansatz als Template für die Amplifikation des 2,99 kb großen DNA-Fragmentes *cc2333cc2335* mit den Primern P1f*SpeI* und P2r*SpeI* eingesetzt. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pDRIVE zwischenkloniert. Das Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert und mit Klenow-Fragment behandelt. Darauf hin konnte über Blunt-End das Gm^R-Gen (0,6 kb *MluI*-Fragment aus pBSL202, mit Klenow-Fragment behandelt) zwischen *cc2333* und *cc2335* inserieren. Nach Amplifikation von *cc2333\Omega cc2335* mittels der Primer P1f*SpeI* und P2r*SpeI* und anschließendem *SpeI*-Verdau wurde das DNA-Fragment in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet (pNPTS138 mit 1,4 kb *MluI*-Tet-Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pSL2334*Gma* wurde in den *E. coli*-Stamm S17- λ pir transformiert und über Konjugation

(2.2.1.2) in den Rezipientenstamm HB2004 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde gegen den Donor *E. coli* und mit Gentamycin und Tetracyclin auf die Integration von pSL2334Gma in das Genom von *C. crescentus* HB2004 selektioniert. Nur Kolonien des Stammes HB2004 mit integriertem Plasmid konnten auf diesen Antibiotikaplatten wachsen. Mit 3 % Saccharose und Gm wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und damit auf den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *cc2334a*-Gen selektioniert. Allen Platten und Medien wurde die doppelte Menge an Eisensulfat zugegeben. Die so erhaltenen Kolonien wurden auf ihre Tet-Sensitivität getestet und abschließend über PCR mit den Primern P1f*SpeI*/P2r*SpeI* und 2334for/2334rev und P2r*SpeI*/P-Gm kontrolliert. Im Falle von *cc2334a::Gm^R cc2327::Ω*-Mutante wies das PCR-Produkt des Primerpaares P1f*SpeI*/P2r*SpeI* eine Größe von 3,86 kb im Vergleich zum 3,79 kb großen Wildtyp PCR-Fragment auf. Das PCR-Produkt der Primer 2334for/2334rev zeigte bei der *cc2334a::Gm^R cc2327::Ω*-Mutante eine Größe von 872 bp im Gegensatz zur Wildtyp-Bande von 799 bp. Bei dem Primerpaar P2r*SpeI*/P-Gm zeigte nur die *cc2334a::Gm^R cc2327::Ω*-Mutante ein PCR-Produkt der Größe von 1,9 kb. Die *cc2334a::Gm^R cc2327::Ω*-Mutante wurde schließlich durch Sequenzierung überprüft. Die resultierende *cc2334a1::Gm^R cc2327::Ω*-Mutante wurde SL9 genannt.

2.2.2.8 Punktmutagenese von Plasmid-DNA

Eine Mutation der Basen von doppelstrangiger Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QuickChange[®] XL-site-directed Mutagenesis-Kit nach Angaben des Herstellers Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

2.2.2.9 Transportmessungen mit ¹⁴C-markierter Maltose

Für die Messung der Aufnahmegeschwindigkeit wurde ¹⁴C-markierte Maltose bzw. ¹⁴C-markiertes GlcNAc verwendet und je 9 µl ¹⁴C-Maltose (20 µM im assay) zu 900 µl Zellen gegeben, bzw. je 9 µl ¹⁴C-GlcNAc (50 µM im assay) zu

900 µl Zellen gegeben. Nach je 0,2 min, 1 min, 2 min und 3 min wurden 200 µl von dem Ansatz entnommen, in 5 ml M2-Salzen abfiltriert und in weiteren 5 ml M2-Salzen gewaschen. Die Membranfilter mit den abfiltrierten Zellen wurden für 10 min bei 60 °C getrocknet, anschließend abgekühlt und mit 6 ml Scintillationsflüssigkeit bedeckt. Die Messung der einzelnen Proben erfolgte im Beta Counter.

2.2.3 Proteintechniken

2.2.3.1 Proteinbestimmung

Die Konzentration der Proteine wurde durch Hilfe der BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985) mit dem BCA Protein Assay-Kit der Firma Pierce, Rockford, Illinois, USA in Mikrotiterplatten und einem Multiscan Plus MKII (Flow) Photometer bei einer Messwellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Kalibrierung wurde eine 10 mg/ml BSA-Stammlösung verwendet.

2.2.3.2 Überexpression von Proteinen

Die Überexpression erfolgte mit Hilfe des Arabinose-regulierten Expressionsvektors pBAD/MycHisB im Stamm BL21 (DE) omp8 bzw. BL21 (DE) degP omp8. Bei der Überexpression von NagA mittels pBAD/MycHisB wurden 200 ml Kulturvolumen mit 2 ml ÜNK angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde mit 0,002 % L-Arabinose induziert und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss auf eine OD₅₇₈ von 0,5 eingestellt und bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert.

2.2.3.3 Isolierung der äußeren Membran von *E. coli*

Die unter 2.2.3.2 abzentrifugierten überexprimierenden Zellen wurden in 15 ml Frenchpress-Puffer plus Proteasehemmer aufgenommen. Es folgte der Zellaufschluss mittels Frenchpress in 1 bis 2 Durchgängen á 16000 psi. Nicht

aufgeschlossene Zellen wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 15 ml Extraktionspuffer versetzt. Nach einer 60-minütigen Zentrifugation bei 18000 rpm wurde das Pellet, welches die äußere Membranfraktion darstellt, zweimal mit je 10 ml H₂O gewaschen. Das Pellet wurde abschließend in 100 µl H₂O resuspendiert bzw. zur Aufreinigung (2.2.3.5) eingesetzt.

2.2.3.4 Aufreinigung von NagAHis₆ über Ni-NTA-Säulen

Die äußere Membranpräparation aus 200 ml Kulturvolumen (2.2.3.3) wurde in 2,5 ml Solubilisierungspuffer mit 1 % SDS bzw. 1 % LDAO resuspendiert und über Nacht bei 12 °C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 20 min bei 14000 rpm abgefugt. Im Überstand befanden sich die durch das Detergenz aus der äußeren Membran herausgelösten Proteine. Das Solubilisat wurde mit Hilfe von PD10-Säulen (Amersham Biosciences) umgepuffert, wobei die löslichen Proteine anschließend in Lysepuffer mit 0,2 % SDS bzw. 0,2 % LDAO vorlagen. Die umgepufferten Proben wurden anschließend mit Zentrifugationsfiltrerröhrchen (Amicon) auf 600 µl Volumen eingengt. NagAHis₆ wurden danach über Ni-NTA beladene Spinsäulen sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (Qiagenprotokoll). Dazu wurden die Spinsäulen mit 600 µl des entsprechenden Lysepuffers equilibriert und für 2 min bei 700 x g zentrifugiert. Auf die Säulen wurden 600 µl des konzentrierten Protein-Solubilisats geladen und ebenfalls 2 min bei 700 x g abzentrifugiert. Mit je 600 µl Waschpuffer wurden unspezifisch gebundene Proteine durch 2 x 2 minütige Zentrifugation bei 700 x g ausgewaschen. Die Elution des His-Taq-Proteins-NagAHis₆ erfolgte mit 2 x 100 µl Elutionspuffer durch zweiminütige Zentrifugation bei 700 x g. Um die Löslichkeit zu bewahren wurden die 0,2 % SDS bzw. 0,2 % LDAO enthaltenen Proteinfractionen bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3.5 Aufreinigung von NagAHis₆ über Chitin Beads

Die äußere Membranpräparation aus 200 ml Kulturvolumen (2.2.3.3) wurde in 2,5 ml Solubilisierungspuffer mit 1 % LDAO bzw. 1 % SDS resuspendiert und über Nacht bei 12 °C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 20 min bei 14000 rpm abgefugt. Das Solubilisat wurde bei 4 °C auf eine 1 ml Chitin Bead Säule geladen, die zuvor mit 5 cv Equilibrierungspuffer behandelt wurde. Die beladene Säule wurde mit 10 cv Waschpuffer I gewaschen und mit 3 cv Waschpuffer II bei geschlossener Säule über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Abschließend wurden 3 cv Elutionspuffer I bzw. Elutionspuffer II auf die Säule gegeben. In diesem Schritt wurde das gereinigte NagAHis₆ von der Säule gewaschen und konnte in einem SDS-Gel aufgetragen werden.

2.2.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der von Lugtenberg *et al.* (1975) beschriebenen Methode mit der Vertikal-Gelelektrophorese-Kammer von Biometra. Die Proteinauftrennung wurde in einem 13 %igen Trenngel durchgeführt. Hierzu wurden die Proben 1:1 mit SDS-PAGE-Auftragspuffer versetzt und vor dem Gelauftrag für 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Für das Proteingel wurden jeweils 15 µl jeder Probe eingesetzt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine 10 kDa-Proteinleiter von Fermentas. Die angelegte Stromstärke betrug 25 mA. Das Anfärben der Proteine erfolgte unter 40 minütigem, leichtem Schütteln in der Färbelösung. Die Entfärbung fand unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung ebenfalls bei leichtem Schütteln statt.

2.2.3.7 Kanalmessung in „black lipid“ Membranen

Die Experimente zur Kanalmessung von NagA wurden nach der von Benz *et al.* (1978) beschriebenen Methode am Lehrstuhl von Prof. Dr. R. Benz in Würzburg durchgeführt. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit diente eine Teflonzelle, die durch eine Wand mit einem 0,5 mm² großen Loch in 2 Kompartimente unterteilt

war. Zur Präparation der Teflonzelle wurden 5 µl 2 %iges Diphytanoyl-Phosphatidylcholin gelöst in Chloroform um das Loch aufgetragen. Nach der Verdunstung des Chloroforms wurden die Kompartimente der präparierten Teflonzelle mit je 5 ml Elektrolyt-Lösung (1 M KCl) gefüllt. Zum Spreiten der künstlichen Lipidmembran wurden 5 µl 2 %iges Diphytanoyl-Phosphatidylcholin in n-Decan über das Loch gezogen. Nach dem Abfließen von überschüssigem Lipid bildete sich eine bimolekulare Schicht, die „black-lipid“-Membran. Anschließend wurden in jedes Kompartiment der Teflonzelle 5-10 ng der NagA-Probe (2.2.3.5) zugegeben. Außerdem wurde in jedes Kompartiment eine Kalomelelektrode angebracht. Eine der beiden Elektroden wurde an die Spannungsquelle angeschlossen, die andere an den Verstärker. Das verstärkte Signal wurde zu einem Oszillograph geleitet und mit Hilfe eines Schreibers registriert. Die Spannung betrug 20 mV, die Signalverstärkung 10^9 V/A.

3 Ergebnisse

3.1 Suche nach einem zweiten TonB-Protein in *Caulobacter crescentus*

Die Genomsequenz von *C. crescentus* sagt 67 TonB-abhängige Membranrezeptoren voraus, die nicht alle für die Eisenversorgung zuständig sein können. Tatsächlich konnte ein äußeres Membranprotein identifiziert werden (Neugebauer *et al.*, 2005), welches für den Transport von Maltose und größeren Maltooligosacchariden über die äußere Membran verantwortlich ist. Das dafür codierende Gen *cc2287* wird durch Maltose induziert und als *malA* bezeichnet. Eine chromosomale *malA*-Deletionsmutante transportierte lediglich 1 % der radioaktiven Maltose, verglichen zur Wildtypzelle, welche bei 100 % liegt. Die in der Datenbank vorhergesagte TonB-Abhängigkeit von MalA konnte bisher nicht gezeigt werden, da eine Deletion des vorhergesagten *tonB*-Gens (*cc2327*), im Folgenden als *tonB2* beschrieben, immer Wildtypverhalten zeigte. Für eine energieabhängige Aufnahme der Maltodextrine sprachen dagegen Wachstumstests mit einer chromosomalen *exbB/D*-Mutante von *C. crescentus*, welche auf größeren Maltodextrinen nicht mehr wachsen konnte (Neugebauer *et al.*, 2005). Diese *exbB/D*-Mutante wuchs unter Eisenmangelbedingungen sehr schlecht, da die Siderophore Rhodotorulasäure und Desferal, die bei *E. coli* TonB-abhängig aufgenommen werden, kaum zur Eisenversorgung genutzt werden konnten. Auch im radioaktiven Maltosetransport zeigte die *exbB/D*-Mutante keine Aktivität. Da es unwahrscheinlich ist, dass die ExbB- und ExbD-Proteine die cytoplasmatische Energie ohne ein TonB-Protein an den äußeren Membranrezeptor übertragen können, wurde vermutet, dass ein zweites TonB-Protein auf dem Chromosom von *C. crescentus* codiert ist.

N-Acetyl- β -D-Glucosamin (GlcNAc) und seine höheren Homologen (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ sind weitere Substrate, für die eine ExbB/D-abhängige Aufnahme über den äußeren Membranrezeptor NagA nachgewiesen wurde.

Auch hier zeigte eine TonB2-Deletionsmutante stets Wildtypverhalten (Eisenbeis, 2006).

Für die Identifikation des MalA-Proteins in *Caulobacter crescentus* wurde die S-Layer-Mutante JS1003 verwendet, ein Abkömmling von *C. crescentus* CB15. Diese Mutante synthetisiert das in der Zellmembran vorkommende Protein RsaA nicht mehr (Edwards und Smit, 1991). RsaA bildet an der Zelloberfläche eine zweidimensionale kristalline Schicht (S-Layer), die für das Bakterium eine Art Schutzschicht darstellt, für das Wachstum des Bakteriums jedoch nicht essentiell ist. Da dieses Protein in der äußeren Membran mengenmäßig dominiert, ist es für die Identifizierung äußerer Membranproteine vorteilhaft, mit einer RsaA-Mutante zu arbeiten. Mit beschriebener RsaA-Mutante JS1003 bzw. einem verwandten, ebenfalls von CB15 abstammenden Stamm UJ2602 wurden auch in dieser Arbeit alle Untersuchungen durchgeführt.

3.1.1 Überprüfung der *tonB2*-Mutante HB2004

Um sicher zu stellen, dass es sich bei der Mutante HB2004 (Neugebauer, 2004) um eine *tonB*-Deletionsmutante handelt, wurde mittels PCR (2.2.2.4) und verschiedenen Primern (2.1.10) auf das Fehlen des *tonB2*-Gens (*cc2327*) bei der Mutante HB2004, bzw. als Positivkontrolle auf das Vorhandensein des *tonB2*-Gens beim Wildtyp getestet. Die PCR-Proben wurden in ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und unter einem Transilluminator sichtbar gemacht, anschließend aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland versendet. Das PCR-Produkt des Primerpaars CCP1for*SpeI*/CCP2rev*SpeI* wies bei der *tonB2*-Mutante HB2004 eine Größe von 4,2 kb auf, während es beim Wildtyp UJ2602 eine Größe von 3,2 kb aufwies. Das PCR-Produkt der Primer CCPfor/CCPrev besaß bei der HB2004-Mutante eine Größe von 2,1 kb, wohingegen die Größe der Wildtyp-Bande bei 1,1 kb lag. Bei den Primern CCPfor/TonBrSL zeigte nur der Wildtyp eine Bande von 844 bp. Bei dem Primerpaar CCP1for*SpeI*/P- Ω und CCP2rev*SpeI*/P- Ω wies nur die HB2004-Mutante ein PCR-Produkt der Größe von 1 kb bzw. 1,3 kb auf.

Die anschließende Sequenzierung der entstandenen PCR-Fragmente konnte die *tonB2*-Deletion in HB2004 bestätigen.

3.1.2 Datenbankinformationen über CC2327

Das in der Datenbank als mutmaßliches TonB-Protein bezeichnete Protein CC2327 von *C. crescentus* besitzt diverse charakteristische Merkmale des gut untersuchten *E. coli* TonB-Proteins. Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist die Größe der Proteine nahezu identisch. Das *E. coli* TonB-Protein besteht aus 239 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 26094 Da, während sich das TonB2 Protein von *Caulobacter crescentus* CC2327 aus 240 AS und einem Molekulargewicht von 25120 Da zusammensetzt. Beide Proteine besitzen einen hydrophoben N-terminalen Transmembranbereich in der Cytoplasmamembran und eine prolinreiche Region in der Mitte des Proteins. In enger Nachbarschaft von *tonB2* (*cc2327*) sind die Gene *exbD* (*cc2335*) und *exbB* (*cc2336*) codiert, die zusammen mit dem *tonB*-Gen den Energietransduktionskomplex in der Cytoplasmamembran bilden. Allerdings sind die *exbB/D*-Gene in entgegengesetzter Leserichtung zu *tonB2* angeordnet. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi??db=nucleotid&val=NC_00269). CC2327 und das *E. coli* TonB-Protein sind lediglich zu 26 % identisch, was jedoch keinen Rückschluss auf die Funktion von CC2327 zulässt, da *E. coli* und *C. crescentus* phylogenetisch nicht sehr eng miteinander verwandt sind.

```
EcTonB    MTLDLPRR-----FPWPTLLSVCIHGAVVAGLLYTSVHQVIELPAPAQPISVT 48
CcTonB2   MALALNPNGFGIPGLDNPPPKPAKVLLIGLGVSGALHIALIGYLAYQKWTQPLPLM 56
          *: *  .          * * .  . * : *  * : * * : : :  :          : * : : :

EcTonB    MVTPADLEPPQAVQPPPEPVVEPEPEPEPIPEPPKEAPVVIEKPKPKPKPKPKPVK 104
CcTonB2   SPDTGFIVETVPLTPKPPPPSPPTEKPPPAAAAPK---LHIPAPTPLETPPP---- 106
          . : . . : * * *  * : * * . . * * : *  * . * *

EcTonB    KVQEQPKRDVKPVESRPASPFENTAPARLTSSTATAATSKPVTSVASGPRALSRNQ 160
CcTonB2   -LFADPR--IIPAGPTTTGPVTTLAPAAATTPSPPQPPPKVITRANWQRIPSADEM 159
          :  : * : * . . . . * . . * * *  * . . . . * : * .  . : :

EcTonB    PQ-YPARAQALRIEGQVKVKFDVTPDGRVDNVQILSAKPANM-FEREVKNAMRRWR 214
CcTonB2   ARYYPESAQRRLSGQVTLNCMVALNGTVRDCVVATESPADEGFGSAALKISRFFK 214
          . : * *  * *  : . * * : :  * : * * :  : : . * :  *  . :  * :

EcTonB    YEP----GKPGSGIVVNILFKINGTTEIQ 239
CcTonB2   MKPQTENGDPVDGATVRIPIRFNAGA--- 240
          : *      * . *  . * . *  : : * . :
```

Abb. 1: Sequenzvergleich des charakteristischen *E. coli* TonBs und CCTonB2 aus *C. crescentus*

EcTonB bezeichnet das charakteristische TonB-Protein (P02929) aus *E. coli*, CcTonB2 bezeichnet das mutmaßliche TonB2-Protein (CC2327) aus *C. crescentus*. Fettgedruckt sind charakteristische Merkmale des *E. coli* TonB-Proteins, die auch bei CcTonB2 zu finden sind.

Da die TonB2-Mutante keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp bzgl. der Maltodextrin- und GlcNAc-Aufnahme zeigte (Neugebauer *et al.* 2005 und Eisenbeis 2006), wurde in dem Genom von *C. crescentus* nach homologen TonB-Sequenzen gesucht, welche eventuell Proteine darstellen, die den vermuteten energieabhängigen Transport von Eisensiderophorkomplexen bzw. größeren Maltodextrinen und Chitinoligosacchariden in *Caulobacter crescentus* ermöglichen.

3.1.3 Identifizierung des *tonB3*-Gens in *C. crescentus* durch Sequenzvergleiche

Um ein funktionelles TonB-Protein zu finden wurde die Genomsequenz von *C. crescentus* mit der mutmaßlichen TonB2-Sequenz (CC2327) geblastet (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl?sequence=Q9A5X0> und <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/proteomes.html>). Eine Reihe von homologen Proteinen ergab sich, die in der Datenbank meist nur als „hypothetical protein“ bezeichnet und

bisher nicht näher beschrieben wurden. Das Protein mit dem besten BLAST score war bei *C. crescentus* das Protein CC3508, bezeichnet als hypothetisches Protein, welches im Folgenden TonB3 genannt wird. Genanntes Protein CC3508 besteht aus 401 AS, einem Molekulargewicht von 42072 Da und besitzt 5 Transmembranbereiche. Der Vergleich zwischen CC2327 und CC3508 weist eine Identität von 43 % und eine Homologie von 61 % auf, welche vor allem im C-Terminus zu finden ist (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePage.spl?locus=CC2327>). Das Alignment von TonB2 und TonB3 ist Abbildung 2 zu entnehmen.

CcTonB2	-----MALALNPNGFGIPGLDN	17
CcTonB3	MSAAVL SGLMGANLALAGGVLVVMAVRGPVRRRF GALPAYLLWLTPPLCALAALAP	56
	* * . * . . : . . *	
CcTonB2	PPPKPAKVLLIGLGVSGALHIALIGYLAYQKWTQP-----LPLMSPDTGFIVETV	67
CcTonB3	APIEATPLAPILITAGKAARAAPPVVLATSTVAQPVLALWALGALVAAAFLVRQA	112
	. * : . : : * : . . * : * : ** . . : ** * : . . : * : * . .	
CcTonB2	PLTPKPPPPSPPT EP----- PPAAAA PKLH IPAPT PLET PPP -----	105
CcTonB3	RFTRSLGSLRPHPADPRLLIGQHVAGPMVLASPWPRIVAPADFDTRFQGEARDLV	168
	: * . . * . . * * . * : * * : : * *	
CcTonB2	-----	105
CcTonB3	LAHERVHLARGDAQINALVVALQCLCWFNPLVHLGAHRLRLDQEMACDEAVLARRP	224
CcTonB2	-----LFADPRIIPAGPTTTG-----PVTTLA	127
CcTonB3	EARRLYAETLLDITLAPRVVFPFGCHWPAGGAHPLKERLIMLNIPTRSPAKRATGLA	280
	: * * : * * . * * *	
CcTonB2	PAATTPPS-----PPQPPPKVITRANWQRIPSADEMARY YP ESAQRRLSGQVT	176
CcTonB3	LAALVGLAGAGAVWAAEARPAPVITKPNWIAKPTANDMARF YP AAAKAAKAEGFAV	336
	* * . : . * . * * : * * : * : * : * : * : * : * : * . .	
CcTonB2	LNCMVALNGTVRDCVVATESPADEGFGSAALKISRFFKMKPQTENGDPVDGATVRI	232
CcTonB3	IDCRVTATGQLTACKVLRESADAYGFGAAALQLGTIFQMSPLTIDGKPVNGGQVTI	329
	: : * * : * : * * * . * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
CcTonB2	PIRFNAGA-	240
CcTonB3	PIRFSVPQT	401
	*** . .	

Abb. 2: Sequenzvergleich von CcTonB2 und CcTonB3 aus *C. crescentus*
CcTonB2 bezeichnet das mutmaßliche TonB2-Protein (CC2327) aus *C. crescentus* und CcTonB3 bezeichnet das mutmaßliche TonB3-Protein (CC3508) aus *C. crescentus*. Fettgedruckt sind charakteristische Merkmale des *E. coli* TonB-Proteins, die auch bei CcTonB2 und CcTonB3 zu finden sind.

Homologievergleiche zeigten, dass CC3508 des Weiteren eine sehr hohe Ähnlichkeit zu Proteinen aus der Gattung *Xanthomonas* besitzt (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_3508). Bei einem Blast von CC3508 zeigten nachfolgende Treffer in der Datenbank mehrere TonB- bzw. TonB-ähnliche Proteine anderer Bakterien an, beispielsweise mit einer Identität von 45 % und einer Homologie von 51 % zu *Xanthomonas axonopodis* XAC3362. Für diesen Organismus werden 2 TonB-Proteine und 3 TonB-ähnliche Proteine vorhergesagt (GenBank accession no. NC_003919). Für das TonB-ähnliche Protein von *Xanthomonas oryzae* MAFF 311018 wird eine Identität von 47 % und eine Homologie von 56 % vorhergesagt. Dieser Organismus besitzt 2 TonB-Proteine und 4 TonB-ähnliche Proteine. Weitere Homologievergleiche zeigten, dass CC3508 zusätzlich eine Ähnlichkeit zu dem TonB-Protein aus *B. thetaiotaomicron* BT0813 besitzt (27 % Identität und 45 % Homologie; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Zu XCC3205, das wie CCTonB3 ebenfalls sehr groß ist (433 AS) und als TonB-ähnliches Protein bezeichnet wird, weist CC3508 eine Identität und Homologie von 35 % bzw. 44 % auf. Dies zeigte zum einen, dass es in vielen Bakterienarten mehr als ein TonB-Protein gibt und zum anderen, dass das mutmaßliche TonB2 (CC2327) sowie TonB3 (CC3508) aus *C. crescentus* eine Homologie zu weiteren TonB-Proteinen bzw. TonB-ähnlichen Proteinen aufweist. Die Vermutung, dass es sich bei CC3508 tatsächlich um ein TonB-Protein handeln könnte, welches die eigentliche TonB-Funktion in der Maltose- und GlcNAc-Aufnahme ausübt oder aber die Funktion von CC2327 übernehmen kann, lag daher nahe. Codierende Gene in der Umgebung von *cc3508* sind in Anhang 2 gelistet. Sie codieren für Proteine, die nicht mit der Energietransduktion oder der Maltose- und GlcNAc-Aufnahme in Zusammenhang gebracht werden können.

3.1.4 Herstellung der Mutante *tonB3::Gm^R*-Mutante SL3508

Um zu überprüfen, ob es sich bei CC3508 um ein TonB-Protein handelt, welches an der energieabhängigen Aufnahme von Maltodextrinen in *C.*

crescentus beteiligt ist, wurde die chromosomale Deletionsmutante SL3508, wie in Kapitel 2.2.2.7.1 beschrieben, erstellt. Dabei wurde das chromosomal codierte Gen *cc3508* in JS1003 durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt. Der Phänotyp der Mutante SL3508 wurde im Anschluss mittels Transportmessungen mit ^{14}C -Maltose bzw. mit ^{14}C -GlcNAc analysiert.

3.1.4.1 Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose und ^{14}C -markiertem GlcNAc in SL3508

Zur Unterscheidung zwischen Diffusion und aktivem Transport wird die Aufnahmegeschwindigkeit eines radioaktiv markierten Substrats gemessen. Bei einer reinen Diffusion ist die Geschwindigkeit der Substrataufnahme geringer als bei einem aktiven Transport. Verabreicht man *C. crescentus* ^{14}C -markierte Maltose oder GlcNAc, können durch die Messung der Radioaktivität in verschiedenen Zeitabständen Rückschlüsse auf die Art der Substrataufnahme gezogen werden. Die Messung der Transportrate (Moleküle ^{14}C -Maltose/GlcNAc pro Zeit) diente dem Funktionstest von CC3508. Dazu wurde die Transportrate der Mutante SL3508 gegenüber dem Wildtyp JS1003 getestet. Sollte das Gen *cc3508* tatsächlich für ein TonB-Protein codieren, müsste die Transportrate von SL3508 deutlich geringer ausfallen als die Werte des Wildtyps, der die Maltose bzw. das GlcNAc noch TonB-abhängig, d.h. über einen aktiven Transport aufnehmen kann. Für die Messungen wurden einmal sowohl der Wildtyp JS1003 als auch die Mutante SL3508 in 10 ml M2-Medium mit je 0,3 % Maltose angeimpft. Nach 1 bis 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, einmal in M2-Medium gewaschen und auf eine OD_{578} von 0,5 - 0,6 eingestellt. Für die Messung der Aufnahmegeschwindigkeit wurde ^{14}C -markierte Maltose verwendet und je 9 μl ^{14}C -Maltose (20 μM im assay) zu 900 μl Zellen gegeben. Nach je 0,2 min, 1 min, 2 min und 3 min wurden dem Ansatz 200 μl entnommen, in 5 ml M2-Salzen abfiltriert und in weiteren 5 ml M2-Salzen gewaschen. Die Membranfilter mit den abfiltrierten Zellen wurden für 10 min bei 60 °C getrocknet, anschließend abgekühlt und mit 6 ml Scintillationsflüssigkeit bedeckt. Die Messung der einzelnen Proben erfolgte im Beta Counter.

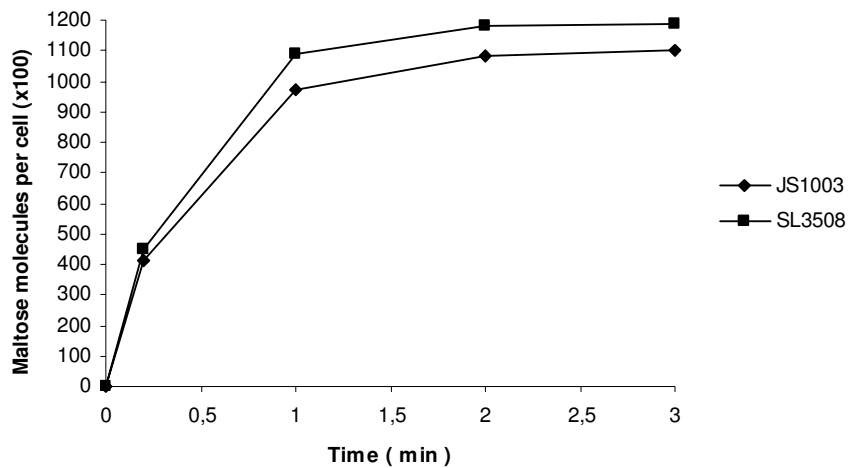


Abb. 3: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird die Mutante SL3508 mit dem Wildtyp JS1003 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

In Abbildung 3 sind die Messwerte des Wildtyps JS1003 und der TonB3-Mutante SL3508 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose dargestellt. Wie zu sehen ist verhielt sich die Mutante SL3508 wie der Wildtyp JS1003. Beide Stämme konnten die angebotene radioaktive Maltose rasch aufnehmen und in das Innere der Zelle transportieren. Ein Fehlen des Gens *cc3508* hatte keinen Einfluss auf die Maltoseaufnahme bei *C. crescentus*.

Da das Fehlen des Gens *cc2327* (*tonB2*) ebenfalls keinen Einfluß auf das Wachstum oder den radioaktiven Transport von GlcNAc und seine höheren Homologen (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ hat (Eisenbeis, 2006), wurde auch hier der Einfluß des Gens *cc3508* auf die Aufnahme dieser Substrate mittels eines radioaktiven Transportversuchs getestet. Für die Messungen wurden der Wildtyp UJ2602 und die Mutante SL3508 in 10 ml M2-Medium mit je 0,4 % GlcNAc angeimpft. Anstelle des Wildtyps JS1003 wurde der Stamm UJ2602 als Wildtyp gewählt, da dieser eine bessere Reproduzierbarkeit in den durchgeführten Transportversuchen aufwies. Nach 1 bis 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, einmal in M2-Medium gewaschen und auf eine OD₅₇₈ von 0,5 - 0,6 eingestellt. Für die Messung der Aufnahmegeschwindigkeit wurde ^{14}C -markiertes GlcNAc verwendet, wovon je 9 µl ^{14}C -GlcNAc (50 µM im

assay) zu 900 µl Zellen gegeben wurden. Nach je 0,2 min, 1 min, 2 min und 3 min wurden dem Ansatz 200 µl entnommen, in 5 ml M2-Salzen abfiltriert und in weiteren 5 ml M2-Salzen gewaschen. Die Membranfilter mit den abfiltrierten Zellen wurden für 10 min bei 60 °C getrocknet, anschließend abgekühlt und mit 6 ml Scintillationsflüssigkeit bedeckt. Die Messung der einzelnen Proben erfolgte im Beta Counter.

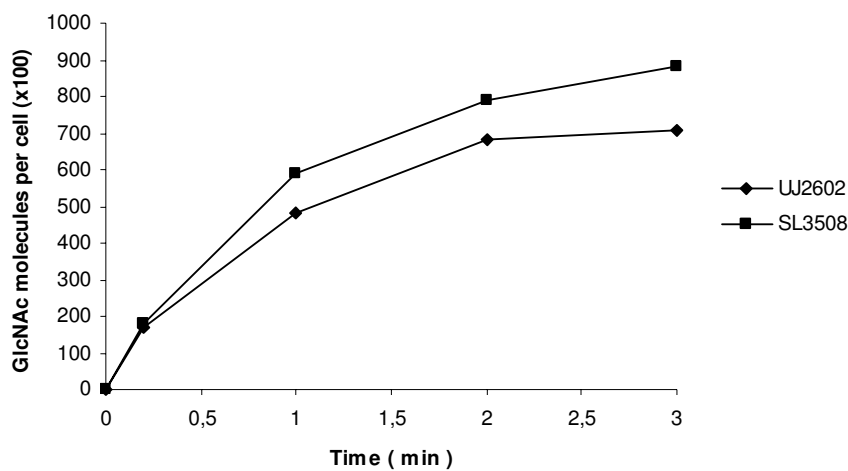


Abb. 4: Aufnahme von ^{14}C -GlcNAc in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird die Mutante SL3508 mit dem Wildtyp UJ2602 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc.

In Abbildung 4 ist die Transportrate von ^{14}C -GlcNAc des Wildtyps UJ2602 und der TonB3-Mutante SL3508 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc dargestellt. Verglichen mit dem radioaktiven Maltosetransport wurde das radioaktive N-Actetyl- β -D-Glucosamin sowohl vom Wildtyp UJ2602 als auch von der SL3508-Mutante langsamer, aber dennoch aktiv aufgenommen. Auch hier transportierte die Mutante SL3508 mit einer dem Wildtyp UJ2602 vergleichbaren Transportrate. Demnach scheint bei der GlcNAc-Aufnahme, wie auch bei der Maltoseaufnahme, ein TonB-Protein keine Rolle zu spielen bzw. CC3508 besitzt keine TonB-Funktion oder wird von einem anderen Protein, möglicherweise CC2327, komplementiert.

3.1.5 Herstellung der Doppelmutante *tonB2::Ω tonB3::Gm^R*- Mutante SL8

Um auszuschließen, dass bei einem Fehlen des Gens *cc2327* (HB2004) die TonB-Funktion durch das Protein des Gens *cc3508* und umgekehrt übernommen werden kann, wurde eine chromosomale Doppelmutante SL8 ($\Delta cc2327$ und $\Delta cc3508$) wie in 2.2.2.7.5 beschrieben erstellt. Hierfür wurde das chromosomal codierte Gen *cc3508* in HB2004 durch eine Gentamycin-Resistenz ersetzt. Um zu überprüfen, ob das Fehlen beider möglicher TonB-Proteine einen Effekt bei der Maltose- oder der GlcNAc-Aufnahme aufweist, wurden Transportmessungen mit ^{14}C -Maltose bzw. mit ^{14}C -GlcNAc durchgeführt.

3.1.5.1 Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose bzw. ^{14}C -markiertem GlcNAc in SL8

Für die beschriebenen Messungen wurden sowohl der Wildtyp UJ2602 als auch die Mutante SL3508 sowie die Doppelmutante SL8 in 10 ml M2-Medium mit jeweils 0,3 % Maltose angeimpft. Nach 1 bis 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, einmal in M2-Medium gewaschen und auf eine OD_{578} von 0,5 - 0,6 eingestellt. Für die Messung der Aufnahmegeschwindigkeit wurde ^{14}C -markierte Maltose verwendet, wobei wie unter 2.2.2.9 sowie 3.1.4.1 beschrieben verfahren wurde.

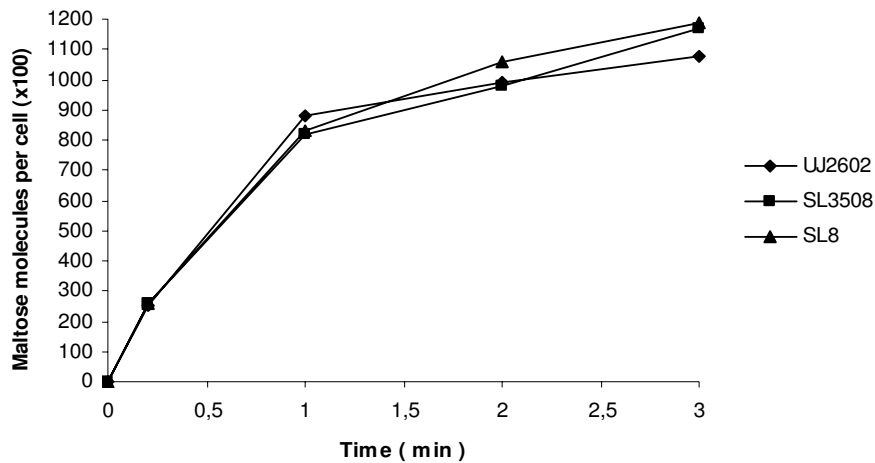


Abb. 5: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL3508 und der Doppelmutante SL 8 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

Abbildung 5 zeigt deutlich, dass das Fehlen beider vermuteter *tonB*-Gene (*cc2327* und *cc3508*) keinen Effekt auf die Maltoseaufnahme hatte. Die Doppelmutante SL8 war immer noch in der Lage Maltose aktiv zu transportieren. Demnach haben sowohl CC2327 als auch CC3508 keinen Einfluss auf den Maltosetransport. Für die Messungen mit radioaktivem GlcNAc wurden der Wildtyp UJ2602, die Mutante SL3508 sowie die Doppelmutante SL8 in 10 ml M2-Medium mit je 0,4 % GlcNAc angeimpft. Im Anschluss daran wurde wie in Kapitel 2.2.2.9 und 3.1.4.1 beschrieben weiter verfahren.

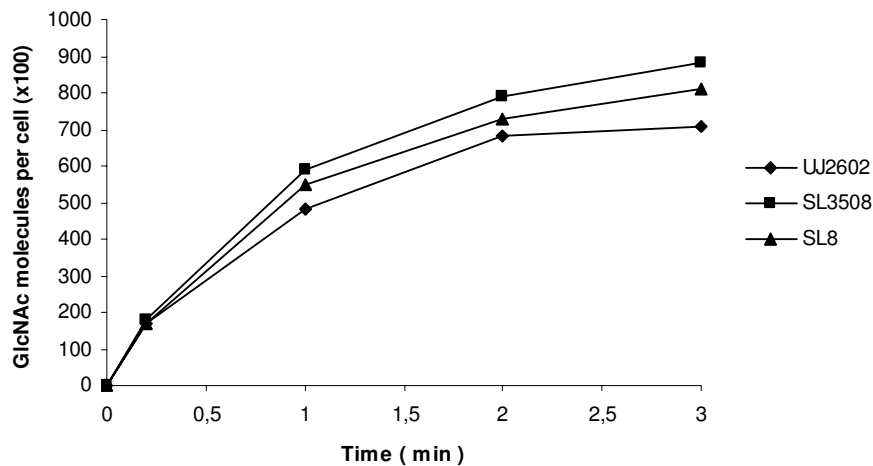


Abb. 6: Aufnahme von ^{14}C -GlcNAc in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL3508 und der Doppelmutante SL 8 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc.

Abbildung 6 verdeutlicht, dass bei einem Fehlen beider mutmaßlicher TonB-Gene (*cc2327* und *cc3508*) der ^{14}C -markierte GlcNAc-Transport mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit wie im Falle des Wildtyps abläuft. Sowohl SL3508 als auch die Doppelmutante SL8 konnten das radioaktive GlcNAc schneller transportieren als der Wildtyp UJ2602.

Hieraus ergab sich die Frage, ob Maltose und GlcNAc ohne aktiven Transport TonB-unabhängig in die Zelle gelangen, oder ob noch ein weiteres Gen existiert, welches für ein TonB- bzw. TonB-ähnliches Protein codiert.

3.2 Ist ein TonB-Protein an der Maltodextrinaufnahme beteiligt?

Im Fall von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das TonB-Protein an die TonB-Box äußerer Membranrezeptoren binden kann (Pawelek *et al.*, 2006; Shultis *et al.*, 2006). Für diese Bindung ist unter anderem eine bestimmte Sequenz bzw. die daraus resultierende Struktur der TonB-Box der Rezeptoren verantwortlich. Veränderungen dieser Sequenz führten sowohl bei dem TonB-abhängigen

Ferrichrom-, als auch bei dem Vitamin B₁₂-Transport zu einem Verlust der Transportfähigkeit (Schöffler und Braun, 1998; Heller *et al.*, 1988).

In der Annahme, dass auch bei *Caulobacter crescentus* ein direkter Kontakt zwischen dem TonB-Protein und der TonB-Box der äußeren Membranrezeptoren stattfindet, wurde eine Punktmutation in der vermuteten TonB-Box des äußeren Membranrezeptors MalA, EEVVIT, mittels spezifischer Punktmutagenese (vgl. 2.2.2.8) durchgeführt. Sollte die eingeführte Punktmutation (V15P) in der TonB-Box von MalA zu einem verminderten radioaktiven Maltosetransport führen, wäre dies neben der ExbB/D-Abhängigkeit ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein eines TonB-Proteins in *C. crescentus*.

3.2.1 Punktmutagenese in der TonB-Box von MalA

Die chromosomale *malA*-Deletionsmutante HB2003 zeigte im radioaktiven Maltosetransport nur noch 1 % der Wildtyp-Transportrate. Nach einer Komplementation der HB2003 Mutante mit einem Plasmid (pMR2287), welches das Wildtyp *malA*-Gen exprimiert, wurde eine dem Wildtyp vergleichbare radioaktive Transportrate erreicht (Neugebauer *et al.*, 2005). Zur Überprüfung, ob ein TonB-Protein an der MalA-abhängigen Aufnahme von Maltodextrinen beteiligt ist, wurde die Aminosäure Valin an Position 15 innerhalb der vorhergesagten TonB-Box von MalA, EEVVIT, durch die Aminosäure Prolin (V15P) ersetzt (2.2.2.8). Das veränderte *malA*-Gen wurde mittels Konjugation (2.2.1.2) über das Plasmid pBB2287 in die *malA*-Deletionsmutante HB2003 eingeführt. Die resultierende Mutante wurde folgend als HB2003pBB2287 bezeichnet.

3.2.1.1 Transportmessungen mit ¹⁴C-markierter Maltose in HB2003pBB2287

Um zu kontrollieren, ob der AS-Austausch in der TonB-Box von MalA einen Effekt auf die TonB-Bindung und somit auf den Maltosetransport hat, wurden

mit der TonB-Box Mutante HB2003pBB2287, dem Wildtyp JS1003 sowie der komplementierten Mutante HB2003pBB*malA* (Wildtyp-*malA* auf dem Mediumcopy Vektor pBBR1-MCS2) radioaktive Transportmessungen wie unter 2.2.2.9 und 3.1.4.1 beschrieben, durchgeführt.

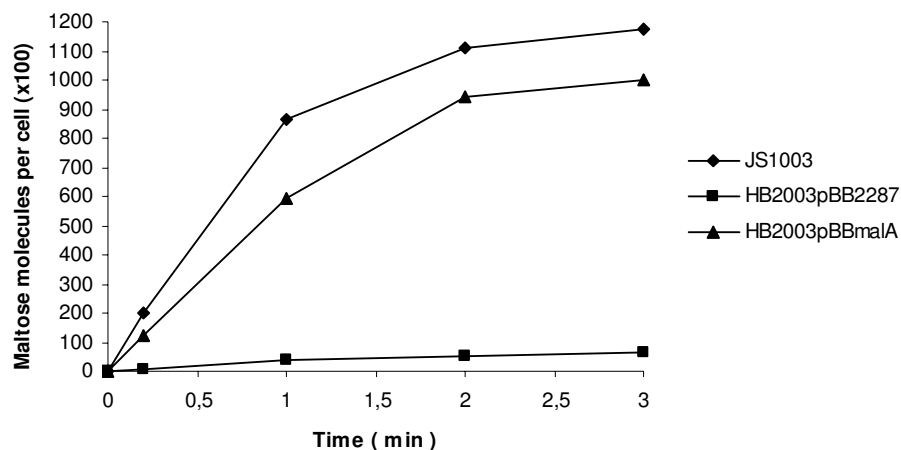


Abb. 7: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp JS1003 mit der TonB-Box Mutante HB2003pBB2287 und der komplementierten Mutante HB2003pBB*malA* nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

Wie in Abbildung 7 gezeigt transportierte der Wildtyp JS1003 die radioaktive Maltose mit einer für den aktiven Transport typischen Rate, während die TonB-Box Mutante HB2003pBB2287 keinen Transport aufwies. Die mit dem Wildtyp *malA*-Gen komplementierte Mutante HB2003pBB*malA* transportierte ^{14}C -markierte Maltose zwar schwächer als der Wildtyp JS1003, jedoch mit einer vergleichbaren Transportrate. Ausschließlich das Wildtyp *malA*-Gen konnte die *malA*-Deletionsmutante HB2003 komplementieren. Eine veränderte Aminosäure innerhalb des *malA*-Gens reichte aus, um den Maltosetransport zu unterbinden. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass für den Maltosetransport ein TonB-Protein erforderlich ist. Zum anderen wurde gezeigt, dass der äußere Membranrezeptor MalA eine an der TonB-Bindung beteiligte Region, die TonB-Box, besitzt. Indem die Aminosäure Valin durch Prolin ersetzt wurde, konnte das TonB-Protein von *C. crescentus* nicht mehr an die TonB-Box

von MalA binden. Dadurch stand keine Energie für die Freilassung der Maltose bzw. für Konformationsänderungen innerhalb des äußeren Membranrezeptors MalA zur Verfügung. Aufgrund der bei HB2003pBB2287 nicht vorhandenen Aufnahmefähigkeit radioaktiver Maltose wurde die Annahme gestützt, dass es sich bei der MalA vermittelten Maltodextrinaufnahme um einen TonB-abhängigen Transport handelt. Daher wurde die Datenbank abermals nach einem zweiten, an der Maltoseaufnahme beteiligten TonB-Protein durchsucht.

3.3 Datenbankinformation über *cc2334a*

Seit 2008 ist in der Datenbank von NCBI die vollständige Genomsequenz von *Caulobacter sp.* K31 zu finden, welche durch das DOE Joint Genome Institute in Kalifornien bearbeitet wurde. Für *Caulobacter sp.* K31 werden bislang über 100 TonB-abhängige Membranrezeptoren bzw. Vorläuferproteine, 5 Proteine aus der TonB-Familie (Caul_3575, Caul_3579, Caul_0269, Caul_2101 und Caul_4280), 1 TonB-ähnliches Protein (Caul_2107) sowie 5 ExbD- und 4 ExbB-Proteine (Caul_2106, -3580, -4429, -0197, -0189 so wie Caul_2105, -3581, -4430, -0867) vorhergesagt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=NC_010338). Wird die Nucleotidsequenz von *Caulobacter crescentus cc2327 (tonB2)* bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) geblastet, so erhält man keinen Treffer in dem Genom von *Caulobacter sp.* K31. Wird hingegen die Proteinsequenz von *C. crescentus CC2327* gegen das Genom von *Caulobacter sp.* K31 (Cs) geblastet, führt dies zu folgenden Treffern:

- Caul_3575, bezeichnet als TonB-Familienprotein
- Caul_3579, bezeichnet als TonB-Familienprotein
- Caul_0269, bezeichnet als TonB-Familienprotein
- Caul_4280, bezeichnet als TonB-Familienprotein

Direkt neben Caul_3579 liegen stromaufwärts die Gene für die Proteine ExbD und ExbB (Caul_3580 und Caul_3581). In *Caulobacter sp.* K31 sind nur in diesem Fall die Gene für den Energietransduktionskomplex *tonB-exbB/D* hintereinander angeordnet (*cs3579-cs3581/cs3580*). Ein Vergleich von

Caul_3580 und Caul_3581 mit den Proteinen ExbD (CC2335) und ExbB (CC2336) aus *Caulobacter crescentus* ergab mit 82 % eine hohe Übereinstimmung in der homologen Region für Caul_3580 und CC2335 so wie eine Übereinstimmung von 92 % in der homologen Region für Caul_3581 und CC2336. Bei einem Blast von Caul_3579 gegen das Genom von *C. crescentus* wurde bei NCBI als Treffer das Gen *cc2334* - bezeichnet als hypothetisches Protein - angegeben. Dieses besteht aus 294 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 34883 Da. In unmittelbarer Nachbarschaft liegen die Gene *cc2335* sowie *cc2336*, welche für die Proteine ExbD und ExbB in *C. crescentus* codieren. Jedoch sind die *exbB/D*-Gene in umgekehrter Leserichtung als das Gen *cc2334* angeordnet. Eine Untersuchung auf offene Leserahmen in dieser Region zeigte ein ORF in entgegengesetzter Leserichtung zu CC2334. Dieser ORF ergab ein Leseraster für ein Gen, dessen Aminosäuresequenz eine große Übereinstimmung (84 %) mit der AS-Sequenz des TonB-Gens *cs3579* aus *Caulobacter sp.* K31 besitzt. Das Protein für diesen Leserahmen wird im Folgenden als CC2334a bzw. TonB1 bezeichnet und besteht aus 243 AS.

Das in der Datenbank beschriebene Gen *cc2334* ist um 51 AS größer als *tonB1* und in derselben Orientierung der Gene *cc2330-cc2333* angeordnet, welche in Anhang 3 gelistet sind. Zu klären ist, ob das Gen *cc2334* in einem anderen Operon angeordnet ist und ebenfalls transkribiert wird. Hierfür könnten Promotoranalysen einen ersten Anhaltspunkt liefern.

Cc2334a bezeichnet das TonB1-Protein (CC2334a) aus *C. crescentus*. Cs3579 bezeichnet das mutmaßliche TonB-Protein aus *Caulobacter sp. K31* (Caul_3579). Fettgedruckt sind charakteristische Merkmale des *E. coli* TonB-Proteins, die auch hier zu finden sind.

Wie dem Alignment der Proteine CCTonB1 und CS3579 in Abbildung 8 zu entnehmen ist, sind die Proteine nahezu identisch (84 % Identität). Diverse Merkmale des bekannten *E. coli* TonB-Proteins sind in beiden Proteinen zu finden. So besitzen beide das bei TonB-Proteinen hochkonservierte und an der Rezeptorbindung beteiligte YP-Motif. Auch die prolinreiche periplasmatische Domäne, die bei dem charakteristischen *E. coli* TonB-Protein zu finden ist, ist in beiden Proteinen vorhanden. Der hydrophobe Transmembranbereich mit der konservierten Aminosäure Histidin ist ebenfalls in beiden Proteinen zu finden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen CC2334a und CS3579, welches in der Datenbank der TonB-Familie zugeordnet wird, so wie der direkten Nachbarschaft und der selben Leserichtung der *exbD*- und *exbB*-Gene bei *C. crescentus*, konnte davon ausgegangen werden, dass das Gen *cc2334a* für ein TonB-Protein codiert, welches zusammen mit den ExbD- und ExbB-Proteinen den Energietransduktionskomplex in der Cytoplasmamembran von *C. crescentus* bildet. In Anhang 4 ist die Genanordnung von *cc2334a* von *C. crescentus* und *cs3579* von *Caulobacter* sp. K31 dargestellt. Auch in

Caulobacter sp. K31 liegen die Gene für den Energietransduktionskomplex in derselben Leserichtung und sind direkt hintereinander angeordnet.

3.3.1 Herstellung der *tonB1::Ω*-Mutante SL2334a

Wie in 2.2.2.7.6 beschrieben wurde das Gen *cc2334a* in UJ2602 durch eine Spc/Str-Resistenzkassette ersetzt. Im Anschluss wurde mittels radioaktiven Transportmessungen ermittelt, ob das Protein CC2334a tatsächlich eine TonB-Funktion besitzt.

3.3.1.1 Transportmessungen mit ¹⁴C-markierter Maltose und ¹⁴C-markiertem GlcNAc

Sowohl der Wildtyp UJ2602, die Mutante SL2334a als auch die komplementierte SL2334apBB*tonB1*-Mutante, bei welcher das Wildtypgen *cc2334a* auf einem Plasmid (pBBR1MCS2) liegt, wurden in M2-Medium mit 0,3 % Maltose angezogen. Nach 1 bis 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, einmal in M2-Medium gewaschen und auf eine OD₅₇₈ von 0,5 - 0,6 eingestellt. Die Messung wurde wie in Kapitel 2.2.2.9 und 3.1.4.1 beschrieben durchgeführt.

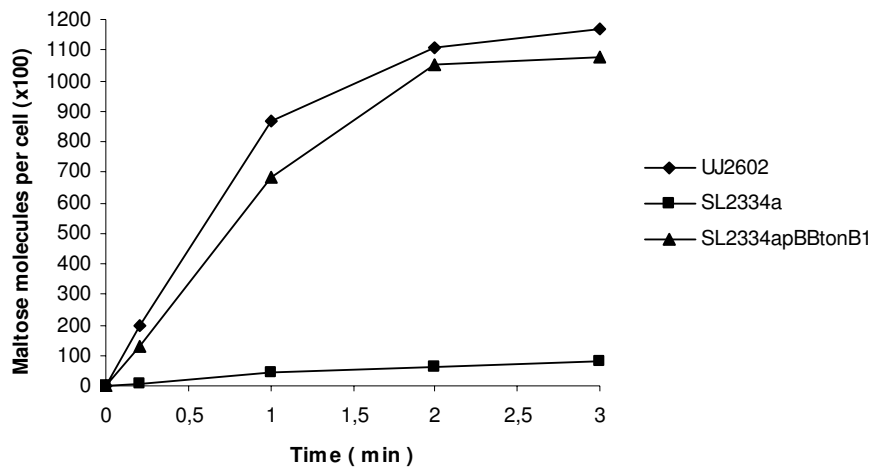


Abb. 9: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2334a und der komplementierten Mutante SL2334apBBtonB1 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

Wie in Abbildung 9 veranschaulicht, transportierte der Wildtyp UJ2602 sehr gut. Hingegen ist deutlich zu erkennen, dass der radioaktive Maltosetransport bei einem Fehlen des Gens *cc2334a* kaum noch zu messen war. Wurde die Mutante SL2334a hingegen mit dem Wildtypgen *cc2334a* komplementiert, konnte eine dem Wildtyp UJ2602 vergleichbare Transportrate wieder hergestellt werden (SL2334apBBtonB1). CC2334a stellt somit das für die aktive Maltoseaufnahme von *C. crescentus* verantwortliche TonB Protein dar.

Um zu testen, ob das Fehlen des Gens *cc2334a* auch einen Einfluß auf den Transport von GlcNAc hat, wurden wie in Kapitel 2.2.2.9 und 3.1.4.1 beschrieben radioaktive Transportmessungen mit ^{14}C -markiertem GlcNAc durchgeführt. Angezogen wurden die Zellen einmal unter induzierenden Bedingungen mit 0,4 % GlcNAc und einmal unter nicht induzierenden Bedingungen mit 0,3 % Glucose.

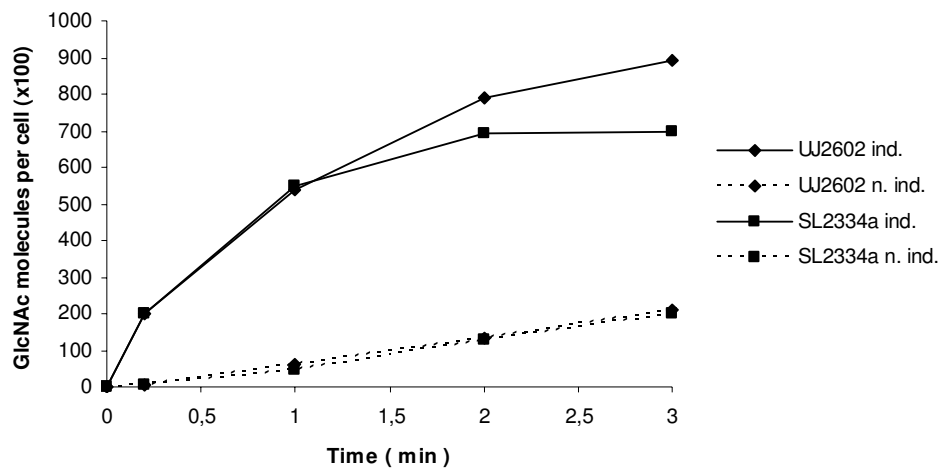


Abb. 10: Aufnahme von ^{14}C -GlcNAc in Abhängigkeit von der Zeit
Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2334a nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose und 0,4 % GlcNAc.

Sowohl beim Wildtyp UJ2602 als auch bei der SL2334a-Mutante war die Induzierbarkeit mit N-Acetyl- β -D-Glucosamin deutlich zu erkennen. SL2334a erreichte unter induzierenden Bedingungen identische Transportwerte wie der Wildtyp. Radioaktives GlcNAc konnte rasch aufgenommen werden. Das Fehlen des Gens *cc2334a* hatte keinen Einfluß auf die Aufnahme von GlcNAc. Auch unter nicht induzierenden Bedingungen verhielt sich die Mutante SL2334a wie der Wildtyp UJ2602. Beide transportierten radioaktives GlcNAc nur noch mit einem Viertel der Transportrate induzierender Zellen.

3.3.1.2 Phänotypische Charakterisierung der *tonB1*-Mutante SL2334a bezüglich der Maltodextrinaufnahme

Die Mutante SL2334a wurde bezüglich ihres Wachstumsverhaltens auf Maltodextrinen als alleinige C-Quelle untersucht. Dazu wurde eine Minimalagarplatte ohne Kohlenstoffquelle mit SL2334a mittels Minimal-Topagar überschichtet und Filterplättchen mit den entsprechenden Maltodextrinen (je 10 μl einer 20 %igen Lösung) aufgelegt (2.2.1.3). Als Kontrolle dienten der Wildtypstamm UJ2602 und die mit *tonB1* komplementierte Mutante

SL2334apBB*tonB1*. Nach Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen.

	MG [Da]	UJ2602 (WT)	SL2334a ($\Delta tonB1$)	SL2334apBB <i>tonB1</i>
Maltose	360,0	3,0	3,0	3,0
Maltotriose	504,0	3,0	2,8	3,0
Maltotetraose	667,0	3,0	1,0	3,0
Maltopentaose	829,0	3,0	-	3,0
Maltohexaose	991,0	3,0	-	3,0

Tab.1: Wachstumstest von UJ2602, SL2334a und SL2334apBB*tonB1* mit Maltodextrinen auf M2-Medium

Auf die entsprechenden Molmassen der Maltodextrine ist hingewiesen. Das Wachstumsverhalten wurde durch Wachstumshöfe um Filterplättchen gemessen, die das jeweilige Maltodextrin enthielten und auf M2-Agarplatten ohne C-Quelle gelegt wurden, welche zuvor mit dem zu testenden Stamm mit Hilfe von M2-Topagar ohne C-Quelle überschichtet worden waren. Die Wachstumszonen um die Filterplättchen entsprechen dem Durchmesser in cm inklusive der Filterplättchen (0,6 cm) und stellen den Mittelwert von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumstests dar. Kein Wachstum ist mit '-' gekennzeichnet.

Die in Tabelle 1 beschriebenen Wachstumshöfe zeigten, dass der Wildtyp alle getesteten Maltodextrine aufnehmen und als Kohlenstoffquelle verwerten konnte. Sowohl bei Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose waren Wachstumshöfe von jeweils 3 cm sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigte die *tonB1*-Mutante SL2334a ein verändertes Wachstumsverhalten. Um das Filterplättchen mit Maltose war ein Wachstumshof von 3 cm zu sehen, wohingegen die Wachstumshöfe um Maltotriose mit 2,8 cm und um Maltotetraose mit 1,0 cm deutlich geringer ausfielen als beim Wildtyp. Mit den größeren Maltodextrinen Maltopentaose und -hexaose konnte bei der Mutante SL2334a kein Wachstum mehr beobachtet werden. Wurde die Mutante SL2334a mit *tonB1* auf pBB*tonB1* komplementiert, so konnte das Wildtypverhalten bezüglich des Wachstums mit Maltodextrinen wiederhergestellt werden.

3.3.2 Sequenzanalyse der TonB-Proteine

Bei *Caulobacter crescentus* wurden bisher 3 mutmaßliche TonB-Proteine beschrieben (CC2327, CC3508 und CC2334a), wobei nur für TonB1 (CC2334a) eine Substratspezifität für Maltose nachgewiesen werden konnte (3.3.1.1). Ein Vergleich aller mutmaßlicher *C. crescentus* TonB-Proteine zeigt eine Übereinstimmung in vielen charakteristischen Merkmalen des gut untersuchten TonB-Proteins aus *E. coli*.

Wie Abbildung 11 zu entnehmen, besitzen sowohl TonB1 als auch TonB2 die konservierte Aminosäure Histidin in der vorhergesagten Transmembranregion. Histidin kommt bei dem klassischen TonB-Protein aus *E. coli* an Position 20 vor. Bei TonB1 und TonB2 liegt sie mehrere Aminosäuren hinter der AS His²⁰ aus *E. coli* (Larson *et al.*, 2007; 2001; Larson und Postle, 2001; Traub *et al.*, 1993). Das konservierte Motif SXXXH²⁰ an dieser Stelle ist in den meisten TonB-Proteinen zu finden. Nur in wenigen TonB-Proteinen konnte diese Sequenz nicht gefunden werden. So besitzt das TonB1-Protein aus *P. aeruginosa* an dieser Stelle kein Serin und das TonB-Protein aus *V. vulnificus* kein Histidin. Bei *P. syringae phaseolicola* fehlen dem TonB3-Protein an genannter Stelle beide Aminosäuren. Auch bei CCTonB3 kommt die AS Histidin in dieser Region nicht vor. Bei TonB1 liegen 7 AS zwischen den charakteristischen AS Ser und His, während bei TonB2 und dem TonB-Protein aus *E. coli* nur 3 AS dazwischen liegen. Alle drei mutmaßlichen CCTonB-Proteine weisen das hochkonservierte YP-Motif in der Nähe von Q¹⁶⁰ auf, einer Region, die an der Kontaktaufnahme mit der TonB-Box der äußeren Membranrezeptoren beteiligt ist. TonB1 und TonB2 weisen beide in der periplasmatischen Domäne eine prolinreiche Region auf, die bei dem TonB3-Protein fehlt, während sie bei TonB1 besonders ausgeprägt ist. TonB3 ist größer (401 AS) als TonB1 (243 AS) und TonB2 (240 AS). Das TonB3-Protein besitzt 5 Transmembrandomänen aus 165 AS verglichen zu TonB1 mit einer TMD bestehend aus 23 AS. Bisher konnte keinem der TonB-Proteine mit mehreren Transmembrandomänen eine Funktion zugeordnet werden. Bakterien, die ein solches TonB-Protein besitzen, haben immer mehrere TonB-Proteine auf ihrem Chromosom codiert (Peacock *et al.*,

2007), wie bspw. auch auf dem Genom von *C. crescentus*. TonB-ähnliche Proteine mit einer vergleichbaren Größe wie bspw. bei *X. campestris* und *B. thetaiotaomicron* weisen mit HEXXH ein Zink-Bindungsmotiv auf (Chu *et al.*, 2007). Dieses Motiv ist auch in TonB3 von *C. crescentus* an Position 170-174 zu finden (kursiv in Abbildung 11). Ob die großen TonB-ähnlichen Proteine eine TonB-Funktion ausüben und ob diese Funktion von der des *E. coli* TonB-Typs abweicht, bleibt zu klären. In der homologen Region besitzt TonB1 eine Übereinstimmung von 54 % zu TonB2 und eine Identität von 52 % zu TonB3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). TonB2 besitzt zu TonB3 eine Identität von 43 % und eine Homologie von 61 % (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_2327).

CcTonB1	-----MADQNTPEHRRYDPLTS-----EGP	20
CcTonB2	-----MALALNPNGFGIPGLDN-----PPP	20
CcTonB3	MSAAVLSGLMGANLALAGGVLVVMAVRGPPVRRRFALPAYLLWLTPPLCALAALAP	56
EcTonB	-----MTLDLPRRFPWPTLLS-----	16
	* *	
CcTonB1	RRKKGFGAFGISLTVVAGLHALLFAYLAKQKFEAVFQEYS-DDATVVVELPPPPPPP	75
CcTonB2	KPAK---VLLIGLGVSGALHIALIGYLAYQKWTQPLPLMSPDTGFIIVETVPLTPKP	73
CcTonB3	APIEATPLAPILITAGKAARAAPPVPLATSTVAQPVLALWALGALVAAAFLVRQA	112
EcTonB	-----VCIHGAVVAGLLYTSVHQVIELPAPAQPISVTMVTPADLEPPQAVQPPP	65
	. : : . . :	
CcTonB1	-----PPPPPPP--PTTNEPPPPPAVVQPRPPVAPPPDVTP-----	109
CcTonB2	-----PPPSPPTEKPPPAAPAKLHIPAPTPLETPPPLFAD-----	109
CcTonB3	RFTRSLGSLRPHPADPRLIGQHVAGPMVLASPPRIVAPADFDTRFQGEARDLV	168
EcTonB	E-----PVVEPEPEPEPIPEPPKEAPVVEIEKPKPKPKPKPKPVKKVQ-----	107
	* * . * * . .	
CcTonB1	-----	109
CcTonB2	-----	109
CcTonB3	LAHERVHLARGDAQINALVVALQCLCWFNPLVHLGAHRLRLDQEMACDEAVLARRP	224
EcTonB	-----	107
CcTonB1	-----PPPLPIP-----PVEKRVEQTAPPVISPTPPVP---	137
CcTonB2	-----PRIIPAG-----PTTTGPVTTLAPAAT-TPPSP---	136
CcTonB3	EARRLYAETLLDTLLAPRVVPFGCHWPAGGAHPLKERLIMLNIPTRSPAKRATGLA	280
EcTonB	-----EQPKRDVK-----PVESRPASPFENTAPARLTSS---	136
	* . . .	
CcTonB1	-----SNPPARASVITRPDWORKPSGEDMARYYPPDRAQRMEVSGRAT	179
CcTonB2	-----PQPPP--KVITRANWQRIPSADEMARYYPPESAQRRLSGQVT	176
CcTonB3	LAALVGLAGAGAVWAAEARPAPVITKPNWIAKPTANDMARFYPAATAAKAEGFAV	336
EcTonB	-----TATAATSKPVTSVASGPRALSRNQPP--YPARAQALRIEGQVK	177
	. . * : . . : : ** *: . * .	
CcTonB1	ISCTVTAKGTLEGCSVSESPADMGGFGDAAIRLSRLFRMKPKTLDGAPVDGGQVTV	235
CcTonB2	LNCMVALLNGTVRDCVATESPADEGGFSAALKISRFFKMKPQTENGDPVDGATVRI	323
CcTonB3	IDCRVTATGQLTACKVLRRESADAYGFGAALQLGTIFQMSPLTIDGKPVNGGQVTI	392
EcTonB	VKFDVTPDGRVDNVQILSAKPANM-FEREVKNAMRRWRYEP---GKPGSGIVVNI	228
	:. *: * : : . . * . . : : . * * * . * :	
CcTonB1	PLVFQVPQ---	243
CcTonB2	PIRFNAGA---	240
CcTonB3	PIRFSVPQT--	401
EcTonB	LFKINGTTEIQ	239
	: : .	

Abb. 11: Sequenzvergleich der Proteine TonB1, TonB2 und TonB3 aus *C. crescentus* und dem TonB-Protein aus *E. coli*.

EcTonB bezeichnet das charakteristische TonB-Protein (P02929) aus *E. coli*. CcTonB1 bezeichnet das mutmaßliche TonB1-Protein (CC2334a) aus *Caulobacter crescentus*, CcTonB2 bezeichnet das mutmaßliche TonB2-Protein (CC2327) aus *Caulobacter crescentus*, CcTonB3 bezeichnet das mutmaßliche

TonB3-Protein (CC3508) aus *Caulobacter crescentus*. Fettgedruckt sind charakteristische Merkmale des *E. coli* TonB-Proteins.

Zum Zweck der besseren Vergleichbarkeit der mutmaßlichen TonB-Proteine wurde das große TonB3-Protein in den folgenden Alignments nicht mehr mit den *C. crescentus* TonB-Proteinen TonB1, TonB2 sowie dem *E. coli* TonB-Protein verglichen. TonB3 ist das Protein mit den geringsten Ähnlichkeiten zu dem gut untersuchten *E. coli* TonB-Protein sowie zu TonB1 und TonB2 aus *C. crescentus*. Da auch in der Literatur bisher keine Substrate oder Funktionen für ein ähnliches Protein beschrieben wurden, wird die Analyse von TonB3 im Folgenden nicht weiter thematisiert.

Um das charakteristische TonB-Protein aus *E. coli* und das substratspezifische CCTonB1-Protein aus *C. crescentus* besser miteinander vergleichen zu können ist das Alignment beider Proteine in Abbildung 12 dargestellt.

```

EcTonB      -MTLDLPRRFPWPPTLLSVCIH-----GAVVAGLLYTS-VHQVIELPAPAQPISVTM 49
CcTonB1     MADQNTPEHRRYDPLTSEGPRRKKGFGAFGISLTVVAGLHALLFAYLAKQKFEAVF 56
           : *.: : . * * : ** . . * .: : * : : . * :...:

EcTonB      VTPADLEPPQAVQPPPEPVVEPEPEPEPIEPPKEAPVVIEKPKPKPKPKPKPKVKK 105
CcTonB1     QEYSDDATVVELPPPPPPPPPPPPPPPPTNEPPPPAVVQPRPPVAPPPDVTPPPP 112
           : * . : *** * * * * * *** ..** : * * * . *

EcTonB      VQEQPKRDKVPVESRPASPFENTAPARLTSSTATAATSKPVTSVASGPRALSRNQF 161
CcTonB1     LPIPP--VEKRVEQTAPPVISPTFPVPSNPPARASVITRPDWARDKPSGEDMAR--- 163
           : * * * * . . . : . * . * . . . : : : * : . . . : *

EcTonB      QYPARAQALRIEGQVKVKFDVTPDGRVDNVQILSAKPANM-FEREVKNAMRRWRYE 216
CcTonB1     YYPDRQRMEVSGRATISCTVTAKGTLEGCSVVSESPADMGFGDAAIRLSRLFRMK 219
           * * *** :...*:...: * . * : : . : * . * : * * . . * : * :

EcTonB      PGKPGSGIVVNILFKINGTTEIQ- 239
CcTonB1     PKTLDGAPVDGGQVTVPLVFQVPQ 243
           * . . . . * . . : . : :

```

Abb. 12: Sequenzvergleich der Proteine TonB1 aus *C. crescentus* und dem TonB-Protein aus *E. coli*.

EcTonB bezeichnet das charakteristische TonB-Protein (P02929) aus *E. coli*. CcTonB1 bezeichnet das mutmaßliche TonB1-Protein (CC2334a) aus *Caulobacter crescentus*. Fettgedruckt sind charakteristische Merkmale des *E. coli* TonB-Proteins.

Trotz der geringen Übereinstimmung von EcTonB und CCTonB1 von nur 23 %, wovon allein 9 % auf die prolinreiche Region in der Mitte der Proteine fallen,

sind viele charakteristische und bei *E. coli* gut untersuchte und beschriebene Merkmale wie bspw. die Aminosäure Histidin in der Transmembranregion, die prolinreiche Sequenz in der Mitte des Proteins und das YP-Motif in beiden Proteinen zu finden. Der dem Cytoplasma zugewandte N-Terminus von CCTonB1 ist etwas länger (24 AS) als der N-Terminus des *E. coli* TonBs (11 AS). Da vor allem das mutmaßliche TonB2-Protein von *Caulobacter crescentus* eine große Übereinstimmung zu dem *E. coli* TonB-Protein und dem Maltosespezifischen TonB1-Protein von *C. crescentus* aufweist, kann es sich bei diesem am wahrscheinlichsten um ein weiteres TonB-Protein mit einer bisher unbekannten Substratspezifität handeln. Nachfolgend ist in Abbildung 13 das Alignment des TonB1-Proteins und des in der Datenbank vorhergesagten TonB2-Proteins von *C. crescentus* dargestellt, wobei eine Übereinstimmung von 41 % (54 % in der homologen Region) zwischen beiden Proteinen besteht.

```
CcTonB1  MADQNTPEHRRYDPLTSEGPRRKKGFAGFISLTVVAGLHALLFAYLAKQKFEAVF 56
CcTonB2  MALALNPNGFGIPGLDNPPPKPAK---VLLIGLGVSGALHIALIGYLAYQKWTQPL 53
      **  .*:          * . *: *  .: *. * * ..**  *:..*** **:  :

CcTonB1  QEYS-DDATVVELPPPPPPPPPPPPPP--PPTNEPPPPPAVVQPRPPVAPPPDVT 109
CcTonB2  PLMSPDTGFIIVETVPLTPKPPPPSPPTTEKPPPAAPKLHIAPPTPLETPPPLFAD 109
      * * . :** * . * ****.***. **. .:*  : * * :*** .:

CcTonB1  PPPLPIPPVEKRVEQTAPPVISPTPPVPSNPPPARASVITRPDWARDKPSGEDMARY 165
CcTonB2  PRIIPAGPTTTGPTTLAPAAT-TPPSPPQPPP--KVITRANWQRIPSADEMARY 162
      * :* * . . * .: : *** *.**:.. *****: * * *:***:

CcTonB1  PDRAQRMEVSGRATISCTVTAKGTLEGCSVVSESPADMFGDAAIRLSRLFRMKPK 221
CcTonB2  PESAQRRLSGQVTLNCMVALNGTVRDCVVATESPADEGFSAALKISRFFKMKPQ 218
      *: *** :*:..*:.* *: :*:..* *:***** ***.***:***:***:

CcTonB1  TLDGAPVDGGQVTVPLVFQVPQ 243
CcTonB2  TENGDPVDGATVRIPRIFNAGA 240
      * : * ***** * :*: *:
```

Abb. 13: Sequenzvergleich der Proteine TonB1 und TonB2-Proteine aus *C. crescentus*.

CcTonB1 bezeichnet das charakteristische TonB1-Protein (CC2334a) aus *Caulobacter crescentus* und CcTonB2 das mutmaßliche TonB2-Protein (CC2327) aus *C. crescentus*. Fettgedruckt sind charakteristische Merkmale des *E. coli* TonB-Proteins. Kursiv sind auffällige Gemeinsamkeiten von TonB1 und TonB2 aus *C. crescentus*.

Eine hohe Übereinstimmung zeigen die mutmaßlichen TonB-Proteine TonB1 und TonB2 aus *C. crescentus* in dem AS-Motif „MARY“ direkt vor dem konservierten YP-Motif. In CCTonB3 ist nur ein Teil des Motifs „MAR“ zu finden, während es in *E. coli* ganz fehlt (Abb.11). Ob und welche Funktion diese Aminosäuren in *C. crescentus* ausüben ist unklar.

3.3.3 Herstellung der Doppelmutante *tonB1::Gm^R tonB2::Ω*- Mutante SL9

Mutationen in *tonB1* und *tonB2* reduzieren den ¹⁴C-GlcNAc Transport nicht. Um auszuschließen, dass sich die beiden *tonB*-Gene gegenseitig funktionell ersetzen, wurde die chromosomale Doppelmutante SL9 (*cc2334a* und *cc2327*) wie in 2.2.2.7.7 beschrieben erstellt. Dabei wurde das chromosomal codierte Gen *cc2334a* in HB2004 durch eine Gentamycin-Resistenz ersetzt. Mit der Doppelmutante SL9 wurden Transportmessungen mit ¹⁴C-GlcNAc durchgeführt.

3.3.3.1 Transportmessungen mit radioaktivem ¹⁴C-GlcNAc

Für die Messungen mit radioaktiven GlcNAc wurden der Wildtyp UJ2602 und die Mutante SL9 in 10 ml M2-Medium mit je 0,4 % GlcNAc angeimpft und es wurde wie unter 2.2.2.9 und 3.1.4.1 beschrieben weiter verfahren.

Abbildung 14 zeigt die Messwerte des Wildtyps UJ2602 und der Mutante SL9 nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc.

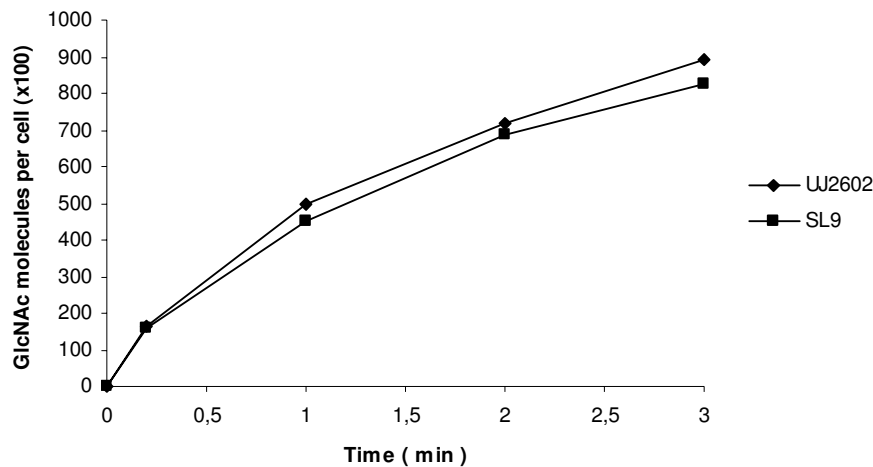


Abb. 14: Aufnahme von ^{14}C -GlcNAc in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL9 nach einer Anzucht in M2-Minimalmedium mit 0,3 % Maltose und 0,4 % GlcNAc.

Wie deutlich zu erkennen ist, verhielt sich die Mutante SL9 wie der Wildtyp UJ2602. Beide Stämme konnten das angebotene radioaktive GlcNAc zeitnah aufnehmen und in das Innere der Zelle transportieren. Das Fehlen der beiden mutmaßlichen TonB-Proteine TonB1 und TonB2 hat demnach keinen Einfluß auf die Aufnahme von GlcNAc.

3.4 Charakterisierung des Genclusters um MalA

Bei *E. coli* werden Maltose und größere Maltodextrine durch erleichterte Diffusion über das LamB-Protein in der äußeren Membran aufgenommen. Im Periplasma werden vermutlich größere Maltodextrine durch das MalS-Protein in kleinere Stücke gespalten und schließlich über einen ABC-Transporter in der Cytoplasmamembran in das Innere der Zelle geschleust. Um die Maltose und Maltodextrine weiter zu spalten befinden sich im Cytoplasma 2 α -Amylasen (Boos *et al.*, 1998). 2005 wurde bei *Caulobacter crescentus* ein Protein in der äußeren Membran identifiziert, welches für den Transport von Maltose und höheren Maltodextrinen verantwortlich ist (Neugebauer *et al.*, 2005). In unmittelbarer Nachbarschaft des äußeren Membranrezeptors MalA (CC2287) liegen 5 Gene, die für Proteine des Zuckerstoffwechsels codieren

(<http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR2/GenePage.spl?locus=CC2287>). Dabei handelt es sich um 2 α -Amylasen, eine Glucoamylase, ein Transportprotein und ein Regulatorprotein der LacI-Familie. In Anhang 5 ist die Anordnung der benachbarten Gene von *malA* (*cc2287*) in *C. crescentus* schematisch dargestellt. Das MalA-Protein wird in der Datenbank als TonB-abhängiger Rezeptor bezeichnet und stellt einen der 67 äußeren Membranrezeptoren von *C. crescentus* dar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/COG/palox?COG1629>). Homologievergleiche und Computerberechnungen, die einen Aufbau aus 22 antiparallelen β -Faltblättern vorhersagen, stützten neben dem Vorhandensein einer N-terminalen TonB-Box die Annahme, dass es sich um einen TonB-abhängigen Rezeptor handelt (Neugebauer, 2004). CC2287 besteht aus 921 Aminosäuren, weist ein Molekulargewicht von 99501 Da auf, besitzt einen theoretisch berechneten pI-Wert von 5,78 und enthält eine mutmaßliche Signalsequenz (<http://expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q9A608> und <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/swisspfamget.pl?name=Q9A608>). Die größte Homologie und Identität (56,7 % bzw. 40,1 %) hat CC2287 zu CC1754, einem weiteren mutmaßlichen TonB-Rezeptor aus *C. crescentus*, der in der Datenbank nicht näher charakterisiert ist. Weitere Homologiestudien zeigten eine hohe Übereinstimmung zu Proteinen der Gattung *Xanthomonas* (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_2287). Es konnte bewiesen werden, dass das Protein MalA durch Maltose und Maltodextrine induzierbar ist und für den Transport größerer Maltodextrine benötigt wird (Neugebauer *et al.*, 2005). Ein hypothetisches Maltoseaufnahmesystem in der äußeren Membran von *C. crescentus* könnte demnach aus dem MalA-Protein bestehen, über das Maltose und größere Maltodextrine TonB-abhängig in das Periplasma aufgenommen werden. Laut Datenbank codiert das Gen *cc2282* für eine Glucoamylase und besitzt ebenfalls eine mutmaßliche Signalsequenz (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/swisspfamget.pl?name=Q9A613>). CC2282 besteht aus 771 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 82469 Da und einem theoretisch berechneten pI-Wert von 5,97 (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_2282). Da im Medium von *C. crescentus* keinerlei

Amylaseaktivität nachzuweisen ist wird angenommen, dass das Protein der Glucoamylase bis in das Periplasma sekretiert wird, um dort analog dem *E. coli* MalS-Protein größere Maltodextrine in kleinere Stücke zu spalten.

Das Transporterprotein CC2283 zeigt die größte Ähnlichkeit zu Proteinen aus der Gattung *Xanthomonas* (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_2283), wobei die Homologie zu H⁺/Zucker-Cotransportern, ähnlich dem LacY-System aus *E. coli*, sehr groß ist (Busch und Saier, 2002). So besitzt CC2283 eine Homologie von 73,2 % (61,7 % Identität) zu XACN5, einem in der Datenbank als Kationen-Symporter beschriebenen Protein (<http://www.expasy.org/uniprot/Q3BRT4>). Anstelle des ABC-Transporters bei *E. coli* könnte demnach bei *C. crescentus* ein H⁺/Zucker-Cotransporter die Maltose und Maltosebausteine aus dem Periplasma über die CM bis in das Innere der Zelle transportieren. Das Protein CC2283 besteht aus 541 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 58078 Da sowie einen theoretisch berechneten pI-Wert von 9,7 (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_2283).

Da das Regulatorprotein CC2284 zu der *lacI*-Familie gehört wird davon ausgegangen, dass der *mal*-Promotor von *C. crescentus* im Gegensatz zu dem positiv kontrollierten Operon von *E. coli* unter negativer Kontrolle steht und das Regulatorprotein in Abwesenheit von Maltose als Repressor den *mal*-Promotor blockiert. CC2284 besteht aus 362 Aminosäuren, weist ein Molekulargewicht von 39062 Da auf und besitzt einen theoretisch berechneten pI-Wert von 7,6. Homologiestudien zeigen auch hier eine starke Übereinstimmung mit Proteinen der Gattung *Xanthomonas* (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=CC_2284). So besitzt das in der Datenbank ebenfalls als Regulatorprotein vorhergesagte Protein XC_0808 von *Xanthomonas campestris* eine Homologie von 57,4 % (40,8 % Identität) zu CC2284.

Um die Funktion der beschriebenen Gene und somit die Maltoseaufnahme bei *C. crescentus* zu erforschen, wurde von jedem der beschriebenen Gene jeweils eine chromosomale Knockout-Mutante wie in 2.2.2.7 beschrieben hergestellt und anschließend der ¹⁴C-Maltosetransport gemessen (2.2.2.9).

3.4.1 Herstellung der Glucoamylase:: Ω -Mutante SL2282

Wie unter 2.2.2.7.2 beschrieben wurde das Gen der Glucoamylase (*cc2282*) als *malS* bezeichnet und durch eine Spc/Str-Resistenzkassette ersetzt. Sollte die Glucoamylase tatsächlich für das Spalten größerer Maltodextrine im Periplasma verantwortlich sein, müsste ihr Fehlen durch eine verschlechterte Aufnahme größerer ^{14}C -Maltodextrine zu messen sein.

3.4.1.1 Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose

Der Wildtyp UJ2602, die *cc2282*-Mutante SL2282 so wie die komplementierte Mutante SL2282pBB*malS* wurden in M2-Medium mit 0,3 % Maltose angezogen. Bei der komplementierten Mutante befindet sich das Gen *cc2282* auf dem Mediumcopy Vektor pBBRI-MCS2, welcher mittels Konjugation in die Mutante SL2282 geschleust wurde. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Kapitel 3.1.4.1 und 2.2.2.9 beschrieben.

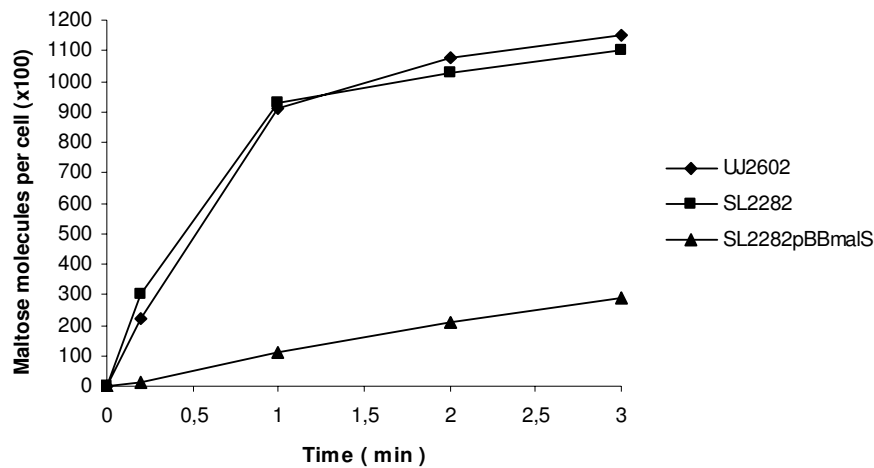


Abb. 15: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2282 sowie der komplementierten SL2282pBB*malS* Mutante nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

Wie Abbildung 15 zu entnehmen ist, transportierte SL2282 ^{14}C -Maltose mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Transportrate. Das Fehlen der Glucoamylase im Periplasma scheint demnach keine Auswirkungen auf den ^{14}C -Maltosetransport zu haben. Da Maltose ein sehr kleines Molekül ist, muss es vermutlich vor einem Transport über die Cytoplasmamembran nicht gespalten werden. Ein verschlechterter ^{14}C -Maltosetransport war dagegen bei der komplementierten SL2282pBB*malS* Mutante zu beobachten. Die Transportrate der komplementierten Mutante SL2282pBB*malS* erreichte lediglich 1/5 der Wildtyptransportrate UJ2602. Da das Gen der Glucoamylase *cc2282* auf einem Mediumcopy Plasmid codiert war, wirkte sich eventuell zu viel Glucoamylase toxisch auf die Zellen aus, so dass nur noch eine Diffusion im ^{14}C -Maltosetransport zu beobachten war. Möglich ist auch, dass über die hohe Expressionsrate des Mediumcopy Vektors zu viel Glucoamylase produziert wurde, so dass diese den äußeren Membranrezeptor MalA durch eine Anbindung blockierte und radioaktive Maltose nur noch über Diffusion aufgenommen werden konnte. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde derselbe Ansatz nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc durchgeführt, wobei wie unter 3.1.4.1 und 2.2.2.9 verfahren wurde. In diesem

Substrat sollte der Überschuß des MaIS-Proteins keinen Einfluß auf die Transportrate haben.

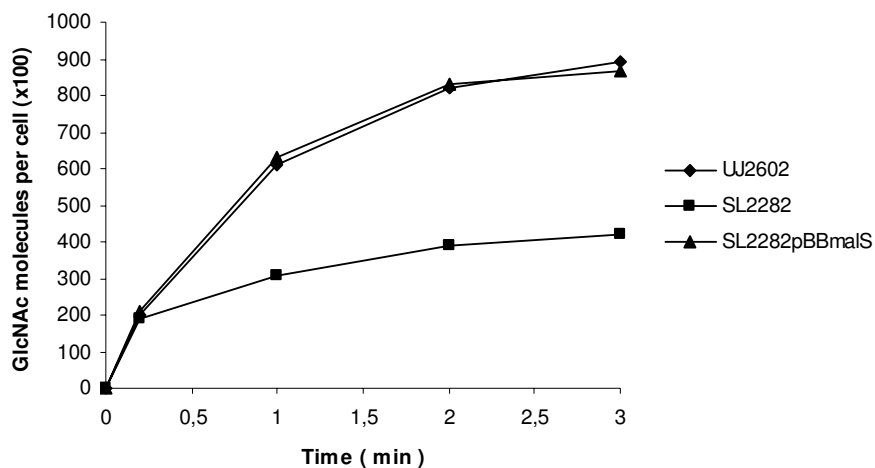


Abb. 16: Aufnahme von ^{14}C -GlcNAc in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2282 sowie der komplementierten Mutante SL2282pBB*maIS* nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc.

Die komplementierte SL2282 Mutante SL2282pBB*maIS* konnte wie in Abbildung 16 dargestellt ^{14}C -GlcNAc mit derselben Transportrate wie der Wildtyp UJ2602 aufnehmen, was für eine Bindung überschüssiger Glucoamylase an MaIA sprach. Da ^{14}C -GlcNAc nicht über MaIA aufgenommen wird, ist die Transportrate nicht geschwächt. Nicht zu erklären war allerdings der verschlechterte ^{14}C -GlcNAc-Transport der Mutante SL2282. Generell war der ^{14}C -GlcNAc-Transport sowohl beim Wildtyp UJ2602, der Mutante SL2282 sowie der komplementierten Mutante SL2282pBB*maIS* niedriger als der ^{14}C -Maltosetransport in Abbildung 15. Um die Funktion der Glucoamylase bei größeren Maltodextrinen testen zu können, wurde derselbe Ansatz abermals in M2-Medium mit 0,3 % Maltose angezogen, die Zellen wie beschrieben behandelt und schließlich zu 900 μl Zellen 9 μl ^{14}C -Maltotetraose (50 μM im assay) gegeben und im Anschluss wie beschrieben weiter verfahren.

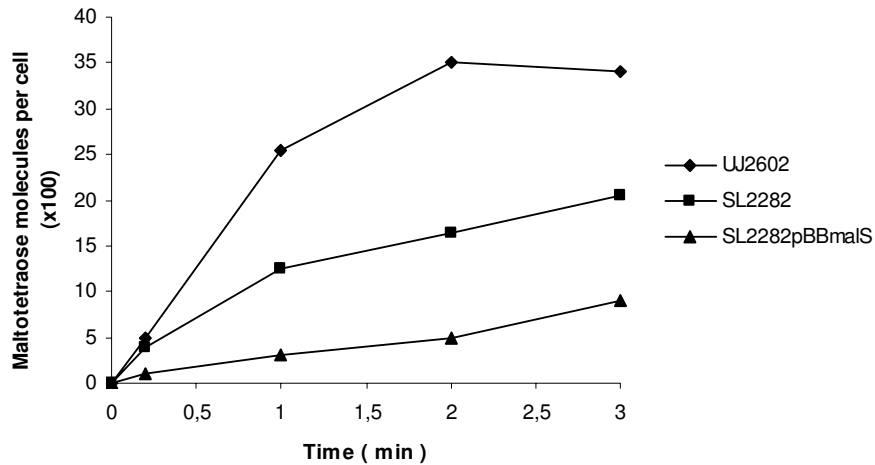


Abb. 17: Aufnahme von ^{14}C -Maltotetraose in Abhängigkeit von der Zeit
Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2282 sowie der komplementierten SL2282pBB*malS* Mutante nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

In Abbildung 17 sind die Messwerte des Wildtyps UJ2602, der Mutante SL2282 und der komplementierten Mutante SL2282pBB*malS* nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose dargestellt. Wie bei dem ^{14}C -Maltosetransport war auch in diesem Fall die Transportrate der komplementierten Mutante SL2282pBB*malS* verstärkt reduziert. Maltotetraose wird vor allem über den äußeren Membranrezeptor MalA aufgenommen (Neugebauer *et al.*, 2005), da es für eine reine Diffusion sehr groß ist. Die Aufnahme von ^{14}C -Maltotetraose war aus diesem Grund bei SL2282pBB*malS* noch geringer als die ^{14}C -Maltoseaufnahme. Der äußere Membranrezeptor MalA wurde durch die überschüssige Glucoamylase auf der periplasmatischen Seite blockiert und stand nicht mehr für den Transport von ^{14}C -Maltotetraose zur Verfügung. Im Gegensatz zum ^{14}C -Maltosetransport war die SL2282 Mutante bzgl. des ^{14}C -Maltotetraosetransports deutlich schlechter als der Wildtyp UJ2602 und erreichte kaum die Hälfte der Transportrate des Wildtyps. Für ein größeres Molekül wie bspw. Maltotetraose wird demnach für den Weitertransport ins Cytoplasma ein spaltendes Enzym wie die Glucoamylase im Periplasma benötigt.

3.4.1.2 Phänotypische Charakterisierung der *malS*-Mutante SL2282 bezüglich der Maltodextrinaufnahme

Die Mutante SL2282 wurde hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens auf Maltodextrinen als alleinige C-Quelle untersucht. Hierzu wurde eine Minimalagarplatte ohne Kohlenstoffquelle mit SL2282 mittels Minimal-Topagar überschichtet. Anschließend wurden Filterplättchen mit den entsprechenden Maltodextrinen (je 10 µl einer 20 %igen Lösung) aufgelegt (2.2.1.3). Als Kontrolle dienten der Wildtypstamm UJ2602 und die mit *cc2282* komplementierte Mutante SL2282pBB*malS*. Nach Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen.

	MG [Da]	UJ2602 (WT)	SL2282 ($\Delta malS$)	SL2282apBB <i>malS</i>
Maltose	360	3	3	3
Maltotriose	504	3	3	3
Maltotetraose	667	3	3	3
Maltopentaose	829	3	3	3
Maltohexaose	991	3	3	3

Tab.2: Wachstumstest von UJ2602, SL2282 und SL2282pBB*malS* mit Maltodextrinen auf M2-Medium

Auf die entsprechenden Molmassen der Maltodextrine ist hingewiesen. Das Wachstumsverhalten wurde durch Wachstumshöfe um Filterplättchen gemessen, die das jeweilige Maltodextrin enthielten und auf M2-Agarplatten ohne C-Quelle gelegt wurden. Diese wurden zuvor mit dem zu testenden Stamm mit Hilfe von M2-Topagar ohne C-Quelle überschichtet. Die Wachstumszonen um die Filterplättchen entsprechen dem Durchmesser in cm inklusive der Filterplättchen (0,6 cm) und stellen den Mittelwert von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumstests dar.

Die in Tabelle 2 angegebenen Wachstumshöfe zeigen, dass der Wildtyp, die *malS*-Mutante SL2282 sowie die komplementierte Mutante SL2282pBB*malS* alle getesteten Maltodextrine aufnehmen und als Kohlenstoffquelle verwerten konnten. Bei Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose sowie Maltohexaose waren Wachstumshöfe von jeweils 3 cm sichtbar. Die verringerte ¹⁴C-Maltotetraoseaufnahme der SL2282 Mutante in 3.4.1.1 konnte somit nicht bestätigt werden. Auch ohne ein MalS Protein im Periplasma glich das

Wachstum auf höheren Maltodextrinen dem des Wildtyps UJ2602. Auch die verringerte Transportfähigkeit von ^{14}C -Maltose- und Maltotetraose der komplementierten Mutante SL2282pBB*malS* konnte über den Wachstumsversuch nicht bestätigt werden. Auch die komplementierte Mutante zeigte mit allen angebotenen Maltodextrinen das selbe Wachstum wie der Wildtyp UJ2602. Zu berücksichtigen ist, dass die Transportversuche während 3 min, die Wachstumsmessungen über ca. 30 h erfolgten.

3.4.1.3 Komplementationsversuch von *E. coli* RD58 mit CCMaIS

Der *E. coli malS*-Mutante RD58 fehlt chromosomal das Gen für die Glucoamylase (*p25718*). Um zu untersuchen, ob das *C. crescentus* Protein MaIS (CC2282) die Funktion von MaIS (*P25718*) ersetzen kann, wurde *ccmaIS* in *E. coli* RD58 exprimiert und das Wachstum auf Maltodextrinen untersucht. Dazu wurde RD58 mit *ccmaIS* auf pBBRI-MCS2 transformiert. Die zu testenden Stämme wurden mittels Minimal-Topagar ohne C-Quelle auf eine Minimalagarplatte ohne C-Quelle überschichtet und anschließend Filterplättchen aufgelegt, die zuvor mit 10 µl einer Maltodextrinlösung getränkt wurden (2.2.1.3). Nach über Nacht Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen. Als ÜNK wurden die Stämme in TY-Medium angezogen, zentrifugiert und einmal in M9-Medium ohne C-Quelle gewaschen. Die Wachstumstests wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt: der *E. coli malS* Mutante RD58; dem komplementierten RD58*ccmaIS*-Stamm; JB3018-2, einem Derivat von MC4100-1, welcher ein *malTc* Allel trägt und somit auch ohne Maltose im Medium stark für alle *mal*-Gene exprimiert ist; dem Wildtyp MC4100-1 sowie einer RD59 Mutante, der ebenfalls chromosomal das *malS*-Gen fehlt, welche jedoch für den Rest der *mal*-Gene konstitutiv ist. Jeweils getestet wurden eine 10 %ige, 5 %ige, 1 %ige und 0,5 %ige Lösung von Maltose, Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose. Im Falle aller getesteten Stämme konnten nach einem Tag Wachstumshöfe ausgemacht werden, die sich in ihrer Größe nicht voneinander unterschieden (Ø 2,8 cm; Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse des

Plättchentests wurden in Flüssigkultur überprüft. Dazu wurden zunächst nur die Stämme MC4100-1, JB3018-2, RD58 und RD59 in 96 Wells-Platten in M9-Medium mit 5 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % und 0,05 % Maltose bzw. Maltodextrinen angezogen. In Abbildung 18 sind die Wachstumskurven der Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Messungen mit jeweils 0,1 % Maltose bzw. Maltodextrinen dargestellt.

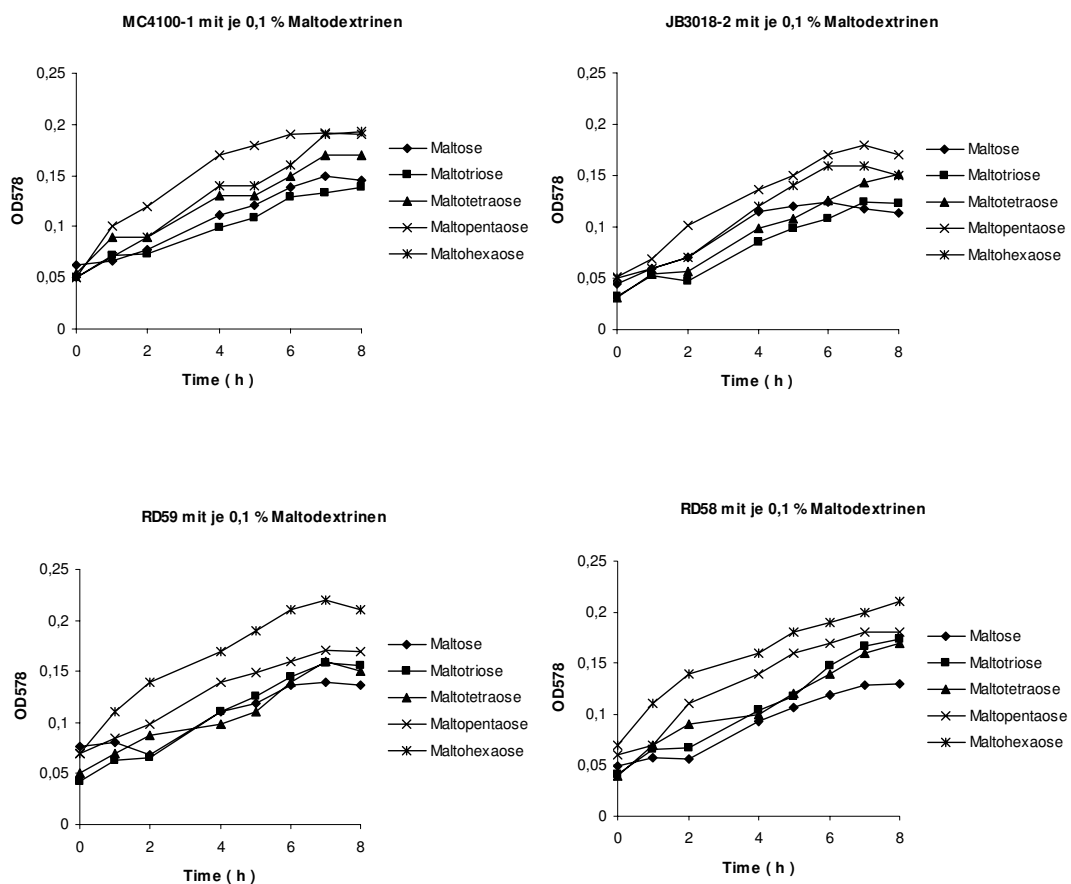


Abb. 18: Wachstumskurven verschiedener *E. coli*-Stämme bei einer Anzucht in M9-Medium mit jeweils 0,1 % Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose

Die Wachstumskurven setzen sich aus den Mittelwerten von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Messungen zusammen. Die Messpunkte entsprechen den zum jeweiligen Zeitpunkt photometrisch gemessenen OD-Werten bei einer Wellenlänge von 578 nm.

Die in Abbildung 18 dargestellten Wachstumsverläufe der untersuchten Stämme in M9-Medium mit je 0,1 % Maltodextrinen zeigen einen einheitlichen Verlauf. Sowohl der Wildtyp MC4100-1 als auch die Mutanten JB3018-2, RD59 und RD58 konnten alle sehr gut mit den angebotenen Maltodextrinen wachsen. MC4100-1 wuchs in der Anfangsphase am schnellsten mit Maltopentaose. Innerhalb von 7 Stunden stieg die OD_{578} von 0,05 auf 0,19 an. Mit den restlichen Maltodextrinen erreichte MC4100-1 innerhalb von ca. 7 Stunden eine OD_{578} von etwa 0,15. JB3018-2 erreichte ähnliche Werte wie MC4100-1. Auch in diesem Fall war die Wachstumsrate mit Maltopentaose am größten. Die OD_{578} stieg von 0,051 nach 7 Stunden auf eine OD_{578} von 0,18 an. Die Wachstumskurven der RD59-Mutante zeigten ebenfalls einen einheitlichen Verlauf. Am Besten wuchs diese Mutante mit Maltohexaose. Hier stieg die OD_{578} innerhalb von 7 Stunden von 0,07 auf 0,22 an. Mit den übrigen Maltodextrinen erreichte RD59 nach 7 Stunden ein Maximum bei einer OD_{578} von ca. 0,16. Auch im Falle von RD58 war die Wachstumsgeschwindigkeit mit Maltohexaose am Besten. Innerhalb von 7 Stunden wurde eine OD_{578} von 0,2 erreicht, welche nach 8 Stunden auf ein Maximum von OD_{578} 0,21 stieg. Die weiteren Maltodextrine führten bei RD58 nach 7 Stunden zu einem Maximum bei einer OD_{578} von ca. 0,14. Nach 22, 26 und 74 Stunden sanken alle Wachstumskurven der getesteten Stämme sehr schnell ab (Daten nicht gezeigt). Abbildung 19 zeigt die Mittelwerte der Wachstumskurven zweier unabhängig voneinander durchgeführter Messungen mit jeweils 0,05 % Maltose bzw. Maltodextrinen. Die getesteten Stämme sind dieselben wie bei 0,1 % Maltose bzw. Maltodextrinen.

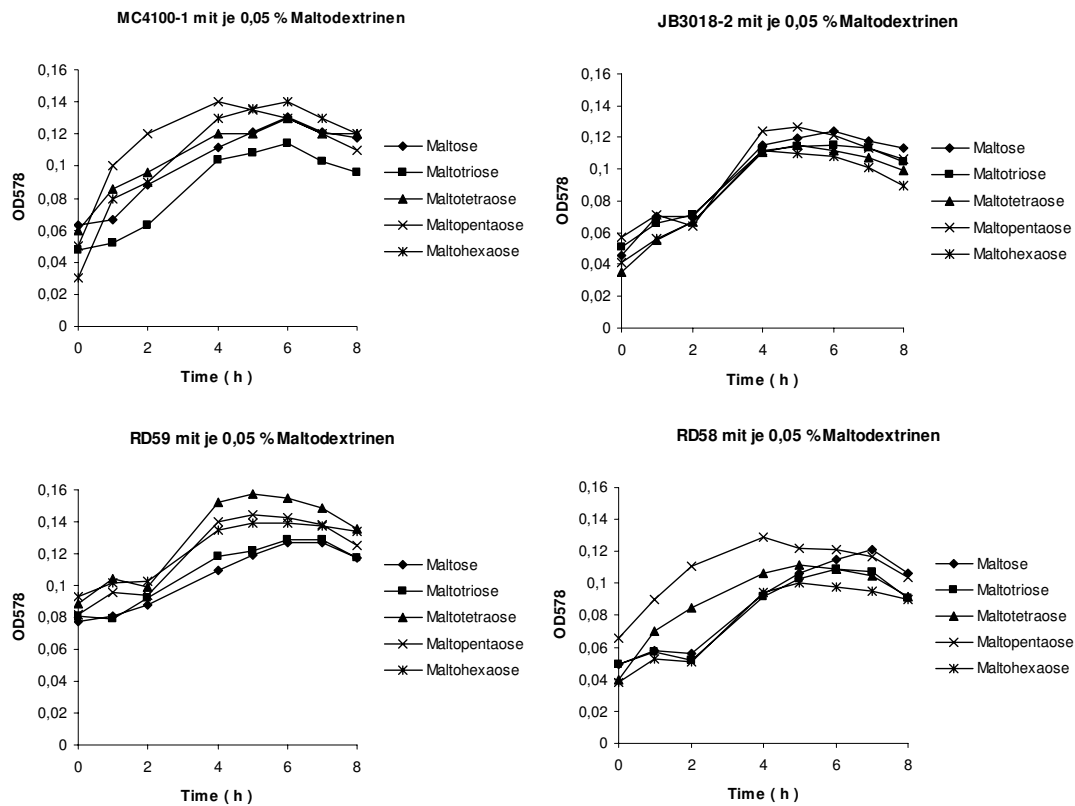


Abb. 19: Wachstumskurven verschiedener *E. coli*-Stämme bei einer Anzucht in M9-Medium mit jeweils 0,05 % Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose

Die Wachstumskurven setzen sich aus den Mittelwerten zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen zusammen. Die Messpunkte entsprechen den zum jeweiligen Zeitpunkt photometrisch gemessenen OD-Werten bei einer Wellenlänge von 578 nm der jeweiligen Stämme, die in den unterschiedlichen Medien angezogen wurden.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind die Wachstumskurven aller getesteten Stämme mit einer Maltodextrinkonzentration von 0,05 % niedriger als bei einer Konzentration von 0,1 %. Auch das Maximum wurde mit der geringeren Maltodextrinkonzentration von 0,05 % bereits nach 5 Stunden erreicht. MC4100-1 erreichte ebenfalls mit Maltopentaose am schnellsten das Maximum. Bereits nach 4 Stunden stieg die OD₅₇₈ von 0,05 auf eine OD₅₇₈ von 0,14 an und sank im weiteren Verlauf kontinuierlich ab. Bei den restlichen Maltodextrinen war der Wachstumsverlauf sehr einheitlich. Das Maximum wurde erst nach ca. 6 Stunden erreicht und lag bei einer Durchschnitts-OD₅₇₈

von 0,13. JB3018-2 erreichte ebenfalls wieder mit Maltopentaose am schnellsten die höchsten OD₅₇₈-Werte. Die OD₅₇₈ stieg mit Maltopentaose von 0,057 nach 5 Stunden auf eine OD₅₇₈ von 0,127 an. Innerhalb der ersten 2 Stunden fand ein geringes Wachstum statt, während das Wachstum nach 4 Stunden durchschnittlich von OD₅₇₈ 0,07 auf OD₅₇₈ 0,11 anstieg. Ebenfalls bei der RD59-Mutante war der Wachstumsverlauf mit allen angebotenen Maltodextrinen einheitlich. Auch hier war eine deutliche Wachstumszunahme nach 4 Stunden zu erkennen. Die OD₅₇₈ stieg innerhalb von 2 Stunden von durchschnittlich 0,089 auf 0,094 an und erreichte nach 5 Stunden das Maximum bei 0,14. RD58 erreichte mit Maltopentaose nach 4 Stunden das Maximum bei einer OD₅₇₈ von 0,129. Mit den restlichen Maltodextrinen wurde das Wachstumsmaximum erst nach 6 bis 7 Stunden bei einer OD₅₇₈ von etwa 0,107 erreicht.

Ein Unterschied in der Wachstumsfähigkeit mit den angebotenen Maltodextrinen konnte zwischen den untersuchten Stämmen MC4100-1, JB3018-2, RD58 und RD59 weder konzentrationsabhängig noch größenabhängig festgestellt werden. Auch mit einer höheren Maltodextrinkonzentration konnte kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da bei der *E. coli malS* Mutante RD58 sowohl im Plättchentest als auch in einer Flüssigkultur mit differierender Maltose- bzw. Maltodextrinkonzentration kein Unterschied im Wachstum festgestellt werden konnte, wurden die Versuche mit einer durch cc2282 komplementierten RD58 Mutante eingestellt. Auch in der Literatur gibt es keine Daten die zeigen, dass MalS von *E. coli* die Aufnahme größerer Maltodextrine fördert.

Die größte Übereinstimmung (54,5 % Identität; 65,3 % Homologie) besitzt das Glucoamylase-Protein CC2282 aus *C. crescentus* zu SO_2459, der Glucoamylase aus *Shewanella oneidensis* MR-1. Das MalS-Protein P25718 aus *E. coli* besitzt in der homologen Region (ca. 270 bp) eine Identität von 30 % zu CC2286 und eine Identität von 32 % (nur ca. 90 bp) zu CC2285, beides α -Amylasen im Gencluster von *malA*. Sie besitzen keine Signalsequenz und werden daher im Cytoplasma von *C. crescentus* vermutet. Das Alignment der P25718 Glucoamylase aus *E. coli* und der Glucoamylase CC2282 aus *C.*

crescentus ist in Anhang 6 dargestellt und zeigt nur geringe Übereinstimmungen.

3.4.2 Herstellung der Transporter:: Ω -Mutante SL2283

Wie unter 2.2.2.7.3 beschrieben, wurde das Gen des mutmaßlichen Transporters in der Cytoplasmamembran (*cc2283*) von *C. crescentus* als *malY* bezeichnet und durch eine Spc/Str-Resistenzkassette ersetzt. Sollte das Gen tatsächlich für einen H⁺/Zucker-Cotransporter in der inneren Membran codieren, würde ein Fehlen des Transporterproteins durch eine verschlechterte ¹⁴C-Maltoseaufnahme zu messen sein, da die Cytoplasmamembran für eine reine Diffusion von Stoffen und Substraten nahezu undurchlässig ist.

3.4.2.1 Transportmessungen mit ¹⁴C-markierter Maltose

Der Wildtyp UJ2602, die *malY*-Mutante SL2283 sowie die komplementierte Mutante SL2283pBB*malY* wurden in M2-Medium mit 0,3 % Maltose angezogen. Bei der komplementierten Mutante befindet sich das Gen *cc2283 (malY)* auf dem Mediumcopy Vektor pBBRI-MCS2, welcher mittels Konjugation in die Mutante SL2283 geschleust wurde. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie in Kapitel 3.1.4.1 und 2.2.2.9 beschrieben. In Abbildung 20 ist eine drastische Verschlechterung des ¹⁴C-Maltosetransports bei der Mutante SL2283 zu beobachten.

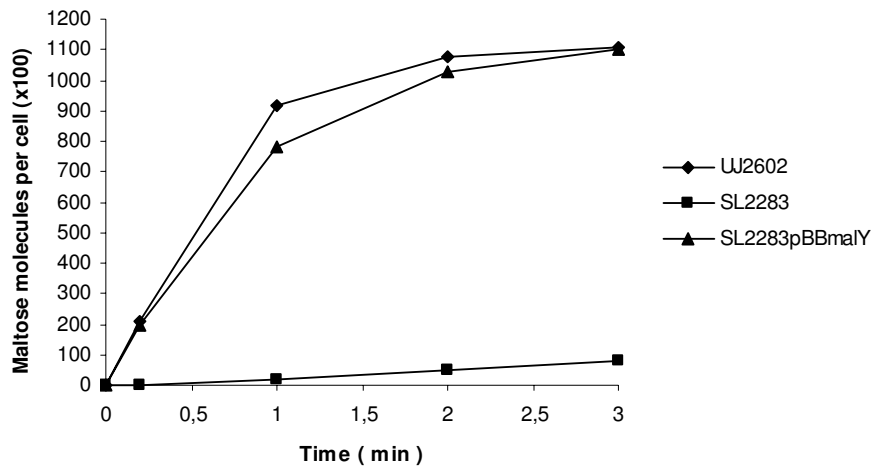


Abb. 20: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2283 sowie der komplementierten SL2283pBB*malY* Mutante nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,3 % Maltose.

Das Fehlen des mutmaßlichen Transportergens *cc2283* ver schlech terte den radioaktiven Maltosetransport sehr stark. Die Transportrate der SL2283 Mutante sank auf 1 % ab, wohingegen die radioaktive Maltosetransport rate des Wildtyps UJ2602 bei 100% lag. Nach Einführen des Wildtyptransportergens *malY* (*cc2283*) in die Mutante SL2283 zeigte diese komplementierte Mutante SL2283pBB*malY* wieder eine dem Wildtyp UJ2602 vergleichbare Transport rate. Demnach codiert *cc2283* für ein Protein, welches den Transport von Maltose über die Cytoplasmamembran katalysiert.

3.4.3 Herstellung der Regulator:: Ω -Mutante SL2284

Wie in Kapitel 2.2.2.7.4 beschrieben, wurde das Gen des mutmaßlichen Regulators (*cc2284*) durch eine Spc/Str-Resistenzkassette ersetzt. Sollte das Regulatorprotein, welches im Folgenden als Mall bezeichnet wird, für die Repression der *mal*-Gene in Abwesenheit von Maltose verantwortlich sein, müsste das Fehlen von Mall durch eine verbesserte Aufnahme von ^{14}C -Maltose nach einer Anzucht unter nicht induzierenden Bedingungen zu messen sein.

3.4.3.1 Transportmessungen mit ^{14}C -markierter Maltose

Die Stämme des Wildtyps UJ2602, der *mall*-Mutante SL2284 so wie die komplementierte Mutante SL2284pBB*mall* wurden einmal unter induzierenden Bedingungen in M2-Medium mit 0,3 % Maltose und einmal unter nicht induzierenden Bedingungen in M2-Medium mit 0,3 % Glucose angezogen. Bei der komplementierten Mutante befindet sich das Gen *cc2284 (mall)* auf dem Mediumcopy Vektor pBBRI-MCS2, welcher mittels Konjugation in die Mutante SL2284 geschleust wurde. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie in Kapitel 3.1.4.1 und 2.2.2.9 beschrieben.

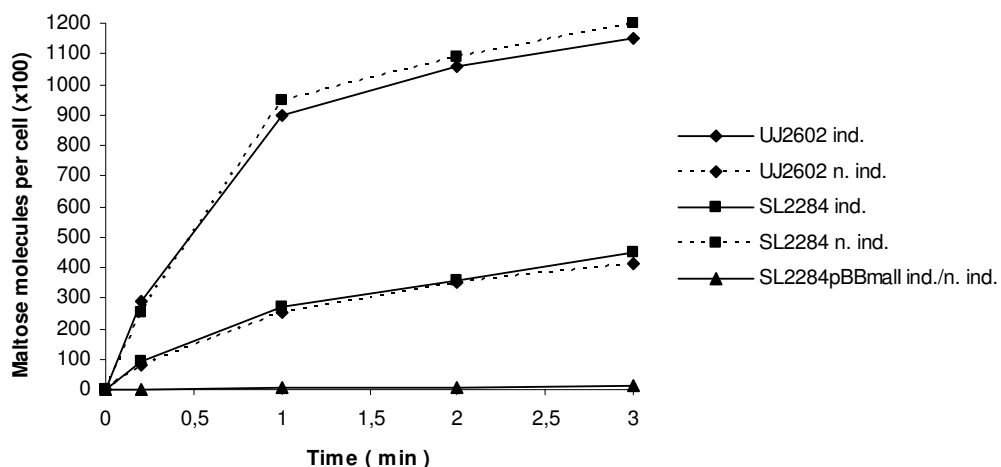


Abb. 21: Aufnahme von ^{14}C -Maltose in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SL2284 sowie der komplementierten SL2284pBB*mall* Mutante nach einer Anzucht in M2-Medium einmal mit 0,3 % Maltose (ind. = induzierend) und einmal mit 0,3 % Glucose (n. ind. = nicht induzierend).

Die Induzierbarkeit des Wildtyps UJ2602 ist in Abbildung 21 gut zu erkennen. Nach einer Anzucht des Wildtyps UJ2602 in M2-Medium mit 0,3 % Maltose stieg die Transportrate rasch an. Bei einer weiteren Anzucht von UJ2602 unter nicht induzierenden Bedingungen in M2-Medium mit 0,3 % Glucose war hingegen ein verringerter Transport der ^{14}C -Maltose zu messen. Unter diesen Bedingungen wurden die Gene für eine rasche Maltoseaufnahme wenig

exprimiert (Neugebauer *et al.*, 2005). Die Mutante SL2284 erreichte dagegen nach einer Anzucht unter nicht induzierenden Bedingungen ähnliche Werte wie der Wildtyp UJ2602 nach der Anzucht unter induzierenden Bedingungen. War im Medium keine Maltose vorhanden, so stieg die ^{14}C -Transportrate der SL2284-Mutante dennoch rasch an. Demnach wird das für den aktiven Transport benötigte MalA-Protein, so wie vermutlich das komplette *mal*-Operon, in SL2284 auch ohne die Anwesenheit des Induktors Maltose konstitutiv exprimiert. Dagegen scheint die Anwesenheit von Maltose bei der Anzucht der Mutante SL2284 unter induzierenden Bedingungen die konstitutive *mal*-Gen-Expression zu hemmen. So konnte nach einer Anzucht von SL2284 mit Maltose im Medium ein reduzierter Transport gemessen werden. Die Transportrate entsprach der Rate des Wildtyps UJ2602 nach einer Anzucht in M2-Medium mit Glucose. Die komplementierte Mutante SL2284pBB*mall* zeigte gar keinen ^{14}C -Maltosetransport. Hier wurde vermutlich durch den verwendeten Mediumcopy Vektor pBBRI-MCS2 zu viel Regulatorprotein CC2284 Mall exprimiert, so dass auch in Anwesenheit von Maltose der Promotor des *mal*-Operons permanent durch „überschüssiges“ Mall blockiert wurde.

3.5 Erfolgt die Substrataufnahme über NagA energieabhängig?

Chitin ist nach Cellulose die zweitgrößte Kohlenstoffquelle in der Natur. *C. crescentus* kann auf den Abbauprodukten von Chitin als einziger C-Quelle wachsen. Es wurde gezeigt, dass der äußere Membranrezeptor NagA für die Aufnahme von N-Acetyl- β -D-Glucosamin (GlcNAc) und dessen höhere Homologen (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ verantwortlich ist (Eisenbeis, 2006). NagA hat ein Molekulargewicht von 95776 DA und eine typische Struktur für ein äußeres Rezeptorprotein. So besitzt es analog dem MalA-Protein eine Signalsequenz, eine TonB-Box Sequenz, EQVVIT, ein β -Barrel aus 22 antiparallelen Faltblättern, eine aus 147 AS gebildete Korkdomäne sowie sehr große extrazelluläre Loops und kurze Turns im Periplasma. Sowohl NagA also auch MalA sind verglichen zu TonB-abhängigen Rezeptoren aus *E. coli* (80

kDA) größer, was vor allem den großen Oberflächenloops beider Rezeptoren zuzuschreiben ist (Anhang 7: Alignment von NagA und MalA). NagA wird wie MalA substratspezifisch induziert. Benachbarte Gene von *cc0446* (*nagA*) sind mit der Aufnahme und der Verwertung von Chitinoligosacchariden in Zusammenhang zu bringen. Das Gencluster um *nagA* ist in Anhang 8 dargestellt. SE0446, eine chromosomale Deletion von *nagA*, konnte nicht mehr auf GlcNAc und seinen höheren Homologen wachsen (Eisenbeis, 2006). Auch im ^{14}C -GlcNAc Transportversuch zeigte die Mutante SE0446 keine aktive Aufnahmerate des Substrats. Eine Deletion von TonB2 hatte auch in diesem Fall keinen Einfluß auf das Wachstum mit GlcNAc und seine höheren Homologen. Auch im ^{14}C -GlcNAc-Transportversuch zeigte eine TonB2-Deletion keinen Effekt auf die GlcNAc-Aufnahmerate. Dagegen wies eine *exbB/D*-Deletionsmutante ein verändertes Wachstumsverhalten auf. Nach einer Anzucht in M2-Flüssigmedium mit GlcNAc als einziger C-Quelle zeigte diese Mutante eine um 50 % verringerte Wachstumsrate verglichen zum Wildtyp UJ2602. Mit höheren Chitinhomologen konnte kaum ein Wachstum dieser Mutante festgestellt werden. Für höhere Chitinhomologe wurde daher ein ExbB/D-abhängiger Aufnahmeweg postuliert (Eisenbeis, 2006). Da auch für GlcNAc und vor allem für $(\text{GlcNAc})_3$ und $(\text{GlcNAc})_5$ eine TonB-ExbB/D-abhängige Aufnahme über den äußeren Membranrezeptor NagA vermutet wird, sollten auch für dieses Substrat die in dieser Arbeit gefundenen mutmaßlichen TonB-Proteine getestet werden.

In Abschnitt 3.1.4.1 konnte ein Zusammenhang der GlcNAc-Aufnahme mit TonB3 ausgeschlossen werden. Auch eine mögliche Komplementation der mutmaßlichen TonB-Proteine TonB2 und TonB3 spielt in der GlcNAc-Aufnahme wie in Abschnitt 3.1.5.1 beschrieben, keine Rolle. Das für den aktiven Maltosetransport verantwortliche TonB1-Protein ist, wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, in der GlcNAc-Aufnahme ebenfalls ohne Bedeutung. Auch eine *tonB1/tonB2* Doppeldeletion spielt in der GlcNAc-Aufnahme wie in Abschnitt 3.3.3.1 erläutert ist, keine Rolle.

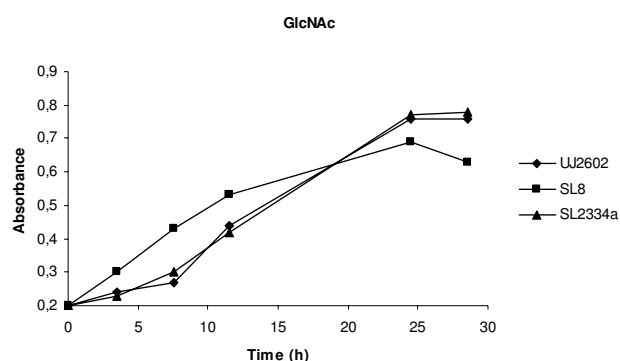
Das höhere Chitinoligosaccharide bei einem Fehlen der hier beschriebenen mutmaßlichen TonB-Proteine schlechter aufgenommen werden, ist allerdings

nicht auszuschließen. Radioaktive, höhere GlcNAc-Homologe standen für Transportversuche nicht zur Verfügung.

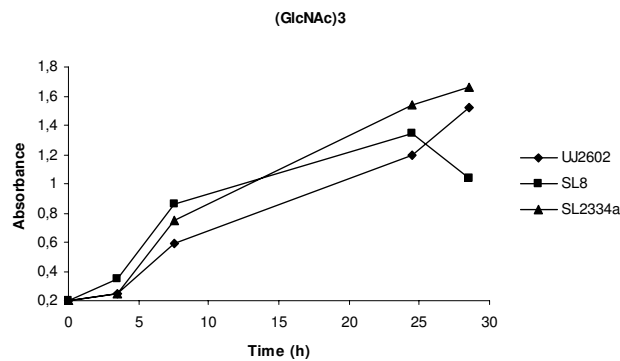
3.5.1 Wachstumstest verschiedener mutmaßlicher *tonB*- Mutanten von *C. crescentus* in GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅

Um eine eventuell mögliche energieabhängige bzw. TonB-abhängige Aufnahme von GlcNAc und seinen höheren Homologen auf einem anderen Weg zu überprüfen, wurden Wachstumstests wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Getestet wurden der Wildtyp UJ2602, die TonB1-Mutante SL2334a sowie die Doppelmutante SL8. Die zu testenden Stämme wurden einmal in M2-Medium mit GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ angezogen. Als Kontrolle diente das Wachstumsverhalten des Wildtyps UJ2602 in den jeweiligen Medien. In Abbildung 22 sind die Wachstumskurven aus den Mittelwerten zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen dargestellt.

A)



B)



C)

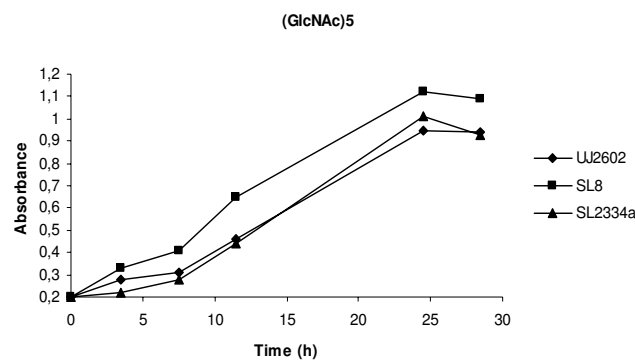


Abb. 22: Wachstumskurven verschiedener *C. crescentus*-Stämme bei einer Anzucht in M2-Medium mit GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅

Die Wachstumskurven setzen sich aus den Mittelwerten zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen zusammen. Die Messpunkte entsprechen den zum jeweiligen Zeitpunkt photometrisch gemessenen OD-Werten bei einer Wellenlänge von 578 nm der jeweiligen Stämme, die in den unterschiedlichen Medien angezogen wurden.

Die in Abbildung 22A dargestellten Wachstumsverläufe der untersuchten Stämme in M2-Medium mit GlcNAc zeigten einen einheitlichen Verlauf. Sowohl der Wildtyp UJ2602 als auch die *tonB1*-Mutante SL2334a und die *tonB2/tonB3*-Doppelmutante SL8 stiegen innerhalb von 25 Stunden von einer OD₅₇₈ 0,2 auf eine OD₅₇₈ von ca. 0,7 an, erreichten dort ihre stationäre Phase und gingen dann in die Absterbephase über. Die Doppelmutante SL8 zeigte eine etwas schnellere Anlaufphase als der Wildtyp UJ2602 und die *tonB1*-Mutante

SL2334a, erreichte die Plateauphase früher und zeigte eine schnellere Absterbephase als der Wildtyp UJ2602 und SL2334a.

Bei dem höher molekularen (GlcNAc)₃ in Abbildung 22B stieg die OD₅₇₈ von 0,2 innerhalb von 25 Stunden durchschnittlich auf eine höhere OD₅₇₈ als bei GlcNAc von 1,3 an. Auch in diesem Fall wuchs die Doppelmutante SL8 schneller und ging bereits 25 Stunden nach dem Erreichen einer OD₅₇₈ von 1,3 in die Absterbephase über. Die *tonB1*-Mutante SL2334a erreichte die Plateauphase erst nach 30 Stunden mit einer OD₅₇₈ von 1,5. Der Wildtyp UJ2602 wuchs langsamer und hatte die stationäre Phase nach 30 Stunden bei einer OD₅₇₈ von 1,5 noch nicht erreicht.

Wurden die Stämme in (GlcNAc)₅ angezogen (Abb. 22C), so wies auch hier die Doppelmutante ein rascheres Wachstum als der Wildtyp UJ2602 und die *tonB1*-Mutante SL2334a auf. Nach 25 Stunden erreichten alle getesteten Stämme die Plateauphase mit einem Wachstum der OD₅₇₈ von 0,2 auf 1,0. Die Doppelmutante SL8 erreichte auch in diesem Substrat schneller eine höhere OD₅₇₈ von etwa 1,1, bevor sie in die Absterbephase über ging.

Bis auf geringe Abweichungen zeigten die unterschiedlichen Stämme von *Caulobacter crescentus* kein verändertes Wachstum in den verschiedenen Substraten. Das Fehlen des Gens *cc2334a* (*tonB1*) sowie das Fehlen der Gene *cc2327* und *cc3508* (*tonB2* und *tonB3*) hatte demnach keinen Einfluß auf das Wachstum der Stämme in GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅.

3.5.2 Komplementation einer nagA Mutante SE0446

Eine frühere Komplementation der SE0446-Mutante zeigte erst nach 4-7 Tagen ein Wachstum auf M2-Medium mit GlcNAc als einziger C-Quelle. Mit (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ als einziger C-Quelle war ein Wachstum sogar erst nach 8 Tagen messbar (Eisenbeis, 2006). Ein radioaktiver Transportversuch mit dieser komplementierten Mutante wurde nicht durchgeführt. Die Komplementation der SE0446-Mutante musste daher wiederholt werden, so dass im Anschluss ¹⁴C-Transportmessungen durchgeführt werden konnten.

3.5.2.1 Transportmessungen mit ^{14}C -markiertem GlcNAc

Die Stämme des Wildtyps UJ2602, der *nagA*-Mutante SE0446 so wie der komplementierten Mutante SE0446pBB*nagA* wurden in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc angezogen. Bei der komplementierten Mutante befindet sich das Gen *cc0446* auf dem Mediumcopy Vektor pBBRI-MCS2, welcher mittels Konjugation in die Mutante SE0446 geschleust wurde. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie in Kapitel 3.1.4.1 und 2.2.2.9 beschrieben.

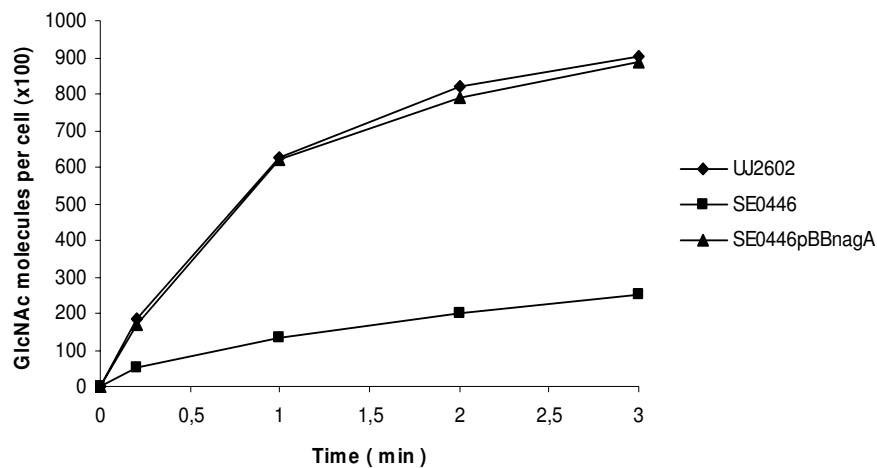


Abb. 23: Aufnahme von ^{14}C -GlcNAc in Abhängigkeit von der Zeit

Verglichen wird der Wildtyp UJ2602 mit der Mutante SE0446 sowie der komplementierten Mutante SE0446pBB*nagA* nach einer Anzucht in M2-Medium mit 0,4 % GlcNAc.

Wie in Abbildung 23 veranschaulicht, transportierte der Wildtyp UJ2602 das ^{14}C -markierte GlcNAc mit einer für den aktiven Transport typischen Aufnahmerate. Auch die komplementierte Mutante SE0446pBB*nagA* konnte das angebotene GlcNAc mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Transportrate aufnehmen. Nur die SE0446 Deletionsmutante zeigte eine stark geschwächte Aufnahme von ^{14}C -markiertem GlcNAc.

3.5.3 Aufreinigung von NagAHis₆

Die absolute Abhängigkeit der GlcNAc-Aufnahme von NagA so wie die Unabhängigkeit von TonB1, TonB2, TonB3 und ExbB/D ließen vermuten, dass NagA eine GlcNAc-spezifische Pore darstellt. Dies sollte durch Einzelkanalmessungen überprüft werden. Hierzu wurde NagA zum einen in *E. coli* BL21 omp8 pBAD0446His₆ und zum anderen in *E. coli* BL21 omp8 degP pBAD0446His₆ durch Induktion mit 0,002 % L-Arabinose überexprimiert (2.2.3.2). Durch die Verwendung der *E. coli* degP-Mutante konnte überprüft werden, ob NagA durch die degP-Protease abgebaut wird. Nach Isolierung der äußeren Membran (2.2.3.3) sollte zunächst getestet werden, durch welche Detergenzien NagAHis₆ aus der Membran gelöst werden konnte. Für das äußere Membranprotein MalA konnte lediglich eine Löslichkeit in 1 % SDS oder 8 M Harnstoff gefunden werden (Neugebauer, 2005). Die getesteten Detergenzien für NagAHis₆ waren 1 % LDAO und 1 % SDS.

Hierzu wurden die äußeren Membranen in 2,5 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und mit dem entsprechenden Detergenz über Nacht bei 12 °C solubilisiert. Nach Abzentrifugieren der Proben wurden die unlöslichen Bestandteile (Pellet nach Solubilisierung) und die solubilisierten Membranproteine (Überstand nach Solubilisierung) auf ein 13 %iges SDS-Gel aufgetragen, um die Löslichkeit der Proteine im entsprechenden Detergenz zu überprüfen. Im Überstand nach der Solubilisierung waren sowohl bei 1 % SDS als auch bei 1 % LDAO Proteinbanden um die 100 kDA zu sehen (Daten nicht gezeigt). Das jeweils in 1 % SDS und 1 % LDAO solubilisierte NagAHis₆ sollte einmal über Ni-NTA beladene Spinsäulen aufgereinigt werden und einmal über Chitin Beads.

Vor dem Auftragen auf die Spinsäulen wurde NagAHis₆ jeweils mit Hilfe von PD-10-Säulen umgepuffert. Im Fall von SDS lag NagAHis₆ nach der Umpufferung in Lysepuffer pH 8 mit 10 mM Imidazol und 0,2 % SDS vor, im Fall von LDAO in Lysepuffer pH 8 mit 10 mM Imidazol und 0,2 % LDAO. Die umgepufferten Proteine wurden über Ni-NTA-Spinsäulen aufgereinigt (2.2.3.4). NagAHis₆ wurde unter nativen Bedingungen zweimal mit 20 mM Imidazol im Waschpuffer gewaschen und zweimal mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer

von der Nickelchelatsäule eluiert. Bei der Aufreinigung über Chitin Beads (2.2.3.5) wurde NagAHis₆ mit 30 mM DTT über Nacht auf der Säule inkubiert und mit 1mM EDTA im Elutionspuffer von der Säule gewaschen. Abbildung 24 zeigt das über Ni-NTA-Spinsäulen und mit 0,2 % LDAO eluierte NagAHis₆.

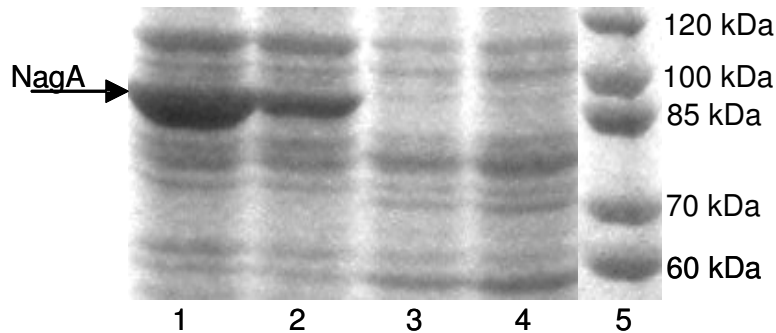


Abb. 24: Aufreinigung von NagAHis₆ mit Ni-NTA-Spin-Säulen

Die Auftrennung des Eluats der Proteine NagAHis₆ in *E. coli* BL21 omp8 degP und NagAHis₆ in *E. coli* BL21 omp8 erfolgte im 13 %igen SDS- Gel. In den Reihen 1 und 2 ist das erste und zweite Eluat mit 0,2 % LDAO und 250 mM Imidazol aus *E. coli* BL21 omp8 degP zu sehen. In den Reihen 3 und 4 ist das erste und zweite Eluat mit 0,2 % LDAO und 250 mM Imidazol aus *E. coli* BL21 omp8 zu sehen. In Reihe 5 ist ein Molekulargewichtsstandard der Firma Fermentas (SM0661) aufgetragen.

Das sowohl in 1 % LDAO als auch in 1 % SDS (Daten nicht gezeigt) solubilisierte NagAHis₆ konnte sowohl über Ni-NTA-Spin-Säulen als auch über Chitin Beads (Daten nicht gezeigt) nach einer Expression in *E. coli* BL21 omp8 degP aufgereinigt werden (Abb.24). Nach 2 Waschschritten wurde wie in den Reihen 1 und 2 in Abbildung 24 zu erkennen ist, eine angereicherte ca.95 kDa große Proteinbande von der Säule eluiert, bei der es sich um NagAHis₆ handeln musste. Nach einer Expression in *E. coli* BL21 omp8 konnte, wie den Reihen 3 und 4 zu entnehmen ist, weder das in SDS (Daten nicht gezeigt) noch das in LDAO solubilisierte NagAHis₆ aufgereinigt werden. Ein Großteil des NagAHis₆-Proteins scheint durch die periplasmatische DegP Protease vor dem Einbau in die äußere Membran von *E. coli* verdaut zu werden. Nach einer Aufreinigung derselben Proben über Chitin Beads wurde dasselbe Ergebnis erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.5.4 Einzelkanalmessungen von NagA an künstlichen Membranen

TonB-abhängige Rezeptoren stellen in der äußeren Membran geschlossene Kanäle dar, die erst nach Substratbindung und Wechselwirkung mit TonB den aktiven Substrattransport durch den Kanal ermöglichen. Im Gegensatz dazu bilden die für die Diffusion von Substraten durch die äußere Membran verantwortlichen Porine offene Kanäle, durch die hydrophile Moleküle kleiner als 600 Da in die Zelle diffundieren können. Anhand von Einzelkanalmessungen (Leitfähigkeitsmessungen) äußerer Membranproteine an künstlichen Lipiddoppelmembranen lässt sich bestimmen, ob das untersuchte Protein einen offenen oder geschlossenen Kanal bildet. Im letztgenannten Fall könnte dies auf ein TonB-abhängiges Protein hindeuten, was z. B. bei dem Membranrezeptor FhuA gezeigt werden konnte (Killmann *et al.*, 1993). Einzelkanalmessungen mit NagAHis₆ sollten Aufschluß über die vermutete GlcNAc-spezifische Pore geben.

3.5.4.1 Einzelkanal-Leitfähigkeit

Mit dem in Kapitel 3.5.3 in *E. coli* BL21 omp8 pBAD0446His₆ überexprimierten und in 1 % SDS solubilisierten und abschließend über Ni-NTA-Spin-Säulen gereinigten NagAHis₆ (*E. coli* BL21 omp8 degP stand damals noch nicht zur Verfügung) wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. R. Benz in Würzburg an künstlichen Lipid-Doppelmembranen Einzelkanalmessungen durchgeführt (2.2.3.7). Dazu wurden nach Ausbildung der Lipid-Doppelmembran („black lipid“-Membran) in jedes Kompartiment der Teflonzelle nach 1:10-Verdünnung wenige µl der gereinigten NagAHis₆-Probe (Endkonzentration 5-10 ng/ml) gegeben. Als Kontrollprobe diente der Stamm BL21 omp8 pBADMyHisB, der analog zu dem NagAHis₆ tragenden Stamm behandelt wurde. Nach Zugabe von NagAHis₆ in die Messapparatur konnte bei einer angelegten Spannung von 20 mV in einer 1 M KCl-Lösung beim Einbau in die künstliche Lipiddoppelmembran aus Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (DiphPC) beobachtet

werden, dass die Leitfähigkeit zunahm (Abb. 25). Es zeigte sich eine ausgeprägte stufenartige Zunahme der Leitfähigkeit, wie sie bei Porinen Gram-negativer Bakterien gefunden werden konnte (Benz *et al.*, 1985).

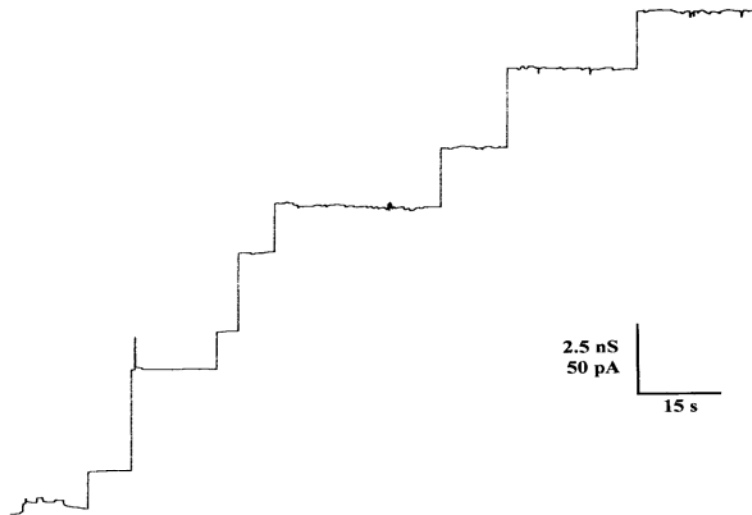


Abb. 25: Einzelkanalmessung von NagAHis₆ (solubilisiert mit SDS) an einer Membran aus DiphPC

Der Puffer enthielt als Elektrolyt 1 M KCl. Die Messung wurde bei einer Spannung von 20 mV, einer Verstärkung von 10 V/A, einer Schreiberauflösung von 500 mV full scale und bei RT durchgeführt.

Um die häufigsten Einlagerungsereignisse bestimmen zu können, wurde die Häufigkeitsverteilung der erhaltenen Leitfähigkeitserhöhungen in einem Histogramm ausgewertet (Abb. 26).

In Abbildung 26 beträgt die häufigste Porenleitfähigkeit 3,00 pS, dicht gefolgt von 1,5 pS. In weiteren Leitfähigkeitsmessungen von NagAHis₆ wurde die häufigste Porenleitfähigkeit bei 2,75 pS und 3,00 pS ermittelt (Daten nicht gezeigt). Im Durchschnitt betrug die häufigste Porenleitfähigkeit 2,56 pS. NagA bildete in diesem Versuch einen Ionen-permeablen Kanal.

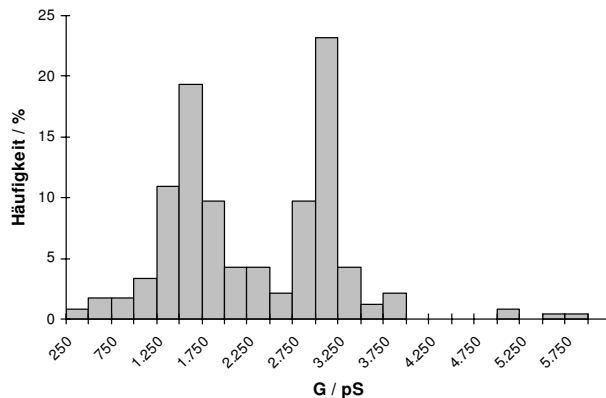


Abb. 26: Wahrscheinlichkeitshistogramm bestimmter Leitfähigkeitserhöhungen in Membranen aus DiphPC von NagAHis₆

Bei allen Messungen enthielt die wässrige Phase als Elektrolyt 1 M KCl. Die Spannung wurde auf 20 mV eingestellt und die Temperatur betrug 20 °C.

3.5.4.2 Titrationsmessungen

Um Substrate besser aufzunehmen, können porenformende Porine eine Bindestelle im Kanal besitzen. Durch Titrationsmessungen lässt sich ermitteln, ob bestimmte Substratmoleküle eine Bindestelle besitzen. Bei der Titrationsmessung wird die Eigenschaft genutzt, dass der Ionenfluss durch die Pore unterbrochen ist, so lange ein Substratmolekül an die Bindestelle gebunden hat. Im Falle von NagA sollte getestet werden, ob die vermuteten transportierten Substrate wie GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ eine Bindung an NagA zeigen. Nach Herstellung der Membran aus 1 % DiphPC in 1 M KCl wurde gereinigtes NagAHis₆ zugegeben und der Leitfähigkeitsanstieg beobachtet. Nachdem sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte und die Leitfähigkeit nicht weiter anstieg wurde mit dem jeweiligen Substrat titriert. Hierzu wurden steigende Mengen der entsprechenden Substratlösung in beide Kompartimente der Kammer gegeben. Als Folge der Substratzugabe kann es nach Substratbindung zu einer stufenartigen Abnahme der Leitfähigkeit kommen. Aus der Leitfähigkeit der Membran kann in Abhängigkeit von der Substratkonzentration die Prozentzahl der besetzten Poren ermittelt werden.

Die Titrationsergebnisse der jeweiligen Substrate ergab für NagA unabhängig von der Konzentration der zugegebenen Stoffe keine Abnahme der Leitfähigkeit (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint NagA keine Substratbindestelle für GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ zu besitzen.

4 Diskussion

Bei Gram-negativen Bakterien erfolgt der aktive Transport von Substraten mit Hilfe von Rezeptoren in der äußeren Membran und des TonB-ExbB/D-Komplexes. Im Jahr 2005 konnte für das Bakterium *C. crescentus* gezeigt werden, dass neben der bekannten Eisen- und Vitamin B₁₂-Aufnahme auch Maltose und Maltodextrine über den äußeren Membranrezeptor MalA ExbB/D-abhängig in die Zelle aufgenommen werden (Neugebauer *et al.*, 2005). Die vorhergesagte TonB-Abhängigkeit des Rezeptors MalA konnte damals nicht nachgewiesen werden. Das im Rahmen dieser Arbeit gefundene *tonB*-Gen, *tonB1*, wird für den Maltosetransport benötigt und vervollständigt somit die These des energieabhängigen Aufnahmesystems von Maltose über die äußere Membran von *C. crescentus* analog der bekannten Eisensiderophor- und Vitamin B₁₂-Aufnahme bei den meisten γ -Proteobakterien. Somit konnte eine energiegekoppelte Maltoseaufnahme für ein α -Proteobakterium nachgewiesen werden. Die Genomsequenz von *Caulobacter crescentus* sagt 67 TonB-abhängige Membranrezeptoren voraus (Neugebauer *et al.*, 2005), was bislang bei Proteobakterien nur durch *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* übertroffen wird. In diesem Genom werden bis zu 72 TonB-abhängige- bzw. TonB-ähnliche Rezeptoren vorhergesagt wobei mit einer Signalsequenz, einem β -Barrel, einer Korkdomäne, einer TonB-Box und einem aromatischen C-Terminus für die Insertion in die äußere Membran lediglich 48 dieser Rezeptoren alle Charakteristika eines TonB-abhängigen Rezeptors besitzen (Blanvillain *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* besitzt 34 TonB-abhängige Rezeptoren (Stover *et al.*, 2000; Niermann *et al.*, 2001) und in uropathogenen *E. coli* Stämmen werden bis zu 18 TonB-abhängige Rezeptoren vorhergesagt. Alle weiteren bisher sequenzierten Genome enthalten nicht mehr als 13 TonB-abhängige Proteine (Ireland *et al.*, 2002). Die hohe Anzahl äußerer Membranrezeptoren transportieren neben dem Substrat Maltose vermutlich noch weitere Substanzen aus dem nährstoffarmen Habitat, in denen das heterotrophe Bakterium *C. crescentus* zu finden ist. In der Vielzahl dieser TonB-abhängigen Rezeptoren kann ein Ersatz der Porine des OmpF- und C-Typs

erkannt werden, die in dem Genom von *Caulobacter crescentus* nicht vorhergesagt werden. Bei *E. coli* können hydrophile Moleküle durch diese Porine über passive Diffusion die äußere Membran passieren. Bei *E. coli* werden die aktiven Transporter in der äußeren Membran als eine Anpassung an die geringe Verfügbarkeit von Eisen, welches häufig ein wachstumslimitierender Faktor für *E. coli* ist, gesehen. Generell ist eine gut ausgearbeitete zelluläre Importmaschinerie in einer Umwelt, in welcher die Nährstoffe in stark verdünnter Konzentration vorliegen, ein deutlicher Wachstumsvorteil. Reine Diffusion dürfte hier zu einer sehr ineffektiven Versorgung der Zellen führen.

4.1 Maltose wird TonB-abhängig aufgenommen

Über äußere Membranrezeptoren aufgenommene Substrate werden mit einer hohen Affinität an ihren jeweiligen Rezeptor gebunden. Die Freilassung der Substrate aus ihrer Rezeptorbindungsstelle sowie eine Konformationsänderung des Korken innerhalb des β -Barrels, um die weitere Diffusion des Substrats durch die geöffnete Pore ins Periplasma zu ermöglichen, benötigt Energie. Diese Energie stammt aus dem Protonenpotential über der Cytoplasmamembran und wird durch den Energietransduktionskomplex TonB-ExbB/D vermittelt.

Für zunehmend mehr Bakterien sind mittlerweile - neben Eisen und Vitamin B₁₂ - energieabhängige Aufnahmen von Substraten über die äußere Membran in das Periplasma der Zellen beschrieben worden. So wurden für das Gram-negative anaerobe Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* zwei äußere Membranproteine identifiziert, welche für die Aufnahme der Mucopolysaccharide Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure sowie für die Maltooligosaccharid- und Stärkeaufnahme verantwortlich sind (Cheng *et al.*, 1995; Reeves *et al.*, 1996). Dabei handelt es sich um das Protein SusC, das zusammen mit vier weiteren äußeren Membranproteinen (SusD, SusG; SusE, SusF) für das Wachstum mit höheren Maltodextrinen und Amylose als einzige C-Quelle nötig wird (Reeves *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2001). Bislang werden 106

paralogen SusC Proteine und 53 paralogen SusD Proteine in der Datenbank vorhergesagt. Das CsuF-Protein ermöglicht das Wachstum mit Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure als einziger C-Quelle. Analog zu MalA ist die Expression von SusC substratabhängig reguliert, jedoch über einen Aktivator SusR. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei SusC und CsuF um Proteine handelt, die in der äußeren Membran lokalisiert sind. Da SusC eine Bindestelle für Stärke besitzt, keine enzymatische Aktivität aufweist und Stärke nicht durch Diffusion in die Zelle gelangt, ist auszuschließen, dass es sich bei SusC um ein Porin handelt. Eine Substratbindestelle für Chondroitinsulfat in CsuF konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Obwohl *B. thetaiotaomicron* mit *E. coli* nur gering verwandt ist, zeigte jeweils ein 60 Aminosäuren umfassender Bereich von SusC bzw. CsuF große Homologie zu TonB-abhängigen Eisenkomplex- bzw. Vitamin B₁₂-Rezeptoren (49 - 66 %ige Identität zu FepA, BtuB, CirA, IutA und FhuA aus *E. coli*). Somit könnten SusC und CsuF Membranproteine darstellen, die möglicherweise für eine TonB-abhängige Substrataufnahme verantwortlich sind. Weder für SusC noch für CsuF wurde bisher eine TonB-Abhängigkeit nachgewiesen. Im Vergleich zu MalA wurde für SusC und CsuF bisher auch keine ExbBD-Abhängigkeit beschrieben. In dem Genom von *B. thetaiotaomicron* werden mehrere *tonB*-Gene vorhergesagt, welche bislang keinem Rezeptor bzw. Substrat zugeordnet wurden. Für *Xanthomonas campestris* wurde die Aufnahme von Sucrose über den äußeren Membranrezeptor SuxA beschrieben (Blanvillain *et al.*, 2007). SuxA ist einer von vielen vermutlich TonB-abhängigen Membranrezeptoren in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Für SuxA war eine Induzierbarkeit durch Sucrose nachweisbar. Eine *suxA*-Deletionsmutante zeigte in einem ¹⁴C-Transportversuch nach acht Minuten nur noch 3,5 % der Wildtypaufnahmerate, während nach 240 Minuten bereits 23 % der Wildtyprate erreicht wurden. Dies deutet zum einen auf eine schnelle, induzierbare und energieabhängige Aufnahme der Sucrose über SuxA hin und zum anderen auf eine langsamere Aufnahme über passive Diffusion durch Porine. Der weitere Transport über die CM erfolgt per integralem Membranprotein SuxC. Das *sux*-Operon wird durch den Repressor SuxR substratabhängig reguliert. Die vorhergesagte TonB-

abhängige Aufnahme konnte nicht nachgewiesen werden, da jeweils nur eines der acht auf dem Chromosom von *X. campestris* vorhandenen *tonB*-Gene eliminiert wurde und sich die *tonB*-Gene vermutlich gegenseitig komplementieren können. Der Einsatz von CCCP reduzierte den ^{14}C -Transport verglichen zur 100 %igen Transportrate ohne CCCP auf ca. 1 %. Ob damit ein möglicher TonB-abhängiger Transport über die äußere Membran oder der Transport durch SuxC über die CM blockiert wird ist unklar, da SuxC zu der Familie der H^+ -Cotransporter gehört und somit die Energie des Protonenpotentials für Transportvorgänge nutzt. Eine mögliche ExbB/D-Abhängigkeit wurde bislang nicht geklärt. Auf dem Chromosom von *Xanthomonas c.c* sind 2 Kopien der *exbB/D*-Gene lokalisiert (Blanvillain *et al.*, 2007). Auch das kleine Genom des ϵ -Proteobakteriums *Helicobacter pylori* zeigte sehr viele Proteine, die an der Eisenaufnahme über die äußere Membran beteiligt sein sollen (Tomb *et al.*, 1997). So wurden drei orthologe Eisendicitrat-Aufnahmesysteme analog dem Fec-System, drei Eisensiderophor-Aufnahmesysteme, drei orthologe ExbB/D-Proteine und zwei TonB-Proteine beschrieben. Es konnte dargestellt werden, dass bei einem neutralen pH-Wert das unlösliche Fe^{3+} TonB-ExbB/D-abhängig über die äußere Membran aufgenommen wird. Weiterhin wurde entdeckt, dass neben der energieabhängigen Eisenaufnahme auch ein energieabhängiger Transport für Nickelionen bei einem geringen pH-Wert vorhanden ist (Schauer *et al.*, 2007). Nickel ist ein Spurenelement, welches für das Überleben von *H. pylori* bei der Kolonisation im menschlichen Magen essentiell ist, da Nickel den Cofaktor des wichtigen Pathogenitätsfaktors Urease darstellt. Fehlte das durch *frpB4* codierte äußere Membranprotein FrpB4, war die Ni^{2+} -Aufnahme bei einem pH von 5 stark reduziert. Dieser pH-Wert entspricht dem Milieu während der Kolonisierung des Magens durch *H. pylori*. Dasselbe Ergebnis wurde mit einer chromosomalen *tonB-exbB/D*-Mutante bei niedrigem pH-Wert erreicht. FrpB4 ist in der äußeren Membran lokalisiert (Sabarth *et al.*, 2005) und besitzt eine Reihe charakteristischer Merkmale, die bei TonB-abhängigen äußeren Membranrezeptoren gefunden werden. Das Alignment von FrpB4 und MalA ist in Anhang 9 zu sehen (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw/result?tool=clustalw>

&jobid=clustalw-20080110-10232682&poll=yes). Die Transkription der Gene *frpB4*, *tonB*, *exbB/D* sowie des cytoplasmatischen Nickeltransporters *nixA* stehen unter der Kontrolle des Repressors NikR (Davis *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem zu untersuchen, ob der Maltosetransport über den äußeren Membranrezeptor MalA nicht nur *exbB/D*-abhängig, sondern auch *tonB*-abhängig abläuft. Obwohl *C. crescentus* zu den α -Proteobakterien gehört, konnten in seinem Genom Gene mit einer 26-, 40- und 46 %igen Übereinstimmung zu den bekannten *E. coli* Genen *tonB*, *exbB* und *exbD* gefunden werden. Eine Inaktivierung dieser *exbB/D*-Gene verhinderte den MalA-vermittelten Maltosetransport, während eine Inaktivierung des vorhergesagten *tonB*-Gens keinen Einfluß auf den Maltose-, Maltotriose- und Maltotetraose Transport zeigte (Neugebauer *et al.*, 2005). Bisher konnte in γ -Proteobakterien nur ein Zusammenwirken der *exbB/D*-Gene und des *tonB*-Gens beobachtet werden, weshalb die *tonB2*-Deletion (*cc2327*) in HB2004 überprüft wurde (3.1.1) und anschließend ein weiteres *tonB*-Gen auf dem Genom von *C. crescentus* gesucht wurde. Um ein zweites *tonB*-Gen auf dem Chromosom auszumachen, wurde die Genomsequenz von *C. crescentus* mit der mutmaßlichen TonB2-Sequenz (CC2327) geblastet. Das Protein mit dem besten BLAST score war das als hypothetisches Protein bezeichnete Protein CC3508. CC2327 besitzt eine Identität von 43 % und eine Homologie von 61 % zu CC3508. TonB3 zeigte zu mehreren TonB- bzw. TonB-ähnlichen Proteinen aus der *Xanthomonas*-Familie eine Übereinstimmung (3.1.3). Das Gen *cc3508* wurde chromosomal deletiert (3.1.4) und anschließend durchgeführte ¹⁴C-Maltosemessungen mit dieser *tonB3*-Deletionsmutante SL3508 zeigten keinen Effekt auf die Maltoseaufnahme (3.1.4.1). Auch die chromosomale Doppelmutante SL8, in der beide mutmaßlichen *tonB*-Gene (*tonB2* und *tonB3*) deletiert wurden (3.1.5), zeigte keine Auswirkungen auf den Maltosetransport (3.1.5.1). Wie Abbildung 5 zu entnehmen ist, transportierten sowohl SL3508 als auch SL8 die radioaktive Maltose mit der gleichen Rate wie der Wildtyp UJ2602. Sowohl TonB2 als auch TonB3 haben demnach keinen Einfluß auf eine

energieabhängige Maltoseaufnahme über die äußere Membran von *Caulobacter crescentus*. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl das mutmaßliche TonB2- als auch das mutmaßliche TonB3-Protein für ein weiteres Substrat neben Maltose eine TonB-Funktion übernehmen können. Ob ein TonB-Protein an der Substrataufnahme über die äußere Membran beteiligt ist, lässt sich ebenfalls über Veränderung in der TonB-Box der Rezeptoren überprüfen. Wird ein äußerer Membranrezeptor mit seinem jeweiligen Substrat beladen, erfährt er eine Konformationsänderung, wodurch das TonB-Protein beladene Rezeptoren erkennt und an die TonB-Box des Rezeptors binden kann. Hierdurch wird die nötige Energie für die Freilassung der gebundenen Substrate und die Konformationsänderungen innerhalb des Rezeptors geliefert (Ferguson *et al.*, 1998, 2002; Chimento *et al.*, 2003). Vermutlich über einen Strang austausch bildet der N-terminale Teil der Rezeptoren inklusive der TonB-Box ein paralleles, intermediäres β -Faltblatt mit einem der β -Stränge des TonB-Proteins aus (Pawelek *et al.*, 2006; Shultis *et al.*, 2006). Bei dem Ferrichromrezeptor FhuA wird unter anderem zwischen Thr¹² innerhalb der TonB-Box und Gln¹⁶⁰ des TonB-Proteins eine Wasserstoffbrücke ausgebildet. Des Weiteren bilden Ile⁹, Thr¹⁰, Val¹¹ und Ala¹³ des Rezeptors FhuA mit Val²²⁵, Val²²⁶, Leu²²⁹ und Lys²³¹ des TonB-Proteins das gemeinsame Interprotein β -Faltblatt zwischen den β -Faltblättern β 1 bis β 3 des TonB-Proteins. Valin innerhalb der TonB-Box von FhuA an Position 11 ist in vielen äußeren Membranrezeptoren wie bspw. BtuB, FecA und FepA zu finden. Sie stellt einen hochkonservierten hydrophoben Bereich dar. So konnte der Ferrichromtransport in FhuA nach einem Austausch der Aminosäuren I9P und V11D in der TonB-Box D⁷T⁸I⁹T¹⁰V¹¹ blockiert werden (Schöffler und Braun, 1998). Die Interaktion zwischen Arg¹⁶⁶ des TonB-Proteins und Glu⁵⁶ der Korkdomäne von FhuA ist möglicherweise für die Dislokation des Korken und somit für die Öffnung der Pore von Bedeutung. Bei dem Vitamin B₁₂-Rezeptor BtuB wird in einem TonB/BtuB-Komplex eine Salzbrücke zwischen der geladenen Aminosäure Arg¹⁵⁸ des TonB-Proteins und Asp⁶ des Rezeptors BtuB ausgebildet. Gln¹⁶⁰ des TonB-Proteins interagiert mit Asp⁶, Leu⁸ und Val¹⁰ des Rezeptors. Weiter interagieren Gly¹⁶² des TonB-Proteins mit L⁸ und Ala¹² des

Rezeptors. Daneben interagiert noch Thr¹⁶³ des TonB-Proteins mit Ala¹² des Rezeptors. Auch hier wurde die Aufnahme von Vitamin B₁₂ über den äußeren Membranrezeptor BtuB nach einem Tausch der Aminosäuren L8P sowie V10P in der TonB-Box von BtuB (D⁶T⁷L⁸V⁹V¹⁰) verhindert (Heller *et al.*, 1988). Es wird angenommen, dass sich durch die geänderte TonB-Box-Sequenz die Struktur derart verändert, dass das TonB-Protein nicht mehr binden kann (Gudmundsdottir *et al.*, 1989.). Aus diesem Grund steht die elektrochemische Energie aus dem Protonenpotential für anschließende Strukturänderungen innerhalb des Rezeptors nicht zur Verfügung.

In *Caulobacter crescentus* zeigte die chromosomale *malA*-Deletionsmutante HB2003 keinen ¹⁴C-Maltosetransport. Wurde HB2003 mit dem Wildtyp *malA*-Gen komplementiert, so konnte eine dem Wildtyp vergleichbare ¹⁴C-Transportrate wieder hergestellt werden (3.2.1). Wurde hingegen ein verändertes *malA*-Gen, dessen TonB-Box mittels einer Punktmutation eine Veränderung an Position 15 von Valin nach Prolin erfahren hatte (pBB2287) in die Mutante HB2003 eingeführt (HB2003pBB2287), so konnte kein ¹⁴C-Maltosetransport gemessen werden (3.2.1.1). Nach einem Tausch der Aminosäuren V15P in der vermuteten TonB-Box von *C. crescentus* (E¹³E¹⁴V¹⁵V¹⁶I¹⁷T¹⁸) fand analog den zuvor beschriebenen Fällen im Ferrichrom- und Vitamin B₁₂-Aufnahmesystem kein ¹⁴C-Maltosetransport mehr statt. Somit handelt es sich bei der N-terminalen MalA Sequenz EEVVIT um die TonB-Box dieses Rezeptors. Eine Veränderung des an Position 15 befindlichen Valins hat auch in der TonB-Box von MalA großen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit des TonB-Proteins an diese Sequenz bzw. Struktur. Bereits frühere Beobachtungen zeigten, dass es sich bei der Aminosäure Valin in TonB-Boxen um eine besonders konservierte und an der TonB-Bindung beteiligte Aminosäure handelt (Pawelek *et al.*, 2006). Auch die Einführung von Prolin zeigte schon früher eine große Auswirkung auf die Fähigkeit der TonB-Bindung an TonB-Boxen, da deren Struktur durch Prolin stark verändert wird (Heller *et al.*, 1988; Pawelek *et al.*, 2006; Shultis *et al.*, 2006). Das Ergebnis dieses Versuches deutete darauf hin, dass tatsächlich ein bisher nicht identifiziertes TonB-Protein an der Aufnahme von Maltose über die äußere

Membran von *C. crescentus* beteiligt sein muss. Diesem TonB-Protein ist es durch die geänderte TonB-Box-Sequenz nicht mehr möglich, an den Rezeptor MalA zu binden und seine Funktion als Energieüberträger auszuüben.

Aus diesem Grund fokussierte sich die vorliegende Arbeit nochmals auf die Suche nach dem für das Substrat Maltose verantwortlichen *tonB*-Gen auf dem Chromosom von *C. crescentus*. Dazu wurde in dem Genom von *Caulobacter sp.* K31 nach homologen Sequenzen der Gene *tonB2* (*cc2327*), *exbB* (*cc2336*) und *exbD* (*cc2335*) aus *Caulobacter crescentus* CB15 gesucht. Für *Caulobacter sp.* K31 werden bislang über 100 TonB-abhängige Membranrezeptoren bzw. Vorläuferproteine, 5 Proteine aus der TonB-Familie, ein TonB-ähnliches Protein sowie fünf ExbD- und vier ExbB-Proteine vorhergesagt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=NC_010338). Nach einem Blast auf Proteinebene von CC2327 gegen das Genom von *Caulobacter sp.* K31 wurde das Protein Caul_3579 gefunden, das laut Datenbank in die TonB-Familie einzuordnen ist. In direkter Umgebung von *cs3579* liegen die *exbB/D*-Gene *cs3581* und *cs3580*, welche zu den *exbB/D*-Genen aus *C. crescentus* (*cc2336* und *cc2335*) eine sehr hohe Identität aufweisen (92 % bzw. 82 %). Bei der Suche nach offenen Leserahmen in der Region um die *exbB/D*-Gene aus *C. crescentus* wurde ein ORF für ein Gen mit einer 84 %igen Identität zu *cs3579* aus *Caulobacter sp.* K31 gefunden. Dieses Gen, *cc2334a*, ist in derselben Leserichtung wie die *exbB/D*-Gene angeordnet.

Das klassische TonB-Protein von *E. coli* lässt sich in drei Bereiche aufteilen. Die erste Domäne wird von den Aminosäuren 1-32 gebildet. Diese stellen eine Transmembrandomäne (TMD) dar, worüber TonB in der Cytoplasmamembran verankert ist und welche für die Energietransduktion benötigt wird. Via α -Helix (AS 12-32) kann genannte Domäne mit dem ExbB-Protein interagieren, wodurch die Stabilisierung des TonB-Proteins beeinflusst wird. Auch die C-terminale Struktur des TonB-Proteins wird über die Bindung der TMD von TonB an ExbB/D beeinflusst. Die zweite Domäne (AS 33-102) wird als die prolinreiche Region bezeichnet. Hier wechseln sich Glu-Pro und Lys-Pro in hoher Anzahl ab. Möglicherweise kann über diese Domäne die variable Größe

des periplasmatischen Raums überbrückt werden. Die dritte Domäne setzt sich aus den restlichen Aminosäuren 103-239 zusammen, wobei die AS 103-151 wahrscheinlich einen unstrukturierten Bereich darstellen und die AS 152-239 einen strukturierten Abschnitt aus 2 α - und 3 β -Bereichen bilden (Peacock *et al.*, 2005). Viele dieser klassischen TonB-Motive können in CC2334a gefunden werden. TonB1 besitzt das hochkonservierte YP-Motiv. Für die Aminosäure Tyrosin dieses YP-Motifs konnte bei *E. coli* gezeigt werden, dass diese mit der TonB-Box der äußeren Membranrezeptoren FhuA und BtuB in engen Kontakt tritt (Pawelek *et al.*, 2006; Shultis *et al.*, 2006). Auch die prolinreiche periplasmatische Domäne ist in CC2334a vorhanden. Der hydrophobe Transmembranbereich mit der AS His kommt ebenfalls vor. Außerdem ist His²⁰ für die TonB-Aktivität bei *E. coli* von großer Bedeutung, da nach einem Austausch der AS His²⁰ gegen Ala in der TMD des *E. coli* TonBs keine TonB-Aktivität mehr festgestellt werden konnte (Larson *et al.*, 2007; Larson und Postle, 2001; Traub *et al.*, 1993). Da die Gene *exbB/D* in gleicher Orientierung direkt neben *cc2334a* liegen, eine große Homologie zu dem als *tonB* beschriebenen Gen *cs3579* vorliegt und charakteristische TonB-Merkmale vorhanden sind wurde die Annahme gestützt, dass es sich bei CC2334a um ein TonB-Protein handelt. Während die Gene für den Energietransduktionskomplex *tonB-exbB/D* bspw. bei *E. coli* und *P. aeruginosa* nicht direkt nebeneinander (*b1252-b3005/b3006* und *pa5531-pa0693/pa0694* bzw. *pa0198/pa0199*) liegen, findet man bei *V. cholerae* (VC0395) die *tonB1-exbB1/exbD1*-Gene ebenfalls direkt hintereinander (*vc0327-vc0326/vc0325*). Beide *Caulobacter*-Stämme weisen dieselbe Reihenfolge der Gene des Energietransduktionskomplexes direkt in Abfolge hintereinander auf. Deshalb wurde das Gen *cc2334a* in *C. crescentus* chromosomal deletiert (3.3.1). Die Konstruktion dieser Mutante erforderte eine erhöhte Eisenkonzentration in den Selektionsplatten und den benötigten Medien (doppelte FeSO₄ Menge). Diese Beobachtung wurde auch bei der Konstruktion der *tonB-exbB/D*-Mutante in *H. pylori* gemacht (Schauer *et al.*, 2007). Auch hier wurde den entsprechenden Selektionsplatten sehr viel mehr Eisen als üblich zugesetzt (500 μ M gegenüber 1 μ M FeCl₃), da ansonsten keine Kolonien wuchsen. Ebenso wie die Nickelaufnahme bei pH 5 ist die

Aufnahme von Eisen bei *H. pylori* bei neutralem pH an den Energietransduktionskomplex TonB-ExbB/D gebunden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Eisenverbindungen auch bei *C. crescentus* energieabhängig mit Hilfe des TonB-ExbB/D-Komplexes aufgenommen werden. Neugebauer *et al.* zeigten 2005, dass *C. crescentus* mit den TonB-abhängigen Siderophoren Desferal und Rhodotorulasäure unter Eisenmangelbedingungen wachsen kann. Falls der Energietransduktionskomplex bzw. das verantwortliche TonB-Protein fehlt, muß eine ausreichende Eisenversorgung im Medium sichergestellt werden. Die *tonB1*-Deletionsmutante SL2334a zeigte im ¹⁴C-Maltosetransport keine aktive Aufnahme der Maltose, während der Wildtyp UJ2602 sowie die komplementierte Mutante SL2334apBB*tonB1* die angebotene radioaktive Maltose rasch aufnehmen konnten (3.3.1.1). Somit wirkte sich das Fehlen des Gens *cc2334a* deutlich auf den Maltosetransport aus und eine aktive Aufnahme der Maltose ist ohne CC2334a nicht möglich. Wachstumstests der Mutante SL2334a mit verschiedenen Maltodextrinen auf Minimalagarplatten ohne C-Quelle zeigten verglichen zum Wildtyp kleinere Wachstumshöfe um die aufgelegten Filterplättchen mit Maltotriose und -tetraose. Wurden als C-Quelle Maltopentaose und -hexaose eingesetzt, konnten keine Wachstumszonen erkannt werden (3.3.1.2). Dies bestätigte die Annahme, dass *tonB1* für die aktive Aufnahme von Maltodextrinen verantwortlich ist. Die Aufnahme der größeren Maltodextrine ist an den Energietransduktionskomplex TonB-ExbB/D gebunden, wie bereits Neugebauer *et al.*, 2005 vermuteten. Wurde Maltose als C-Quelle verwendet, entsprachen die Wachstumshöfe denen des Wildtyps. Auch dieses Wachstumsverhalten wurde bereits bei der *malA*-Deletionsmutante und einer *exbB/D*-Deletionsmutante von Neugebauer *et al.*, 2005 beobachtet. Dadurch wurde das Vorhandensein von Porinen, über die eine Diffusion von kleineren Molekülen wie Maltose, Maltotriose und -tetraose (360, 504 und 667 Da) ermöglicht werden kann, in der äußeren Membran von *C. crescentus* postuliert. Diese Beobachtungen decken sich mit der bekannten Maltodextrinaufnahme bei *E. coli*. In diesem Fall können kleinere Moleküle wie Maltose, Maltotriose und Maltotetraose unabhängig von LamB in die Zelle diffundieren. Die Aufnahme größerer Maltodextrine wie bspw. Maltopentaose

und -hexaose ist dagegen an die erleichterte Diffusion über das spezifische Porin LamB gebunden. Auch bei *Xanthomonas c.c.* konnte durch Blanvillain *et al.* (2007) gezeigt werden, dass Sucrose durch eine aktive energieabhängige Aufnahme über den äußeren Membranrezeptor SuxA schnell in die Zelle gelangt, während ein langsames Wachstum in einer *suxA*-Deletionsmutante über passive Diffusion ermöglicht wird.

Ein Vergleich der in *C. crescentus* gefundenen, mutmaßlichen TonB-Proteine CCTonB1, CCTonB2 und CCTonB3 entspricht in mehrerer Hinsicht den bisherigen Erkenntnissen der TonB-Forschung (3.3.2). So besitzen die meisten TonB-Proteine eine TMD, wie z.B. das *E. coli* TonB-Protein und CCTonB1 und CCTonB2, während das TonB3-Protein 5 vorhergesagte TMD aufweist. Auch die periplasmatische Domäne der TonB-Proteine ist in ihrer Länge sehr variabel (22-283 AS). Zwar ist der hohe Anteil von Prolin in dieser Region die Regel, jedoch nicht zwingend. So ist das Protein CCTonB3 wesentlich größer als CCTonB1 und CCTonB2 und besitzt keine prolinreiche Region, während TonB1 und TonB2 wie auch das TonB-Protein aus *E. coli*, eine prolinreiche Region aufweisen. Die stark konservierten Bereiche der TonB-Proteine sind sowohl die Transmembranhelix am N-Terminus als auch die letzten 90 AS des C-Terminus (Peacock *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2007). Für diese Analyse wurden insgesamt 263 TonB-Proteine aus 144 Gram-negativen Bakterien miteinander verglichen, worunter Vertreter der *Proteobakterien*, *Cyanobakterien*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Clamydrien/Verrucomicobien* und *Fusobakterien* waren. 42 % dieser Bakterien besitzen mehr als ein TonB-Protein, und 67 % besitzen 2 oder 3 TonB-Proteine. In *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a werden sogar neun TonB-Proteine vorhergesagt. Es ist daher anzunehmen, dass auch in *C. crescentus* mehr als nur ein funktionelles TonB-Protein vorhanden ist. So stellt das TonB2-Protein einen guten Kandidaten für ein weiteres TonB-Protein in *C. crescentus* dar. Es ist dem charakterisierten TonB1-Protein in seiner Sequenz sehr ähnlich.

4.2 Das *mal*-Gencluster

Stärke ist die dritthäufigste Kohlenstoffquelle in der Natur. Da *C. crescentus* keine extrazelluläre Amylase besitzt kann es auf Stärke nicht wachsen. Mit Maltodextrinen hingegen, den Abbauprodukten der Stärke, kann *C. crescentus* wachsen. Auch *E. coli* kann mit Maltodextrinen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. In diesem Fall werden Maltodextrine über erleichterte Diffusion mit Hilfe des Proteins LamB durch die äußere Membran geschleust. Getrieben durch den Selektionsdruck einer nährstoffarmen Umgebung, in welcher *C. crescentus* lebt, kann im Lauf der Evolution aus dieser erleichterten Diffusionsaufnahme eine aktive, TonB-abhängige Substrataufnahme entstanden sein. Wird die bekannte Maltoseaufnahme von *E. coli* den hier gefunden Ergebnissen gegenüber gestellt, so ergibt sich für *C. crescentus* die im Folgenden beschriebene Maltoseaufnahme. Bei *E. coli* werden Maltose und größere Maltodextrine wie Maltopentaose und -hexaose über erleichterte Diffusion durch das LamB-Protein in das Periplasma transportiert. LamB ist ein spezifisches Porin mit einer Substratbindestelle. Maltose wird mit einem K_d -Wert von 200 μM an LamB gebunden (Benz *et al.*, 1987). Analog hierzu lässt sich das MalA-Protein bei *C. crescentus* in der äußeren Membran finden. Die Aufnahme von größeren Maltodextrinen erfordert hierbei das Zusammenspiel von MalA und des als Energielieferanten dienenden TonB-ExbB/D-Komplexes. Die genaue Struktur von MalA ist noch nicht bekannt. Einzelkanalmessungen an künstlichen Lipidmembranen wiesen auf ein porenbildendes, nicht TonB-abhängiges Protein hin. Auch die Substratbindung an MalA wies für einen TonB-abhängigen Rezeptor einen sehr niedrigen K_d -Wert von 0,2 μM auf. Hingegen wiesen Homologievergleiche und Computerberechnungen auf einen Aufbau aus 22 antiparallelen β -Faltblättern und einer globulären Korkdomäne hin, was neben dem Vorhandensein einer N-terminalen TonB-Box die Annahme stützt, dass es sich um einen TonB-abhängigen Rezeptor handelt. MalA enthält eine mutmaßliche Signalsequenz und ist in der äußeren Membran lokalisiert (Neugebauer *et al.*, 2005).

Im Periplasma werden bei *E. coli* die größeren Maltodextrine vermutlich über die periplasmatische Amylase MalS zerkleinert und auf diese Weise für den

Transport über die Cytoplasmamembran vorbereitet. Bislang konnte diese Vermutung experimentell nicht bestätigt werden. Das Fehlen des *malS*-Gens zeigte in *E. coli* keinen Einfluß auf das Wachstum mit höheren Maltodextrinen. In dem Gencluster um *malA* von *C. crescentus* codiert ein Gen laut Datenbank für eine α -Glucoamylase. Dieses Protein besitzt eine typische Signalsequenz für den Export. Da im Medium keinerlei Amylaseaktivität zu finden ist wird angenommen, dass dieses MalS-Protein bis in das Periplasma transportiert wird. Auch bei *C. crescentus* zeigte eine chromosomale Deletion von *malS* keine Auswirkungen auf das Wachstum (3.4.1.2). Der Versuch eine *malS*-Deletionsmutante aus *E. coli* RD58 mit dem *Caulobacter malS*-Gen zu komplementieren wurde aufgegeben, da bereits die Mutante RD58 keinen veränderten Phänotyp gegenüber dem Wildtyp aufwies (3.4.1.3). Radioaktive Maltosetransportmessungen mit SL2282 zeigten ebenfalls keinen Effekt auf die Aufnahme von Maltose (3.4.1.1). Die Aufnahmegeschwindigkeit der ^{14}C -Maltose von SL2282 entsprach der Aufnahmerate des Wildtyps UJ2602. Die Aufnahme eines größeren Moleküls wie bspw. Maltotetraose erfolgt vor allem über MalA und ein Transport über die CM sollte für dieses Molekül mit 667 Da erschwert sein. Die *malS*-Deletionsmutante SL2282 zeigte in einem ^{14}C -Maltotetraosetransport tatsächlich eine um 50 % verringerte Aufnahme der angebotenen Maltotetraose (3.4.1.1). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass größere Maltodextrine nach einer Spaltung im Periplasma leichter über die CM transportiert werden können. Es steht allerdings im Widerspruch zu den Wachstumsversuchen der *malS*-Mutante SL2282 auf höheren Maltodextrinen. Selbst bei Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose konnte dasselbe Wachstumsverhalten wie bei dem Wildtyp beobachtet werden. Vermutlich wird der im 3 min dauernden ^{14}C -Maltotetraosetransport beobachtete Effekt durch die lange Übernachtinkubation von SL2282 im Wachstumsversuch auf den Maltodextrinen verhindert. Eine gesicherte Aussage über die Funktion von *cc2282* läßt sich an Hand der hier durchgeführten Versuche nicht machen. Die komplementierte *malS*-Deletionsmutante SL2282pBB*malS* zeigte sowohl im ^{14}C -Maltosetransport und verstärkt im ^{14}C -Maltotetraosetransport eine verschlechterte Aufnahmefähigkeit.

In beiden Fällen war kaum ein Transport auszumachen (3.4.1.1). Durch das Einbringen des Wildtyp *malS*-Gens auf einem Mediumcopy Vektor wurde vermutlich zu viel Protein synthetisiert. MalS bindet wahrscheinlich an den äußeren Membranrezeptor MalA, so dass dieser von der periplasmatischen Seite verschlossen wird. Im ^{14}C -Maltotetraoseaufnahme-Experiment ist dieser Effekt eindeutiger zu sehen, da dieses Substrat für das Passieren der äußeren Membran den Rezeptor MalA stärker benötigt als Maltose. Dagegen konnte SL2282pBB*malS* ^{14}C -markiertes GlcNAc mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Transportrate aufnehmen, was zeigt, dass die Zellen durch die Überproduktion von MalS nicht generell geschädigt sind und die Hypothese der Bindung von MalS an MalA ermöglicht. GlcNAc wird nicht über MalA aufgenommen und wird aus diesem Grund von dessen Blockierung nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu stehen Wachstumstests der komplementierten Mutante SL2282pBB*malS*. Sowohl bei Maltose, Maltotriose-, -tetraose, -pentaose als auch -hexaose wurden keine Wachstumseinschränkungen beobachtet. MalA wird vermutlich nicht vollständig durch überschüssiges MalS blockiert, so dass während der langen Übernachtinkubation auch mit höheren Maltodextrinen ein Wachstum möglich war. Selbst in einer *malA*-Deletionsmutante ist nach einer Übernachtinkubation ein geringes Wachstum mit Maltotetraose zu beobachten (Neugebauer *et al.*, 2005). Nicht zu erklären war der verschlechterte ^{14}C -GlcNAc-Transport der Mutante SL2282. α -Amylasen spalten die α -(1-4)-Glykosidbindungen der Amylose, wodurch Dextrine und daraus Maltose, Glucose und verzweigte Oligosaccharide entstehen. GlcNAc besteht aus Glucosamin, einem Derivat der Glucose, dessen Hydroxygruppe am zweiten Kohlenstoffatom durch eine Aminogruppe substituiert ist. N-Acetyl- β -D-Glucosamin ist zudem noch am Stickstoffatom acetyliert. Zum einen sollte GlcNAc demnach von α -Amylasen nicht gespalten werden und zum anderen darf ein Fehlen des *malS*-Gens auch keinen Einfluß auf seine Aufnahme haben. Bei *E. coli* werden Maltose und Maltodextrine mit Hilfe eines ABC-Transporters über die Cytoplasmamembran (CM) transportiert. An diesem Transport sind die beiden integralen Membranproteine MalF und MalG sowie zwei Kopien des ATP-hydrolysierenden Proteins MalK beteiligt. Hingegen ist bei *C. crescentus*

vermutlich nur ein Protein an der Translokation der Maltose über die CM beteiligt. Ähnlich dem LacY-System aus *E. coli* weist dieses Protein eine Homologie zu H⁺/Zucker-Cotransportern auf. Diese Symporter nutzen die protonenmotorische Energie als treibende Kraft für den Transport über die CM. So wird bei der Lactoseaufnahme in *E. coli* ein Molekül Lactose mit einem Proton über den Symporter LacY in das Innere der Zelle transportiert. Da die CM für eine diffusionskontrollierte Aufnahme von Substraten undurchlässig ist, müssen alle Stoffe über bestimmte Transportsysteme aufgenommen werden. Nur so kann das bestehende Protonenpotential über der CM aufrechterhalten werden. Das voraussichtliche Transportergen *cc2283* in *C. crescentus* wurde chromosomal deletiert (3.4.2). Die Mutante SL2283 wurde anschließend auf ihre Maltoseaufnahmefähigkeit über einen radioaktiven Transport kontrolliert (3.4.2.1). Tatsächlich fand in dieser Mutante keine Aufnahme von ¹⁴C-markierter Maltose statt. Die Mutante SL2283 transportierte verglichen zur 100 %igen Transportrate des Wildtyps nur noch 1 % der ¹⁴C-Maltose. Die komplementierte Mutante SL2283pBB*malY* wies eine dem Wildtyp UJ2602 vergleichbare Transportrate auf. Die Transkription der Maltosegene wird in einer *malY*-Mutante wahrscheinlich nicht induziert, was zur Folge hat, dass Maltose auch via MalA nicht in das Periplasma transportiert wird. Tatsächlich häuft sich ¹⁴C-markierte Maltose in den *malY*-Mutanten in den Zellen nicht an. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Maltose durch den geöffneten MalA Kanal aus dem Periplasma wieder ausfließt. Der Kurvenverlauf im Transportversuch sollte in diesem Fall dem Ergebnis einer Anzucht unter nicht induzierenden Bedingungen entsprechen. Ein solcher Kurvenverlauf ist in Abbildung 21 in Kapitel 3.4.3.1 dargestellt. Verglichen zu einer Deletion von *malY* (*cc2283*) wird nach einer Anzucht mit Glucose noch wesentlich mehr Maltose aufgenommen. So könnten Maltosemoleküle unter nicht induzierenden Bedingungen vermutlich über Diffusion MalA-unabhängig die äußere Membran überwinden, um anschließend durch MalY in das Innere der Zellen transportiert zu werden. Daher kann eine geringe Transkription der *mal*-Gene stattfinden, wodurch wiederum einige MalA-Proteine in die äußere Membran eingebaut werden können und für eine effizientere Aufnahme von Maltose im ¹⁴C-

Transportversuch sorgen. Dagegen ist bei einer Deletion von *malY* keine intrazelluläre Maltose verfügbar und das *mal*-Operon ist dauerhaft blockiert. Auch das verlangsamte Wachstum der SL2283-Mutante auf M2-Agarplatten mit Maltose als einziger C-Quelle (Daten nicht gezeigt) stützt die Vermutung, dass die Transkription der Gene nach einer Deletion des mutmaßlichen Transportergens *cc2283* vollständig für den Maltosetransport blockiert wird. Diese Beobachtungen wurden auch in anderen Bakterien gemacht. So ist SuxC, das bei *Xanthomonas c.c.* für den Sucrosetransport verantwortliche Protein, in der CM. Nach einer Deletion von *suxC* erreichte die Transportrate lediglich noch 2,1 % der Wildtyptrate. Auch hier wird ein verlangsamtes Wachstum mit Sucrose als einziger C-Quelle beobachtet (Blanvillain *et al.*, 2007). Die Expression von SuxA, dem äußeren Membranrezeptor für Sucrose, konnte in einer *suxC*-Deletionsmutante bei keiner Sucrosekonzentration beobachtet werden. Dies spricht für ein vollständiges Fehlen des Induktors Sucrose im Zellinneren, wodurch das *sux*-Operon durch den Regulator SuxR dauerhaft blockiert wird. Somit gibt es bei *Xanthomonas c.c.* für Sucrose und bei *C. crescentus* für Maltose jeweils zwei unterschiedliche Wege um die äußere Membran zu passieren (durch Diffusion oder rezeptorvermittelt über SuxA bzw. MalA), jedoch nur einen Weg um die CM zu passieren (über SuxC bzw. MalY). Wird die Transportrate der Sucroseaufnahme bei *Xanthomonas c.c.* mit der Kinetik der Maltoseaufnahme bei *C. crescentus* verglichen, zeigt sich ebenfalls ein einheitliches Muster (Blanvillain *et al.*, 2007). Die Aufnahme der beiden Substrate Sucrose bzw. Maltose bildet eine biphasische Kinetik mit einer schnellen Anfangsphase und einem niederen K_d -Wert (0,033- bzw. 0,2 μM) gefolgt von einer langsameren Aufnahmerate und einem höheren K_d -Wert (0,59 – bzw. 0,54 μM). Diese Werte reflektieren die jeweilige Bindung der Substrate an den äußeren Membranrezeptor (SuxA bzw. MalA) und anschließend die Bindung an den Rezeptor der CM (SuxC bzw. MalY). Die selbe Kinetik wurde bereits bei der energieabhängigen Aufnahme von Vitamin B₁₂ über BtuB beobachtet (Kadner *et al.*, 1990). Auch in *H. pylori* konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden. Hier werden Nickelionen über das Transportprotein NixA in das Innere der Zellen transportiert. Eine *nixA*-

Deletionsmutante zeigte im sauren Milieu ebenfalls keine Transportaktivität mehr. Ohne intrazelluläre Nickelionen bleibt der Repressor NikR an den Operator gebunden und blockiert die Transkription der nachfolgenden Gene *tonB*, *exbB/D*, *frpB4* und *nixA* (Schauer *et al.*, 2007).

Bei *E. coli* werden die Gene des Maltoseoperons über eine positive Regulation durch den Aktivator MalT kontrolliert. MalT wird über einen Induktor aktiviert und stimuliert daraufhin die Transkription der *mal*-Gene durch die RNA-Polymerase. Als Induktor fungieren Maltotriose, ATP oder auch ADP. In der NCBI Datenbank wird das *Caulobacter crescentus* Gen *cc2284* als ein Transkriptionsregulator der LacI-Familie beschrieben. Der Repressor blockiert in Abwesenheit des Induktors die Expression seines Operons. Durch diesen Mechanismus wird bei *E. coli* bspw. das Operon der Lactoseverwertung reguliert. Um zu testen, ob CC2284 als Repressor in der Maltoseaufnahme fungiert, wurde das Gen *cc2284* chromosomal deletiert (3.4.3) und anschließend radioaktive Transportversuche mit SL2284 durchgeführt (3.4.3.1). In Abbildung 21 ist die Induktionsfähigkeit des Wildtyps UJ2602 nach einer Anzucht in Maltose bzw. unter nicht induzierenden Bedingungen nach einer Anzucht mit Glucose dargestellt. Eine drastische Abnahme der Transportfähigkeit ist zu beobachten, wenn der Induktor Maltose fehlt. Ist das Gen *cc2284* nicht vorhanden, kann auch unter nicht induzierenden Bedingungen eine sehr gute Transportfähigkeit der Mutante SL2284 beobachtet werden. Diese entspricht der Rate des Wildtyps nach einer Anzucht mit Maltose und somit einer Anzucht unter induzierenden Bedingungen. Daraus lässt sich schließen, dass *cc2284* für einen Repressor codiert, der ohne das Substrat Maltose die DNA-Bindungsstelle des *mal*-Operons für die RNA-Polymerase blockiert. Erst das Binden des Induktors Maltose an den Repressor löst in diesem eine Konformationsänderung aus, wodurch er die Bindung an die DNA verliert, abdissoziiert und so die RNA-Polymerase an den Promotorbereich binden kann, um die Gene des *mal*-Operons zu transkribieren. Für das Substrat Xylose wurde bei *C. crescentus* ebenfalls eine negative Regulation der Gene beschrieben (Stephens *et al.*, 2007). XylR ist in diesem Fall der Repressor des *xyl*-Operons. In Abwesenheit des Induktors Xylose ist die Expression des *xyl*-

Operons blockiert und wird erst nach Zugabe der Xylose wieder frei gegeben. In Anhang 10 ist das Alignment von XylR und Mall aus *C. crescentus* sowie des *E. coli* LacI-Repressors dargestellt. Sowohl in *C. crescentus* als auch in *Caulobacter sp.* K31 werden diverse Transkriptionsregulatoren der LacI-Familie (11- bzw. 15) zugeordnet. Bei *E. coli* hingegen wird die Xyloseverwertung über einen Aktivator reguliert. Auch für Sucrose ist bei *Xanthomonas c.c.* eine negative Regulation durch den Repressor SuxR beschrieben worden, welcher zur LacI/GalR Familie gehört. In seiner Abwesenheit werden auch bei *Xanthomonas c.c.* die Gene für die Sucroseaufnahme konstitutiv exprimiert (Blanvillain *et al.*, 2007). Dagegen werden die Gene des *sus*-Operons aus *B. thetaiotaomicron* über den Aktivator SusR reguliert. In Anwesenheit von Maltose und größeren Oligosacchariden steigt die Expression der *sus*-Gene durch eine verstärkte Bindung der RNA-Polymerase an die DNA an (Cho *et al.*, 2001). Im Transportversuch zeigte SL2284 nach einer induzierenden Anzucht in M2-Medium mit Maltose eine verschlechterte radioaktive Maltoseaufnahme. Die Transportrate entsprach der Rate des Wildtyps UJ2602 nach einer Anzucht in M2-Medium mit Glucose. Das Substrat Maltose scheint in Zellen, welche konstitutiv alle *mal*-Gene exprimieren eine Reaktion hervor zu rufen, die in einer verminderten Maltoseaufnahme resultiert. Eventuell sind in *C. crescentus* Regulationsmechanismen vorhanden, die bei einer hohen intrazellulären Maltosekonzentration zu einer verminderten Transkription der *mal*-Gene führen, um ein unnötiges Verschwenden an Energie und Molekülen zu verhindern. Eine Komplementation von SL2284 mit dem Wildtyp-Gen *cc2284* auf einem Mediumcopy Vektor verhinderte die Maltoseaufnahme komplett. Durch die Verwendung eines Mediumcopy Vektors wurde zu viel Repressor gebildet. So blieb der Promotor des *mal*-Operons für die RNA-Polymerase dauerhaft blockiert, und die Transkription der *mal*-Gene fand nicht statt. Es ist intrazellulär zu wenig Maltose vorhanden, um an die hohe Anzahl der Repressormoleküle zu binden, damit diese die Transkription der *mal*-Gene freigeben. Die Verwendung eines Lowcopy Vektors hätte die Situation *in vivo* wesentlich besser dargestellt.

In dem noch nicht vollständig sequenzierten Genom von *Caulobacter sp.* K31 (Stand: 2007) gibt es ein dem hier beschriebenen Maltoseaufnahmesystem von *C. crescentus* vermutlich analoges Aufnahmesystem. Es besteht aus den Genen *cd1143* - *cd1147*, welche gemäß Datenbank für eine Glucan 1,4- α -Glucosidase (*cd1143*), ein Transportprotein der MSF-1 Familie (*cd1144*), ein Regulatorprotein der LacI Familie (*cd1145*), eine α -Amylase (*cd1146*) sowie einen TonB-abhängigen Rezeptor (*cd1147*) codieren. In der homologen Region weisen MalS zu CD1143 und MalY zu CD1144 eine 80 %ige Identität auf. Zu CD1145 zeigt Mall in der homologen Region eine noch mal höhere Identität von 81 %. Das Rezeptorprotein CD1147 besitzt in der homologen Region zu MalA eine Identität von 81 %. Eine Anzucht in M2-Medium mit Glucose und mit Maltose, nachfolgende 2-D-Gel-Analysen sowie eine MALDI-TOF-Auswertung könnten Aufschluß über die Funktion von CD1147 geben. Durch chromosomale Deletion der Gene, anschließende Wachstumstests sowie radioaktive Transportmessungen könnten die jeweiligen Funktionen der Gene näher charakterisiert werden. Maltose ist in der natürlichen Umgebung beider *Caulobacter*stämme als Abbauprodukt der Stärke vorhanden und wird vermutlich von beiden Stämmen über ein konserviertes Aufnahmesystem in die Zelle transportiert. Wie bei *C. crescentus* liegen auch bei *Caulobacter sp.* K31 die Gene für die mutmaßliche Glucosidase, den Transporter sowie die Amylase in einer Leserichtung, während der mutmaßliche Regulator und der Rezeptor in entgegengesetzter Leserichtung angeordnet sind. Die schematische Anordnung beider Gencluster ist in Anhang 5 dargestellt.

4.3 Anpassung von *C. crescentus* an sein nährstoffarmes Habitat

Bakterien können Nischen mit extremen Umweltbedingungen bis hin zum lebenden Wirt besiedeln. Dies setzt eine enorme Anpassungsfähigkeit sowie situativ spezifische genetische Programme voraus. Es konnte gezeigt werden, dass Bakterien wie z.B. Extremophile oder obligate Parasiten, die in einer stabilen Umgebung leben eher kleine Genome und weniger Sensor- und

Regulatorgene als freilebende Bakterien besitzen, welche in wechselnden Umweltbedingungen leben müssen. Eine Analyse aus 226 Genomen Gram-negativer Bakterien zeigte nur bei wenigen Bakterien eine Überrepräsentation TonB-abhängiger äußerer Rezeptoren, wogegen es ein allgemeines Merkmal aller bisher sequenzierten *Xanthomonas*-Stämme ist. Gemeinsam ist all diesen Bakterien die Fähigkeit komplexe Kohlenstoffhydrate zu verwerten. Viele der bei *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gefundenen äußeren TonB-abhängigen Membranproteine sowie Loci der Kohlenstoffverwertung sind in aquatischen Bakterien der α - oder γ -Proteobakterien wie *C. crescentus*, *Colwellia psychrerythraea*, *Saccharophagus degradans*, *Shewanella* spp., *Sphingomonas* spp. oder *Pseudoalteromonas* spp. konserviert. Sie alle können diverse C-Quellen verwerten und zeigen eine hohe Zahl TonB-abhängiger Rezeptoren auf. Für 16 der TonB-abhängigen Rezeptoren aus *Xanthomonas* konnte die größte Übereinstimmung bei TonB-abhängigen Rezeptoren aus *C. crescentus* und *Caulobacter* sp. K31 gefunden werden. Das in *Xanthomonas* c.c. für den Xylosetransport über die äußere Membran verantwortliche TonB-abhängige Rezeptorprotein XCC2828 scheint auch bei *C. crescentus* vorhanden zu sein. So konnte für den von *C. crescentus* mutmaßlichen äußeren TonB-abhängigen Rezeptor CC0999 eine Induzierbarkeit durch Xylose nachgewiesen werden (Hottes *et al.*, 2004). In der homologen Region sind sich XCC2828 und CC0999 zu 41 % identisch und zu 57 % homolog. Ebenso scheint XCC4120, ein weiteres äußeres TonB-abhängiges Rezeptorprotein aus *Xanthomonas*, mit CC2823 aus *C. crescentus* homolog zu sein (43 % Identität; 58 % Homologie). Beide Gene werden ebenfalls durch Xylose induziert. Auch im umgekehrten Fall scheint der in *C. crescentus* beschriebene und in dieser Arbeit näher charakterisierte *mal*-Locus in *Xanthomonas* konserviert zu sein. So zeigt das durch Maltose induzierbare, TonB-abhängige Membranprotein XCC2469 aus *Xanthomonas* eine Ähnlichkeit zu MalA (37 % Identität; 55 % Homologie). Benachbarte Gene von XCC2469 codieren für eine mutmaßliche Glucanotransferase, 2 α -Amylasen, einen Zuckertransporter sowie einen Repressor. In *Xanthomonas* c.c. werden nach *Bacteroides* sp. und *S. degradans* die meisten Gene gefunden, welche im Polysaccharidmetabolismus

beteiligt sind. Die beschriebenen Loci für die Kohlenstoffverwertung (Maltose, Xylose) sowie die äußeren TonB-abhängigen Rezeptoren sind nicht mit denen aus *B. thetaiotaomicron* verwandt, was auf eine konvergente Evolution der TonB-abhängigen äußeren Rezeptoren in Proteobakterien und Bacteroides hinweist. In *B. thetaiotaomicron* wird die bislang höchste Anzahl TonB-abhängiger Membranproteine vorhergesagt (Blanvillain *et al.*, 2007). In der hohen Menge von 67 vorhergesagten TonB-abhängigen spezifischen äußeren Membranrezeptoren und der geringen Anzahl an eher unspezifischen cytoplasmatischen Transportern in *C. crescentus* kann eine Adaption an die nährstoffarme Umgebung, in welcher dieses Bakterium zu finden ist, gesehen werden. Eine hohe Affinität der TonB-abhängigen Rezeptoren für ihr jeweiliges Substrat erlaubt es *C. crescentus* durch eine hocheffiziente Substrataufnahme in nährstoffarmen Gebieten zu leben. Somit ist vorstellbar, dass der Selektionsdruck, hervorgerufen durch eine geringe Kohlenstoffversorgung in diesen Habitaten, aus einer erleichterten Maltoseaufnahme bei *E. coli* in *C. crescentus* zu einer effektiveren Aufnahme über TonB-abhängige Rezeptoren der äußeren Membran geführt hat. Nach einer experimentellen Anzucht in nährstoffreichem Medium werden sowohl bei *C. crescentus* als auch bei *Xanthomonas c.c.* die meisten der vorhergesagten TonB-abhängigen Rezeptoren nicht exprimiert. Das Vorhandensein dieser zahlreichen TonB-abhängigen Rezeptoren unter nährstoffarmen Bedingungen verschafft dem oligotrophen Bakterium *C. crescentus* Zugang zu vielen Kohlenstoffen, auch bei geringer Konzentration. Schon die Genomanalyse von Niermann *et al.* 2001 sagte viele Gene voraus, die am Abbau und dem Transport von Polysacchariden in *C. crescentus* beteiligt sind. So konnte die Aufnahme von Maltose über den TonB-abhängigen Rezeptor MalA in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Ebenfalls wird für die Substrate Xylose und Sucrose, wie auch in *Xanthomonas c.c.*, ein ähnlicher Aufnahmeweg über TonB-abhängige Rezeptoren in *C. crescentus* vermutet (Blanvillain *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei mutmaßliche TonB-Proteine des Bakteriums *C. crescentus* beschrieben. Nur TonB1 konnte eine Funktion

zugeordnet werden. Weder TonB2 noch TonB3 zeigten einen Einfluß auf die Maltoseaufnahme in *C. crescentus*. Die Aufnahme von GlcNAc hingegen blieb TonB1 unabhängig. Somit scheint TonB1 nicht universell den Transport von vielen Substraten zu energetisieren. Vielmehr hat sich das Bakterium gut an seine vorwiegend nährstoffarme Umgebung angepasst, indem es verschiedene C -Quellen nutzen kann und hierfür spezielle TonB-abhängige Rezeptoren nutzt (MalA, NagA), welche vermutlich von verschiedenen TonB-Proteinen „bedient“ werden. Chu *et al.* postulierte 2007, dass in einem Organismus mit mehreren TonB-Proteinen diese jeweils nur eine geringe Anzahl äußerer Membrantransporter bedienen können. So besitzt *V. anguillarum* kaum äußere Membranrezeptoren und zwei TonB-Proteine, von denen nur eines das Siderophor Anguibactin transportieren kann. In einem Organismus mit nur einem TonB-Protein und vielen TonB-abhängigen Rezeptoren wurde dagegen vermutet, dass dieses TonB-Protein verschiedene Rezeptoren bedienen kann. Da neben dem in der Datenbank vorhergesagten mutmaßlichen TonB2-Protein in *C. crescentus* mit TonB1 mindestens noch ein zweites TonB-Protein existiert, kann diese Aussage nicht anhand von *C. crescentus* belegt werden. Für welche Substrate TonB2 und TonB3 verantwortlich sind, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. TonB1 zeigte bisher nur für Maltose, nicht jedoch für GlcNAc eine Spezifität. Es ist allerdings auch für TonB1 nicht auszuschließen, dass weitere Rezeptoren über dieses Protein mit Energie versorgt werden können. Weshalb manche TonB-Proteine ein breites Spektrum an äußeren Membranrezeptoren mit Energie versorgen können und andere TonB-Proteine nur sehr selektiv bestimmte Rezeptoren bedienen können, bleibt ungeklärt. Auch für das TonB1 aus *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass es nicht an alle Rezeptorproteine aus *V. cholerae* binden kann und auch TonB-abhängige Rezeptorproteine aus *E. coli* nicht erkannt werden (Postle und Kadner, 2003).

Caulobacter crescentus hat neben der hohen Anzahl TonB-abhängiger Membranrezeptoren noch eine andere Strategie für das Überleben in nährstoffarmen Habitaten entwickelt. Wagner *et al.* konnten 2006 zeigen, dass das Bakterium seinen Stiel unter Phosphatmangel für eine effizientere

Aufnahme dieses Substrats nutzen kann. Seit langem ist bekannt, dass *C. crescentus* unter Phosphatmangel verlängerte Stiele ausbildet. Allerdings konnte bislang kein Phosphat-abhängiges äußeres Rezeptorprotein in den Stielen gefunden werden. Auch ein Fehlen des ExbB-Proteins in der CM der Stiele spricht gegen eine TonB-abhängige Aufnahme von Phosphat in den Stielen von *C. crescentus*. Da die Stiele durch ihre Verlängerung ein kleines Volumen bei einer großen, dünnen Oberfläche darstellen, wird eine diffusionskontrollierte Aufnahme von Phosphat über eventuell hochspezifische Porine in die Stiele des Bakteriums erleichtert. Über eine weitere Diffusion des aufgenommenen Phosphats im gemeinsamen Periplasma von Stiel und Zellkörper kann das Substrat schließlich über ABC-Transporter in der CM des Zellkörpers aufgenommen werden. Während in der CM der Stiele keine Proteine für einen Transport über die CM lokalisiert sind, sind dort jedoch viele periplasmatische Proteine wie bspw. das Phosphat-Bindeprotein PstS vorhanden. Diese können das aufgenommene Phosphat effizient binden und den Transportproteinen in der CM des Zellkörpers zuführen.

Eine Anpassung an bestimmte Umweltsituationen bzw. besondere Habitate kann bei zahlreichen Bakterien beobachtet werden. So wird z.B. bei *H. pylori* der TonB-ExbB/D Komplex bei verschiedenen pH-Werten von unterschiedlichen Substraten genutzt, was eine Anpassung an den wechselnden pH-Wert im Magen, dem natürlichen Habitat von *H. pylori*, widerspiegelt. Bei pH 7 wird der Energietransduktionskomplex für die Aufnahme von unlöslichem Eisen genutzt, während bei einem pH-Wert von 5 dieselbe energieliefernde Maschinerie für die Aufnahme des nun dringend benötigten Nickels genutzt wird. Schauer *et al.* postulieren sogar das Vorkommen eines Nickelophors analog den bekannten Eisensiderophoren in *E. coli* (Schauer *et al.*, 2007).

Auch die Möglichkeit, bei geringer Nahrungskonzentration Substrate effizienter aufnehmen zu können, ist in vielen Bakterien zu beobachten. So kann Sucrose in *Xanthomonas c.c* bei einer hohen Konzentration diffusionsabhängig die äußere Membran passieren, während das äußere Rezeptorprotein SuxA unter

Sucrose-mangel für dessen rasche Aufnahme verantwortlich ist. Ebenso kann Maltose bei *C. crescentus* in die Zelle diffundieren und somit ein langsames Wachstum erlauben, während das Substrat bei Maltose-mangel über MalA effizienter aufgenommen wird. Allerdings sprechen Wachstumsversuche einer *nagA*-Deletionsmutante gegen das Vorhandensein von Porinen in der äußeren Membran von *C. crescentus*. Fehlt das Rezeptorprotein NagA in der äußeren Membran, findet kein Wachstum auf GlcNAc mehr statt (3.5.2.1 und 4.5). Für Maltose wird daher die Aufnahme nicht über Porine, sondern über Transportproteine mit einer geringen Effizienz für Maltose vermutet (Eisenbeis *et al.*, 2008). Diese Beobachtung stimmt mit der Genomanalyse von *C. crescentus* durch Nierman *et al.* überein. Schon damals konnte kein OmpF-Porintyp in *C. crescentus* gefunden werden, dafür jedoch bis zu 65 bzw. 67 TonB-abhängige Rezeptoren. Für einen oder mehrere dieser Rezeptoren wird eine geringe Spezifität für Maltose bis hin zur Maltotetraose vermutet, da eine *malA*-Deletionsmutante auch noch mit Maltotetraose ein Wachstum zeigte. Das von Neugebauer *et al.* postulierte Vorkommen von Porinen in der äußeren Membran von *C. crescentus* wird daher in Frage gestellt.

4.4 Hypothese zur Maltodextrinaufnahme

Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Daten sowie den erhaltenen Ergebnissen von Neugebauer *et al.* (2005) werden Maltose und Maltodextrine wie in Abbildung 27 schematisch dargestellt und in Kapitel 4.2 diskutiert, aufgenommen. Vermutlich steht dieser Aufnahmeweg exemplarisch für eine Vielzahl weiterer Substrate in *C. crescentus* und anderen Bakterien. So kann die Aufnahme von Maltose in *C. crescentus* in vielerlei Hinsicht (4.2 und 4.3) mit der Aufnahme von Nickel in *H. pylori* und Sucrose in *Xanthomonas c.c.* verglichen werden. Analog zu MalA werden FrpB4 und SuxA in der äußeren Membran vermutet, während NixA, SuxC als auch MalY in der Cytoplasmamembran vermutet werden. NixR und SuxR fungieren wahrscheinlich wie Mall als Repressor.

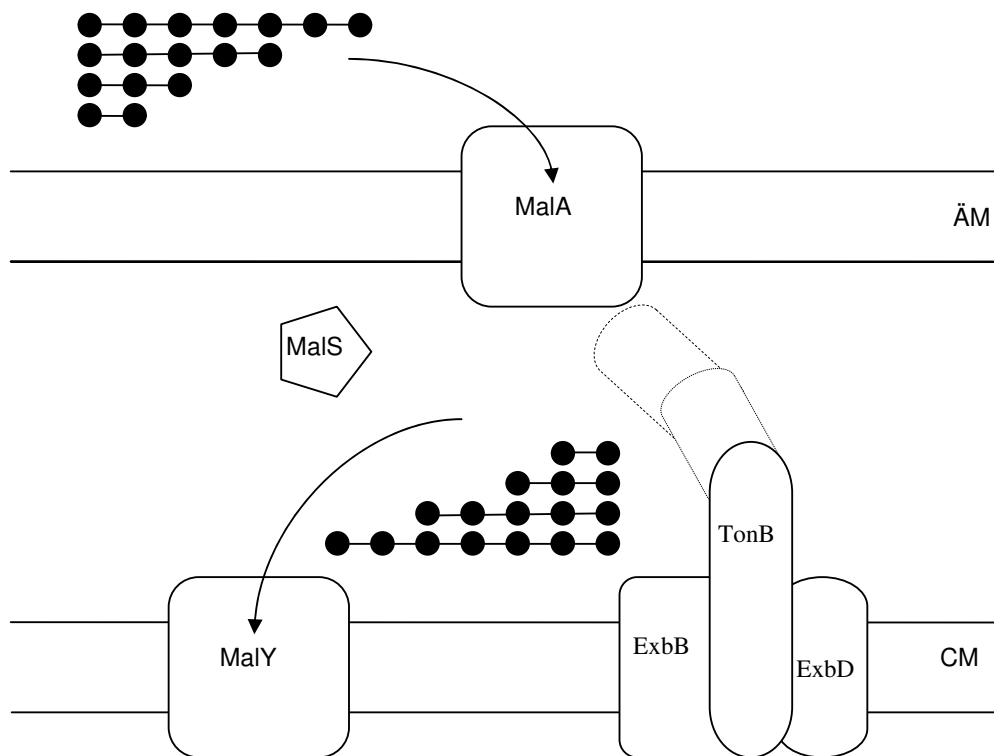


Abb. 27: Hypothetische Maltoseaufnahme in *C. crescentus*

Maltodextrine werden über MalA (CC2287) durch die äußere Membran geschleust; im Periplasma durch MalS (CC2282) gespalten und über MalY (CC2283) in das Innere der Zelle transportiert. Der Energietransduktionskomplex TonB-ExbB/D (CC2334a; CC2336; CC2335) liefert die nötige Energie für den Transport über die äußere Membran.

4.5 GlcNAc-Aufnahme über NagA

Ähnlich der näher beschriebenen Maltoseaufnahme in *C. crescentus* werden auch das Substrat N-Acetyl- β -D-glucosamin so wie dessen höhere Homologe (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ über einen äußeren Membranrezeptor NagA in das Periplasma der Zellen transportiert (Eisenbeis, 2006). Eine *nagA*-Deletionsmutante konnte auf den Substraten GlcNAc, (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ nicht wachsen. Auch ein Transport mit ¹⁴C-markiertem GlcNAc schlug in dieser Mutante fehl. Eine mit dem Wildtypgen *cc0446* (*nagA*) komplementierte Mutante erreichte wieder Wildtypwachstum und -Transport, was die

Abhängigkeit des Transports und des Wachstums mit GlcNAc an NagA bewies. Eine ExbB/D-Abhängigkeit für die GlcNAc-Aufnahme konnte in der Diplomarbeit von S. Eisenbeis (2006) durch Wachstumsversuche nachgewiesen werden. Die Beteiligung eines TonB-Proteins an der Aufnahme dieser Substrate konnte damals nicht gezeigt werden. Eine TonB2-Deletionsmutante zeigte immer Wildtypverhalten.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von TonB1, TonB2 und TonB3 auf die Aufnahme von GlcNAc und seine höheren Homologen getestet. Eine Funktion von TonB3 sowie ein mögliches Zusammenwirken von TonB2 und TonB3 in der Aufnahme dieser Substrate konnte durch Transportmessungen mit ^{14}C -markiertem GlcNAc und Wachstumstests in M2-Medium mit GlcNAc, $(\text{GlcNAc})_3$ und $(\text{GlcNAc})_5$ als einziger C-Quelle ausgeschlossen werden (3.1.4.1, 3.1.5.1 und 3.5.1). Auch TonB1 spielt in der Aufnahme von GlcNAc und höheren Chitinoligosacchariden keine Rolle. Sowohl radioaktive Transportmessungen mit ^{14}C -markiertem GlcNAc als auch Wachstumstests mit SL2334a zeigten bezüglich der GlcNAc-, $(\text{GlcNAc})_3$ - und $(\text{GlcNAc})_5$ -Aufnahme immer Wildtypverhalten (3.3.1.1 und 3.5.1). Eine TonB1/TonB2-Mutante transportierte ^{14}C -markiertes GlcNAc wie der Wildtyp (3.3.3.1). Ein Fehlen der *exbB/D*-Gene zeigte im radioaktiven Transportversuch ebenfalls keinen Effekt auf die Aufnahme von GlcNAc. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten der Wachstumsversuche. So zeigte eine chromosomale *exbB/D*-Mutante auf M2-Agarplatten weder mit GlcNAc noch mit höheren Chitinoligosacchariden ein Wachstum. Ein Wachstum derselben Mutante konnte allerdings in Flüssigkultur mit GlcNAc als einziger C-Quelle nachgewiesen werden. Eine dem Wildtyp UJ2602 vergleichbare Wachstumsrate konnte jedoch nicht erreicht werden. Eventuell gibt es in der Aufnahme von GlcNAc einen Unterschied zwischen dem Wachstum auf Platte und dem Wachstum in Flüssigkultur. Möglicherweise ist die Versorgung mit GlcNAc in Flüssigkultur durch das ständige Schütteln der Kulturen effizienter als in „fester“ Umgebung bei einem Wachstum auf Platte. Die Wachstumsversuche einer ExbB/D-Mutante sprechen für eine energieabhängige Aufnahme von GlcNAc und insbesondere dessen höhere Homologe. Da davon ausgegangen

wird, dass der Transport von GlcNAc über die CM mit Hilfe des PTS-Systems in *C. crescentus* abläuft, konnten ^{14}C -Transportversuche mit CCCP durchgeführt werden. CCCP bringt das Membranpotential zum Erliegen, so dass Transportvorgänge, welche das elektrochemische Potential der CM nutzen, blockiert werden. CCCP reduzierte den ^{14}C -markierten GlcNAc-Transport auf 24 % der Wildtyptrate, was ebenfalls für eine TonB-ExbB/D-abhängige Aufnahme spricht (Eisenbeis *et al.*, 2008). Bei *E. coli* wurde allerdings nach einer CCCP-Zugabe eine geringe Reduzierung der GlcNAc-Aufnahme über das PTS-System beobachtet. Eine Komplementation der *exbB/D*-Gene durch *tolQ/R*, welche in *E. coli* die Funktion von *exbB/D* teilweise übernehmen können, wurde von Neugebauer *et al.* bereits 2005 für den Maltosetransport in *C. crescentus* ausgeschlossen. Der Funktionsverlust nach einer Deletion von *exbB/D* im Maltosetransport und -Wachstum konnte durch die vorhandenen Gene *tolQ/R* nicht ersetzt werden. In dem Genom von *C. crescentus* ist ein *tol*-Gencluster mit gleicher Anordnung der Gene wie in *E. coli* vorhergesagt (*pal*, *tolB*, *tolA*, und *tolR/Q* codiert durch *cc3229-cc3233*). Der Versuch *tolQ/R* chromosomal zu deletieren schlug fehl (Neugebauer *et al.*, 2005), was ein Indiz für die Funktion des *tol*-Clusters in der Stabilität der äußeren Membran, analog der Funktion in *E. coli*, sein mag.

Da für die Aufnahme von ^{14}C -markiertem GlcNAc im Transportversuch weder eine TonB-Abhängigkeit für eines der getesteten TonB-Proteine noch eine ExbB/D-Abhängigkeit festgestellt werden konnte, scheint die Aufnahme von GlcNAc von der TonB-ExbB/D-abhängigen Maltoseaufnahme in *C. crescentus* zu differieren. Die NagA-Deletionsmutante konnte auf GlcNAc nicht wachsen, während eine MalA-Deletionsmutante auf Maltose wachsen konnte. Für das Substrat GlcNAc ist die Aufnahme immer an NagA gebunden. Eine diffusionskontrollierte Aufnahme über unspezifische Porine, wie sie in einer *malA*-Deletionsmutante vermutet wurde, scheint damit unwahrscheinlich. Vermutlich kann Maltose bei einer Deletion von MalA über andere weniger affine Transportproteine aufgenommen werden. Ob die Aufnahme von $(\text{GlcNAc})_{n>1}$ über NagA durch erleichterte Diffusion oder mit Hilfe des TonB-ExbB/D-Komplexes erfolgt, muß genauer untersucht werden. ^{14}C -

Transportversuche mit höheren Chitinoligosacchariden wie (GlcNAc)₃ und (GlcNAc)₅ sollten sowohl die TonB- als auch die ExbB/D-Abhängigkeit genauer definieren können. Auch ein Wachstumsversuch mit SL9 ($\Delta cctonB2$ und $\Delta cctonB1$) auf höheren Chitinoligosacchariden könnte Klarheit bringen. Eventuell wirken hier auch die TonB-Proteine TonB1 und TonB3 zusammen, so dass eine Deletion der Gene *cc2334a* und *cc3508* einen Effekt auf die GlcNAc-Aufnahme zeigen würde. Möglicherweise zeigt erst eine Tripelmutation aller hier beschriebenen mutmaßlichen TonB-Proteine einen Effekt in der GlcNAc-Aufnahme. Unter Umständen sind auf dem Genom von *C. crescentus* noch weitere, bisher unbekannte TonB- bzw. TonB-ähnliche Proteine lokalisiert.

Weiterhin sollten Einzelkanalmessungen mit NagA an künstlichen Membranen Aufschluß über einen eventuell TonB-abhängigen Rezeptor geben (3.5.4). Im Fall TonB-abhängiger Proteine, die in Abwesenheit von TonB geschlossene Kanäle bilden, kann keine Leitfähigkeit der Proteine in künstlichen Membranen gemessen werden. Dies konnte für den TonB-abhängigen Rezeptor FhuA bei *E. coli* gezeigt werden (Killmann *et al.*, 1993). Klassische Diffusionsporine von *E. coli* wie bspw. OmpF, OmpC und PhoE sowie das für die erleichterte Diffusion von Maltodextrinen zuständige Maltoporin LamB bilden dagegen einen offenen Kanal aus und weisen bei Leitfähigkeitsmessungen eine stufenartige Leitfähigkeitserhöhung auf (Benz *et al.*, 1985, Benz *et al.*, 1986). Das mittels SDS aus der äußeren Membran herausgelöste und über Ni-NTA-Spin-Säulen gereinigte NagAHis₆ integrierte in die künstliche Lipid-Doppelmembran aus Diphytanoyl- Phosphatidylcholin (DiphPC) und bildete einen Ionen-permeablen Kanal. Es konnte eine Zunahme der Leitfähigkeit gemessen werden (Abb. 26). Falls NagA die Funktion eines TonB-abhängigen Rezeptors besitzt, hätte keine Leitfähigkeit beobachtet werden dürfen.

Die gemessene Leitfähigkeit ist vermutlich auf Porinverunreinigungen des *E. coli* Produzentenstammes zurückzuführen, da der KCl-Fluss durch GlcNAc nicht gehemmt werden konnte und das Leitfähigkeitsprofil Porin-ähnlich war (Abb. 25). Wird davon ausgegangen, dass NagA während der Messung in seiner nativen Form vorgelegen hat, würde dies bedeuten, dass es sich bei

NagA um keinen TonB-abhängigen Rezeptor handelt, sondern ein kanalbildendes Porin darstellt. Eventuell bildet NagA einen instabilen Kanal, in dem die sehr großen freien „loops“ in den Kanal rein und wieder raus schwingen und dadurch die Leitfähigkeitsmessung beeinflussen. Bei *E. coli* wird in FepA der größte Loop aus 37 AS gebildet, während bei NagA die 4 größten Loops durch 89-, 65-, 62- und 54 AS gebildet werden. Um Messartefakte auszuschließen sollten künftig Einzelkanalmessungen mit aufgereinigten NagA-Proteinen durchgeführt werden, die mit einem milderen Detergenz (LDAO) aus der äußeren Membran gelöst wurden und in *E. coli* BL21 omp8 degP überexprimiert wurden. Eventuell führte das in dieser Arbeit verwendete, relativ starke Detergenz SDS zu einer Konformationsänderung von NagA, die eine Permeabilität für Ionen gewährleistete und somit zur Leitfähigkeitserhöhung führte. Die Effizienz der Expression von NagAHis₆ ist in einer *E. coli* degP-Mutante wesentlich höher als in *E. coli* BL21 omp8. Wie in Abbildung 24 zu erkennen, wurde NagAHis₆ in *E. coli* BL21 omp8 fast vollständig abgebaut bzw. nicht korrekt in die äußere Membran eingebaut. Bei den verwendeten Proben handelt es sich somit sehr wahrscheinlich um denaturierte Abbauprodukte von NagAHis₆ bzw. um ein nicht korrekt gefaltetes NagAHis₆-Protein. Idealerweise hätte das direkt aus *C. crescentus* gereinigte NagA in Einzelkanalmessungen untersucht werden müssen. Wahrscheinlich kann NagA aus der äußeren Membran von *C. crescentus* mit milderen Detergenzien nativ isoliert werden, im Gegensatz zur Löslichkeit der „inclusion bodies“ in *E. coli*. Eine anschließende Porenleitfähigkeitsmessung hätte somit unter nativeren Bedingungen durchgeführt werden können. Auf eine Klonierung und Expression von NagA in *C. crescentus* wurde verzichtet, da bereits der Versuch MalA in *Caulobacter* zu exprimieren auf Grund mangelnder Klonierungseffizienz fehlschlug (Neugebauer, 2004).

NagA bildet wohl eine permanent geöffnete Pore mit einer hohen Spezifität für GlcNAc und dessen höhere Homologe. Eine verstärkte Bindung der größeren Substrate an NagA erfordert vermutlich Energie für deren Freilassung sowie Energie für eine Bewegung des Korken innerhalb des β -Barrels, um die Porenöffnung für ein Passieren der Substrate zu vergrößern. Möglicherweise

kann GlcNAc durch erleichterte Diffusion über NagA die äußere Membran passieren, während höhere Chitinoligosaccharide energieabhängig über NagA aufgenommen werden. Die ExbB/D-Proteine sind daher nicht zwingend für die GlcNAc-Aufnahme nötig, gewinnen jedoch in der höheren Chitinoligosaccharidaufnahme zunehmend an Bedeutung.

5 Zusammenfassung

Es konnte bewiesen werden, dass *Caulobacter crescentus* sowohl auf Maltodextrinen als auch auf Chitinoligosacchariden als einziger C-Quelle wachsen kann. Beide Substrate induzieren jeweils die Expression eines äußeren Membranproteins, welches als MalA- bzw. NagA bezeichnet wird. Eine energieabhängige Aufnahme dieser Substrate konnte über *exbB/D*-Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Dagegen zeigte ein Fehlen des vorhergesagten *tonB*-Gens keinen Einfluß auf das Wachstum oder den Substrattransport beider Stoffe (Neugebauer *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde nach einem zweiten *tonB*-Gen auf dem Chromosom von *C. crescentus* gesucht, dessen Deletion einen Einfluß auf die Maltose- bzw. GlcNAc-Aufnahme besitzt.

Der äußere Membranrezeptor MalA besitzt die TonB-Box-Sequenz EEVVIT, von der eine Bindung an das TonB-Protein vorhergesagt wird. Wurde die Aminosäure Valin an Position 15 in der TonB-Box gegen die AS Prolin ersetzt, wurde der Maltosetransport blockiert. Über Sequenzanalysen konnte ein weiteres *tonB*-Gen gefunden werden, welches von *cc2334a* codiert wird und dessen Fehlen den Transport von Maltose ebenfalls verhindert.

Die Analyse des Genclusters um *malA* wurde mit Hilfe von chromosomalen Deletionsmutanten charakterisiert. Das MalY-Protein (CC2283) codiert für ein Transportprotein in der Cytoplasmamembran, das den Transport von Maltodextrinen vermutlich über einen Ionen-gebunden Mechanismus realisiert. Die Repression des *mal*-Locus konnte dem Protein Mall (CC2284) zugeordnet werden. Eine chromosomale Deletion von *mall* zeigte dieselbe Transportrate unter nicht induzierenden Bedingungen wie der Wildtyp unter induzierenden Bedingungen. Die Funktion des MalS-Proteins (CC2282) konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Fehlende Amylaseaktivität im Medium und eine vorhergesagte Signalsequenz weisen auf ein Wirken dieses Proteins im Periplasma hin. Ein Fehlen von *malS* zeigte nur im radioaktiven Maltotetraose-Transport eine verringerte Aufnahme verglichen zur Wildtyp Transportrate.

Für die Aufnahme von GlcNAc und dessen höhere Homologe konnte keine TonB-abhängige Aufnahme nachgewiesen werden. Vermutlich stellt NagA für GlcNAc eine spezifische Pore und für größere Chitinoligosaccharide einen Transporter dar. Die strikte Aufnahme von GlcNAc durch NagA schließt das Vorhandensein unspezifischer Porine aus. Wahrscheinlich werden die meisten Substrate energieabhängig über die äußere Membran von *C. crescentus* transportiert.

6 Literatur

Agabian, N. und Unger, B. 1978. *Caulobacter crescentus* cell envelope: Effect of growth conditions on murein and outer membrane protein composition. *J. Bacteriol.* **133**: 987-994

Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., Croughan, T.P. 1995. New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in Gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1053-1055

Andrews, S.C., Robinson, A.K. und Rodriguez, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 215-237

Bassford, P.J., Jr., Bradbeer, C., Kadner, R.J., and Schnaitman, C.A. 1976. Transport of vitamin B12 in *tonB* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**: 242-247

Benz, R., Janko, K., Boos, W., und Luger, P. 1978. Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **511**: 305-319

Benz, R., Schmid, A. und Hancock, R.E.W. 1985. Ion selectivity of Gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.* **162** (2): 722-727

Benz, R., Schmid, A. Nakae, T., und Vos-Scheperkeuter, G.H. 1986. Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J. Bacteriol.* **165**: 978-986

Benz, R., Schmid, A., Vos-Scherperkeuter G.H. 1987. Mechanism of sugar transport through the sugar-specific LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane. *J. Membr. Biol.* **100**: 21-29

Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S., und Lloubes, R. 1998 *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**: 4872-4878

Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E., Arlat, M. 2007. Plant carbohydrate scavenging through tonB – dependent receptors : a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE* v.2(2): e224

Blattner, F.R., Plunkett, G. III, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., und Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277**: 1453-1474

Boos, W. and Shuman, H. 1998. Maltose/Maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62 (1)**: 204-29

Braun, V., und Wolff, H. 1973. Characterization of the receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *E. coli* B. *FEBS Lett.* **34**: 77-80

Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., und Hartmann, A. 1976. Functional organization of the outer membrane of *Escherichia coli*: phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. *J. Supramol. Struct.* **5**: 37-58

Braun, V., und Herrmann, C. 1993. Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol. Microbiol.* **8**: 261-268

Braun, V. 1994. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 295-307

Braun, T.F., Poulson, S., Gully, J.B., Courtney Empey, J., van Way, S., Putnam, A., und Blair, D.F. 1999. Function of prolin residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3542-3551

Braun, V., Bös C., Braun M. und Killmann H. 2001. Outer membrane channels and active transporters for the uptake of antibiotics. *J. Infect. Diseases.* **183**: 12-16

Braun, V und Endriß, F. 2001. Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals.* **20(3-4)**: 219-131

Braun, V., und Hantke, K. 2007. Aquisition of iron by bacteria. In: Molecular Microbiology of Heavy metals. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2007. *Microbiol Monogr.* **(6)**: 189-219

Buchanan, S.K. 1999. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 455-461

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

Busch, W. und Saier, M.H. 2002. The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**: 287-337

Cadieux, N., und Kadner, R.J. 1999. Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 10673-10678

Cao, Z., Warfel, P., Newton, S.M.C. und Klebba, P.E. 2003. Spectroscopic observations of ferric enterobactin transport. *J. Biol. Chem.* **278**: 1022-1028

Carter, D. M., Gagnon, J-N., Mandava, M. D. S., Makowski, L., Rodi, D. J., Pawalek, P. D. und Coulton, W. 2006. Phage display reveals multiple contact sites between FhuA, an outer membrane transporter of *Escherichia coli*, and TonB. *J. Mol. Biol.* **357**: 236-251

Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J.N. und Lloubes, R. 2000. Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane Pal proteins in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **38**: 904-915

Cascales, E., Lloubes, R., und Sturgis, J.N. 2001. The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol. Microbiol.* **42**: 795-807

Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J.N. und Lloubes, R. 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J. Bacteriol.* **184**: 754-759

Chang, C., Mooser, A., Pluckthun, A. und Wlodawer, A. 2001. Crystal structure of the dimeric c-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.* **276**: 27535-27540

Cheng, Q., Yu, M.C., Reeves, A.R., und Salyers, A.A. 1995. Identification and characterization of a bacteroides gene, *csuF*, which encodes an outer membrane protein that is essential for growth on chondroitin sulfate. *J. Bacteriol.* **177**: 3721-3727

Chimento, D.P., Mohanty, A.K. Kadner, R.J. und Wiener, M.C. 2003. Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 394-401

Cho, K. H. und Salyers A.A. 2001. Biochemical analysis of interactions between outer membrane proteins that contribute to starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **183**: 7224-7230

Chu, B.C, Peacock, R.S. und Vogel, H. 2007. Bioinformatic analysis of the TonB protein family. *Biometals.* **20**: 467-483

Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Gosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., und Rosenbusch J.P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* **358**: 727-733

Dagert, M. und Ehrlich, S.D. 1979. Prolonged incubation in calcium-chloride improves the competence of *Escherichia coli*. *Gene* **6**: 1879-1886

Davis, G. S., Flannery, E. L., Mobley und H. L. 2006. *Helicobacter pylori* HP1512 is a nickel-responsive NikR-regulated outer membrane protein. *Infect immune.* **74**: 6811-6820

Delcour, A.H., 2003. Solute uptake through general porins. *Front. Biosci.* **8**: d1055-71

Derouiche, R., Benedetti, H., Lazzaroni, J.C. Lazdunski, C., und Lloubes, R. 1995. Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 11078-11084

Dutzler, R., Wang, Y.F., Rizkallah, P., Rosenbusch, J.P., und Schirmer, T. 1996. Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure.* **4**: 127-134

Edwards, P., und Smit, J. 1991. A transducing bacteriophage for *Caulobacter crescentus* uses the paracrystalline surface array. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 399-413

Eisenbeis, S. 2006. Identifizierung eines N-Acetyl-Glucosamin-spezifischen Transportproteins in der äußeren Membran von *Caulobacter crescentus*. Diplomarbeit, Eberhardt-Karls-Universität, 2006

Ernst, F. D., Stoof, J., Horrevoets, W. M., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. Und Vliet, A. H. 2006. NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immuno.* **74**: 6821-6828

Evinger, M. und Agabian, N. 1977. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.* **132**: 294-301

Fecker, L., und Braun, V. 1983. Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **156**: 1303-1314

Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W. Diederichs, K., und Welte, W. 1998B. Siderophore mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science.* **282**: 2215-2220

Ferguson, A.D., Ködding, J., Walker, G., Bös, C., Coulton, J.W., Diederichs, K., Braun, V., und Welte, W. 2001A. Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer membrane protein FhuA. *Structure.* **9**: 707-716

Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., van der Helm, D., und Deisenhofer, J. 2002. Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science.* **295**: 1715-1719

- Fsihi, H., Kottwitz, B., und Bremer, E. 1993.** Single amino acid substitutions affecting the substrate specificity of the *Escherichia coli* K-12 nucleoside-specific Tsx channel. *J. Biol. Chem.* **268**: 17495-17503
- Gaspar, J.A., Thomas, J.A., Marolda, C.L., und Valvano, M.A. 2000.** Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol. Microbiol.* **38**: 262-275
- Gudmundsdottir, A., Bell, P. E., Lundrigan, D., Bradbeer, C. und Kadner, R. J. 1989.** Point mutations in a conserved region (tonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B₁₂ transport. *J. Bacteriol* **171**: 6526-6533
- Hanahan, D. 1983.** Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166: 557
- Hardesty, C., Ferran, C., and DiRienzo, J.M. 1991** Plasmid – mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli*: characterization of scrY, the structural gene for a phosphoenolpyruvat – dependent sucrose phosphotransferase system outer membrane porin. *J. Bacteriol* **173**: 449-456
- Hartmann, A., Fiedler, H.P., und Braun, V. 1979.** Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **99**: 517-524
- Heller, K., und Kadner, R.J. 1985.** Nucleotide sequence of the gene for the vitamin B₁₂ receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**: 904-908
- Heller, K., Kadner, R. J., Günther, K. 1988.** Suppression of the *btuB*451 mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and the TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64** (1): 147-153

Hottes, A.K., Meewan, M., Yang, D., Arana, N., Romero, P., McAdams, H.H., und Stephens, C. 2004. Transcriptional profiling of the *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J. Bacteriol.* **186**: 1448-1461

Huang, B., Ru, K., Yuan, Z., Whitchurch, C. B., und Mattick, J.S. 2004. *tonB3* is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J. Bacteriol.* **186**: 4387-4389

Ireland, M. M. E., Karty, J.A., Quardokus, E.M., Reilly, J.P., und Brun, Y.V. 2002. Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. *Mol. Microbiol.* **45**: 1029-1041

Jenal, U., und Fuchs, T. 1998. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.* **17**: 5658-5669

Kadner, R.J. 1990. Vitamin B₁₂ transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Mol. Microbiol.* **4**: 2027-2033

Kampfenkel, K., und Braun, V. 1992. Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J. Bacteriol.* **174**: 5485-5487

Kampfenkel, K., und Braun, V. 1993. Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 6050-6057

Keyhani, N.O. und Roseman, S. 1997. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, by expressing the cel operon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 1436-14371

Killmann, H., Benz, R., und Braun, V. 1993. Conversion of the FhuA transport protein into a diffusion channel through the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 3007- 3016

Kim, I., Stiefel, A., Plantör, S., Angerer, A. und Braun, V. 1997. Transcription induction of the ferric citrate transport genes via the N-terminus of the FecA outer membrane protein, the Ton system and the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane. *Mol. Microbiol.* **23(2)**: 333-344

Klebba, P.E., und Newton, S.M.C. 1998. Mechanisms of solute transport through the outer membrane proteins: burning down the house. *Curr. Biol.* **1**: 238-248

Koebnik, R., Locher, K.P. und van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**: 239-253

Larsen, R.A., Myers, P.S., Skare, J.T., Seachord, C.L., Darveau, R.P., und Postle, K. 1996. Identification for TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J. Bacteriol.* **178**: 1363-1373

Larson, R.A. und Postle, K. 2001. Conserved residues Ser¹⁶ and His²⁰ and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB, and the ability of TonB to respond to proton motive force. *J. Biol. Chem.* **276**: 8111-8117

Larson, R.A., Letain, T.R. und Postle, K. 2003. *In vivo* evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **49 (1)**: 211-218

Larson, A.L., Deckert, G.E., Kastead, K.A., Devanathan, S., Keller, K.L. und Postle, K. 2007. His²⁰ provides the sole functionally significant side chain in the essential TonB transmembrane domain. *J. Bacteriol.* **189**: 2825-2833

Lazdunski, C.J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Lloubes, R., und Benedetti, H. 1998. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **180**: 4993-5002

Lazzaroni, J.C., Vianney, A., Popot, J.L., Benedetti, H., Samatey, F., Lazdunski, C., Portalier, R., und Geli, V. 1995. Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J. Mol. Biol.* **246**: 1-7

Letain, T.E., und Postle, K. 1997. TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **24**: 271-283

Létoffé, S., Delepelaire, P. und Wandersman, C. 2004. Free and hemphore-bound heme acquisition through the outer membrane receptor HasR have different requirements for the TonB-ExbB-ExbD complex. *Journal of Bacteriology* **186**: 4067-4072

Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J.P. und Moras, D. 1998. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**: 771-778

Lundrigan, M.D., und 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. *J. Biol. Chem.* **261**: 10797-10801

Maier, C., Bremer, E., Schmid, A., und Benz, R. 1988. Pore-forming activity of the Tsx protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Demonstration of a nucleoside-specific binding site. *J. Biol. Chem.* **263**: 2493-2499

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, H. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratories, New York

Matsushiro, A. 1963. Specialized transduction of tryptophan markers in *E. coli* K12 by bacteriophage phi-80. *Virology* **19**: 475-482

McAdams, H.H., und Shapiro, L. 2003. A bacterial cell-cycle regulatory network operating in Time and Space. *Science* **301**: 1874-1877

Mey, A.R. und Payne, S.M. 2002. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Molecular Microbiology* **42(3)**: 835-849

Moeck, G.S., Coulton, J.W. und Postle, K. 1997. Cell envelope signaling in *Escherichia coli*. Ligand binding to the ferrichrome-iron receptor FhuA promotes interaction with the energy-transducing protein TonB. *J. Biol. Chem.* **272**: 28391-28397

Moeck, G.S., und Coulton, J. W. 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**: 675-681

Mourino, S., Osorio, C.R., und Lemos, M.L. 2004. Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **186**: 6159-6167

Nau, C.D., und Konisky, J. 1989. Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J. Bacteriol.* **171**: 1041-1047

Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A. und Braun, V. 2005. ExbB/D-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **187**: 001-0021

Newton, S.M., Igo, J.D., Scott, D.C., und Klebba, P.E. 1999. Effect of loop deletions on the bindings and transport of ferric enterobactin. *Mol. Microbiol.* **32**: 1153-1165

Nierman, W.C., Feldblyum, T.V., Laub, M.T., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Eisen, J. et al. 2001. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4136-4141

Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 3905-3908

Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J., und Payne, S.M. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **29**: 1493-1507

Ogierman, M, und Braun, V. 2003. Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *J. Bacteriol.* **185**: 1870-1885

Patzer, S.I. 1999. Regulation durch Metallionen in *Escherichia coli*, insbesondere Identifizierung und Charakterisierung des hochaffinen Zink-Aufnahmesystems ZnuABC und des zinkabhängigen Regulators Zur. *Dissertation*, Universität Tübingen

Paulsen, I. T., Nguyen, L., Rabus, R. und Saier, M. H., Jr. 2000. Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen procaryotes. *J. Mol. Biol.* **301**: 75-101

Pawelek, P. D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C. M., Khursigara, Moiseeva, M., Allaire, M. und Coulton, J.W. 2006. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* **312**: 1399-1402

Peacock, R.S., Weljie, A.M., Howard, S.P., Price, F.D. Und Vogel, H.J. 2005. The solution structure of the c-terminal domain of *tonB* and interaction studies with TonB box peptides. *J. Mol. Biol.* **345**: 1185-1197

Peacock, R.S., Andrushchenko, V.V., Demcoe, A.R., Gehmlich, M., Lu, L.S., Herrero, A.G. und Vogel, H.J. 2006. Characterization of TonB interactions with FepA cork domain and FecA N-terminal signaling domain. *Biometals* **19(2)**: 127.142

Phadke, N.D., Molloy, M.P., Steinhoff, S.A., Ulintz, P.J., Andrews, P.C., und Maddock, J.R. 2001. Analysis of the outer membrane proteome of *Caulobacter crescentus* by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **1**: 705-720

Poindexter, J. S., 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol. Rev.* **28**: 231-295

Poole, K., Zhao Q., Neshat S., Heinrichs D. E., und Dean C. R. 1996. The *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology.* **142**: 1449-1458

Postle, K. 1990. TonB and the gram-negative dilemma. *Mol. Microbiol.* **4**: 2019-2025

Postle, K. 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomemb.* **25**: 591-601

Postle, K., und Kadner, R.J. 2003. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**: 869-882

- Prentki, P. und Krisch, H.M. 1984.** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313
- Pressler, U., Staudenmaier, H., Zimmermann, L., und Braun, V. 1988.** Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 2716-2724
- Prilipov, A., Phale, P.S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J.P. und Koebnik, R. 1998.** Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**: 65-72
- Reeves, A.R., D'Elia, J.N., Frias, J., Salyers, A.A. 1996.** A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. *J. Bacteriol.* **178**: 823-830
- Reeves, A. R., Wang, G-R., Salyers, A. A. 1996.** Characterization of four outer membrane proteins that play a role in utilization of starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **179**: 643-649
- Sabarth, N., Hurvitz, R., Schmidt, M., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Meyer, T. F. Und Bumann, D. 2005.** Identification of *Helicobacter pylori* surface proteins by selective proteinase K digestion and antibody phage display. *J Microbiol Methods* **62**: 345-349
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook, H., Fritsch, E.H., und Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.

Sauer, M., Hantke, K., und Braun, V. 1987. Ferric-coprogen receptor FhuE of *Escherichia coli*: processing and sequence common to all TonB-dependent outer membrane receptor proteins. *J. Bacteriol.* **169**: 2044-2049

Schalk, I.J., Yue, W.W. und Buchanan, S.K. 2004. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Molecular Microbiology*. **54(1)**: 14-22

Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A. und Reuse de, H. 2007. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular biology* **63**: 1054-1068

Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., und Rosenbusch, J.P. 1995. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514

Schirmer, T. 1997. General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct. Biol.* **121**: 101-109

Schneider, H., Fsihi, H., Kottwitz, B., Mygind, B., und Bremer, E. 1993. Identification of a segment of the *Escherichia coli* Tsx protein that functions as a bacteriophage receptor area. *J. Bacteriol.* **175**: 2809-2817

Schöffler, H. and Braun, V. 1998. Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 378-383

Schulz, G.E. 2000. β -barrel membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 443-447

Shapiro, L., McAdams, H.H., und Losick, R. 2002. Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science* **298**: 1942-1946

Shultis, D. E., Purdy, M. D., Branchs, C. N. und Wiener, M. C. 2006. Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* **312**: 1396-1399

Stephens, C., Christen, B., Watanabe, K., Fuchs, T. und Jenal, U. 2007. Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. *J. Bacteriol.* **189** (24): 8828-34

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O. et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964

Sturgis, J.N. 2001. Organisation and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 113-122

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., et al. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547

Torres, A.G., Redford, P., Welch, R.A. und Payne, S.M. 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect. Immun.* **69** (10): 6179-85

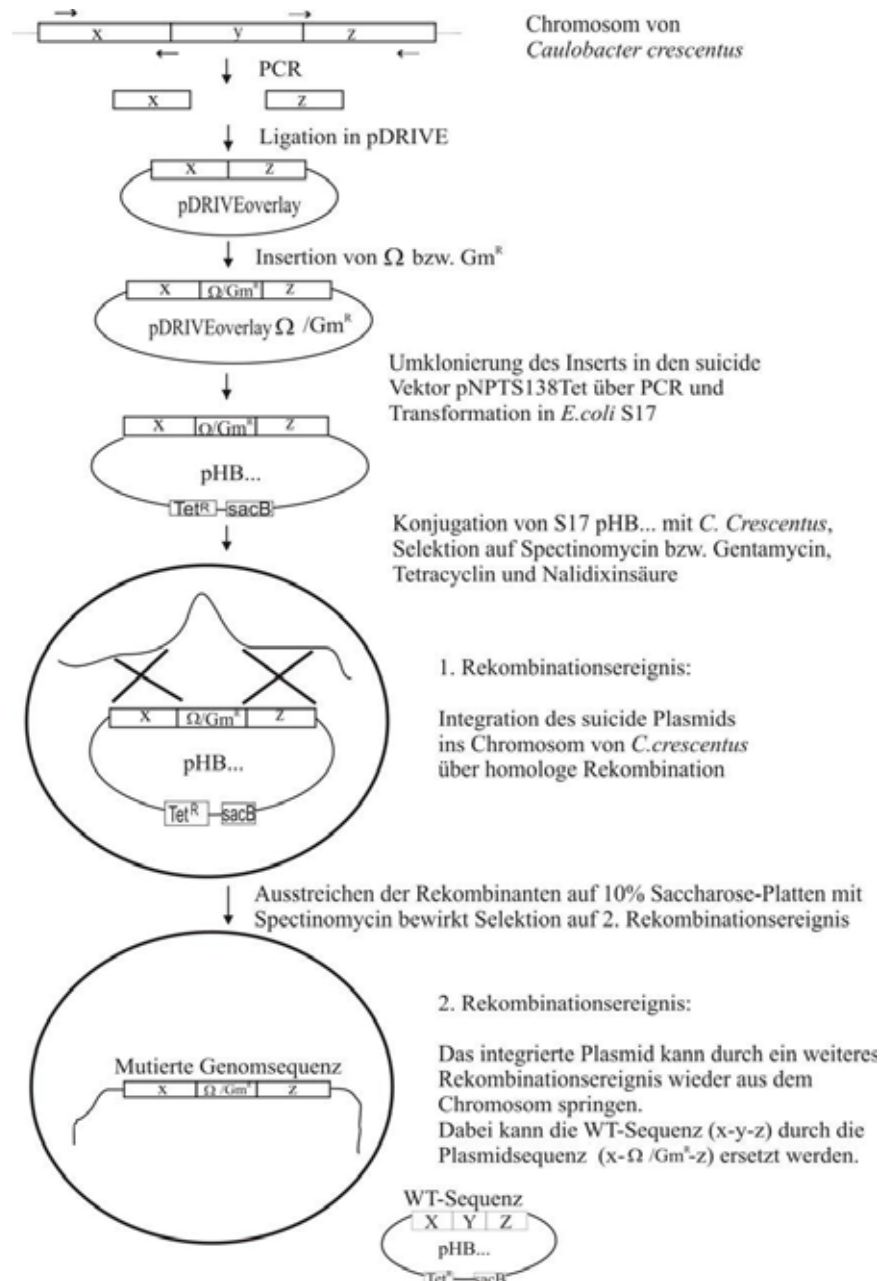
Traub, I., Gaisser, S. und Braun, V. 1993. Activity domains of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* **8**(2): 409-423

Van Gelder, P. Dumas, F., Bartoldus, I., Saint, N., Prilipov, A., Winterhalter, M., Wang, Y., Philippsen, A., Rosenbusch, J.P., und Schirmer, T. 2002. Sugar transport through maltoporin of *Escherichia coli*: role of the greasy slide. *J. Bacteriol.* **184**: 2994-2999

- Wagner, J.K., Setayeshgar, S., Sharon, L.A., Reilly, J.P. und Brun, Y.V. 2006.** A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions. *pnas* **103**: 11772-11777
- White, J.C., Di Girolamo, P.M., Fu, M.L., Preston, Y.A. und Bradbeer, C. 1973.** Transport of Vitamin B₁₂ in *Escherichia coli*. *J. of Biol. Chem.* **248**: 3978-3986
- Wiener, M.C. 2005.** TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 394-400
- Wyckoff, E.E., Mey, A.R. und Payne, S.M. 2007.** Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals*. **20(3-4)**: 405-416
- Zhai, Y. F., Heijne, W. Und Saier, M. H. jr. 2003.** Molecular modeling of the bacterial outer membrane receptor energizer, ExbBD/TonB, based on homology with the flagellar motor, MotAB. *Biochim. Biophys. Acta* **1614(2)**: 201-210
- Zhao, Q., und Poole, K. 2000.** A second *tonB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the *exbB* and *exbD* genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**: 127-132
- Zhou, J., Lloyd, S., und Blair, D. 1998a.** Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6436-6440

7 Anhang

Anhang1: Knockout-Mutanten in *C. crescentus*



Schematische Darstellung der Herstellung der chromosomalen Knockout-Mutanten in *C. crescentus* „y“ bezeichnet das deletierte Gen, „x“ und „z“ die jeweils angrenzenden Genabschnitte.

Anhang 2: codierende Gene in der Region von *cc3508* bei *C. crescentus*

cc3504 = Peptidase der M13-Familie

cc3505 = hypothetisches Protein

cc3506 = Transkriptionsregulator der AraC-Familie

cc3507 = Transkriptionsregulator der Blal-Familie

cc3508 = hypothetisches Protein

cc3509 = hypothetisches Protein

cc3510 = Transkriptionsregulator der LysR-Familie

cc3511 = ATP Phosphoribosyltransferase

cc3512 = ATP Phosphoribosyltransferase; regulatorische Untereinheit

Anhang 3: codierende Gene in der Region von *cc2334* bei *C. crescentus*

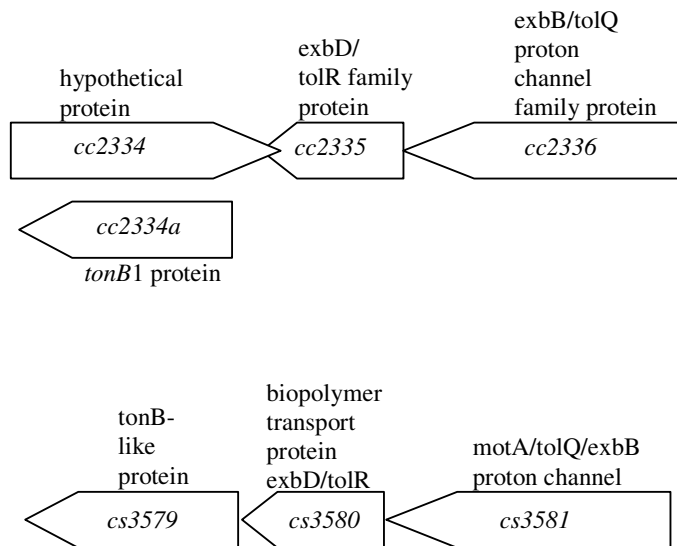
cc2330 = transcriptional regulator, Cro/C1 family

cc2331 = DNA-binding protein HU

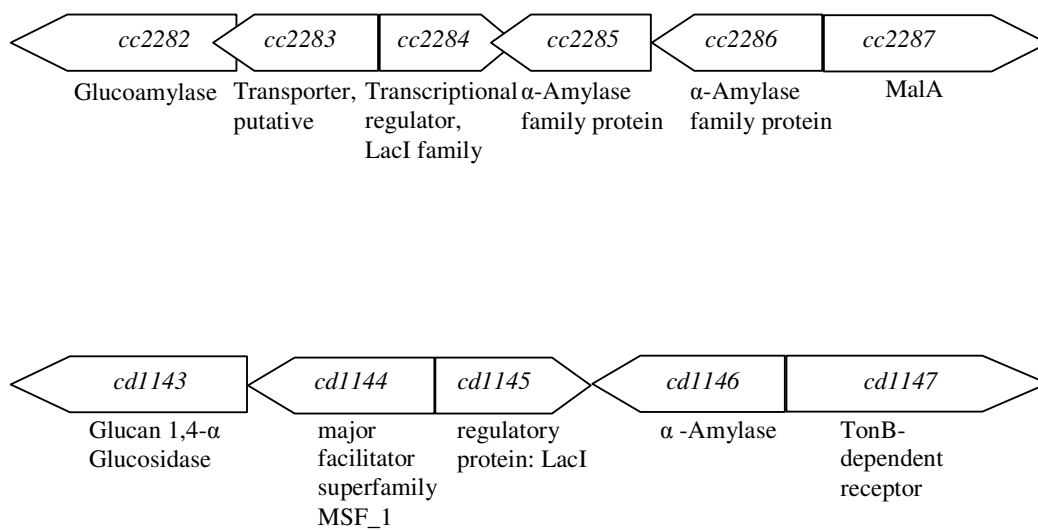
cc2332 = hypothetical protein

cc2333 = phage SPO1 DNA polymerase-related protein

Anhang 4: Genanordnung in der Region von *cc2334* bzw. *cc2334a* bei *C. crescentus* und *cs3579* bei *Caulobacter* sp. K31 (*cc2334* und *cc2335* überlappen)



Anhang 5: Gencluster um *MalA* in *C. crescentus* sowie analoges Gencluster in *Caulobacter* sp. K31; Stand: 2007 (*cc2282* und *cc2283* so wie *cc2284* und *cc2285* überlappen)



Anhang 6: Sequenzvergleich von EcMa1S aus *E. coli* und CcMa1S aus *C. crescentus*

CcMa1S	MRTLKTFALASAATLIATAAQAAPTTWAYSAKTGVGASYEAYVDGAYKAGGKTGAV	56
EcMa1S	-MKLAACFLTLLPGFAVAASWTSPGFPAFSEQG--TGTFVSHAQLPKGTRPLTLNF	53
	. * : * : . : . : * : * : * : * : * : . : * .	
CcMa1S	SKVWFSIADGVLTTETMYGLIHEAQIKQMRVAVETASGLAIEGADTTSKTEYLHVDA	112
EcMa1S	DQQCWQPADAIKLNQMLSLQPCSNTPPQWRLFRDGE-----YTLLQI	94
	. : . : * * : : * . * : : . . . : :	
CcMa1S	AGRPLSPAYKITTTDRQGRFVIEKRIFTDPDRNALFVRVTVTALKGAVTPTLLLEP	168
EcMa1S	DTRSGTPTLMISIQNAAEPVASLVRECPKWDGLPLTVDVVSATFPEGAAVRDYYSQ-	149
	* . : * : * : : . . * . . * . * * * : * : * * . : :	
CcMa1S	HMANTGGGDVGAASASALTAHEGKAFLSLKASKPFAKASASVLKDGDALAALKATT	224
EcMa1S	QIAIVKNGQIMLQPAATSNGLLLLLERAETDTSAPFDWHNATVY-----	192
	: : * . . * : : . * : : : * * * . * : *	
CcMa1S	TSAKGAIVLAGELPKVAKSETFDVVIGFGADAKAADRTAAATLKTGYAEVLARYNG	280
EcMa1S	-----FVLTDRLFENGDP SN--DQSYGRHKDGM AEIGTFHGGDLRGLTNKLDYLQQ	240
	: * : . : : : * : * * * . * * * . * : : * : :	
CcMa1S	EGAHVGWEDYLASLNELPRLRDASEDGGKLLQASALMLKVQEDRTYAGALIASLSN	336
EcMa1S	LGVNALWIS--APFEQIHGWVGSGTKG-----DFPHYAYHGYTTQDWTNLDA	285
	* . . . * . . * : : : : * : : * : * : . * .	
CcMa1S	PWGD TVDATKSSTGYKAVWPRDFYQCAMALAALGDKETPLAAFHLYLPTVQVGPKTG	392
EcMa1S	NMGNEADLRTLVD SAHQRGIRILFDVVMNHTGYAT-LADM QEYQFGALYLSGDEVK	340
	* : . * . . : * : : . * . . : : : : . * : .	
CcMa1S	PNKGDGGWFLQKSHVDGTP EWVGVQLDQTAMPIMLGWKLWTGWLPDAELKAFY GK	448
EcMa1S	KSLGER-WSDWKPAAG--QTWHSFN-DYINFSDKTGWDKWWGKNWIRTDIGDYDNP	392
	. * : * * . . . * . : : * . . * * . * : : : .	
CcMa1S	MLKPAADFLVKGKVNLDWNTATITPPTQQERWEEQGGHSPSTTA AVIAGLVVAG	504
EcMa1S	GFDDL TMSLAFLPDIKTESTASGLPVFYKN-----KMDTHAKAIDGYTPRDYLTH	443
	: . : * . . : : . * : * * : : . . . : . . : :	
CcMa1S	DIAEAAGDAGSAELYRKTADDCAGKLEARMVTTKGTFGDGHYYLRLNSDQDPNNKS	560
EcMa1S	WLSQWVRDYGIDGFRVDTAKHVLP AWQQLKTEAS-----AALREWKKAN	488
	: : . * * : . * * . : : * . : : : : .	
CcMa1S	PVEARNGQAPVAEDKMLDAGFLELVRYGVRRADDPAILASLPEIDDEALEDLYRVR	616
EcMa1S	PDKALDDKPFWM TGEAWGHGVMQSDYY--RHGFDAMINF DYQEQA AKAVDCLAQMD	542
	* : * : . . . : . . * : : * * . * . * : * : * : :	
CcMa1S	YSFTFP GVEGSFPGWRRYGV DGYGEDTKTGANYGADNQM RPGQRGRVWPIFTGERG	672
EcMa1S	T--TWQQMAEKLQGFNVLSYLSSH DTRLFREGGDKAAELLLLAPG-AVQIFYGDES	595
	* : : . : * . . . : . . : : * . * * * : .	
CcMa1S	HYELAVAGLSGKPDPTAVQKIRD TYVKAMELFANEGLMIPEQVWDGVGTDSAHGYV	728
EcMa1S	SRPFGPTGSDPLQGT RSDMNWDVSGKSAASVA-----HWQKISQFRARHPA	642
	: . : * . . . : : * . * : . * : : . * : .	
CcMa1S	RGEGTDSATPLAWSHA EYVKLLRSVSDGQVWDHYAPVKARYAR	771
EcMa1S	IGAGKQT TLLKQGYG----FVREHGDDKVLVWVAGQQ-----	676
	* * . : : * . . : : * . * . * : * : :	

Protein	Sequence	Position
NagA	----MKTIKSVLAAASASAMVVMIAAPAMASG-----GNEVEQVVITGIRASLLQSI	49
Mala	MNTQFSRRRAWLMAGGATGLALAFVAGSAQAQTTTTAAADDTKVEEVVITGIRAGLENSI	60
	:. * :.*.*::: :*... **:	
NagA	ESKRKADAIVDVVTAEDVGKFPSTNVAEALTIVPGVTVDFRAGQGEKVSILGTDPALNRT	109
Mala	ALKKQSTSIVEAISAEDIGKLPDTSIAESLARLPGLTAQRLDGRAQVISIRGLGPDFTST	120
	*::: **::::***:**.*.:***: :*:.*:* *::: **: * . * . *	
NagA	LLNGQTVASADWFILDSPGRTFNYALLAPQIVGKVDVYKSPEARIDEGSIGGTIVVNTRK	169
Mala	LLNGREQVST-----GDNRGVEFDQYPSEILSGVVYKTPDAGLIGQGLSGTADLRITR	174
	****: .*: . .* ::: :.:*:.* ***:*** : .:*. * .:*	
NagA	PLDLKSGTIAGAVSYLYTDRSKKGDQLQGSLLASWKNADSTFGASFISIQAEDQLRRD-GV	228
Mala	PLTYGKRILSANARYEMNSEKK-----LNPDAKDTGHRFSATYVNQFANDTVGLALAI	227
	** . :.: . ** * ..*::.*.*:: * **:* : .:	
NagA	ETYGTIAANQWAGGNPDNPVDSRTKGCVGSCASTLTANLGARSPNAFGASYFEQGRTRTT	288
Mala	SDISTPTQSKRFNAWGYPTINAANDRVIGGAKPYIQSNN-----LEFRFG	271
	. .* :.: . . :.:. . :*.. . :*	
NagA	YTTALQYKPNDQLSLEFNWLKIDADYDNTNQSMYAFQGNWTWNSLGALTGLTVNNGVVSKA	348
Mala	AIGVLEYKPNDKVTTSLDVYYSEFQEEQILRGIELPLQ--WSSATLQPTRTTTAGLITNG	329
	.*:*****:: :.: : : : :.: *	
NagA	SFNNALSVL--DVQHREAGLKSDTFHLKGGYKGDGWDLNGEVGKSTADG-GTKRQVFLEF	405
Mala	TFSGVGKVMRNDLNTRDRTLKSAGWNLN-YLTDNGWSLTTDLSSYSSADRTDVIFESYSGT	388
	:*... *: *: *: *** :*: :.:*. * .: .: ** * . : :	
NagA	LNWASYTVDISGAPKSPGSLTYTTNVLGNPS---AFATDPGWSGNLVSKPTSDEEKYAO	461
Mala	GPNGVGATDITLGFITTPGAGTMFASTLDYTDNRNQFKLTDPQGWGGGASGGALTQAGFYNT	448
	. :.* * ..:**: * :.*. . : : **.*. . . : : *	
NagA	FDFGKDFDGVIGRVQVGYKR--REHQTGQQYAGIAITGVAAPASSFNPSTVPSNYLKGF	518
Mala	PSITDELTAARFTAKRDLEWGPVKSVEFGLNASRREKDKEVHESFLTFGGRIAAGAPTSR	508
	:. :.: . . :. : : :. : * : : . : : :. . .	
NagA	DGVGTQMQRNFRIDGNAMVSYESGKWLAAGATMPKPSIFAAAEFTAGNWNIIQEDIDALY	578
Mala	AIPQEAIIIGVAKLDLIGIKAMLAYDPTYLLKNGFYTLIADANPAVQTRNWSVREDVQVAY	568
	: . :.* :. : : . : . * . . : **::*:::.*	
NagA	AQANFKADN---VRGNFGVRYVKTSVDSAGYVCKPGAACNKAADWSWKSTKKSVDNVLP	634
Mala	AKFGVDSQVGSIPVTGNFGLQVVRTDQFSKGVAVNP---SAPASPTVTDGAKYTYALP	624
	*: .: .: .: * ***: :*: * * * * : * : * : * * *	

```

NagA  SVNIIVDAREDVLVLRFAAAQVIARPNYSMTNYFWLSDG-----ILTGGGGNP 682
Mala  SLNLTFDAGNELYIRVGAARTLARARMDELRAQSFSNQNTSRLTSTDPNNSYFSANGGNP 684
      *:*: .** :*: :*.**::*:.. :*: :*: :*.****

NagA  ALEPYKSSNFNASAEWYFQPQAILSAEVFYKDISNYILQRTQPESYFN-----QS 732
Mala  NLRPYIADGVDDVAVEKYFGRSAYLSAAVYHKELSNFVNSNSSSYKDFSDYLFLLSTAQQA 744
      *.** :.....* ** . * *** *:***:***: ..... * . *:

NagA  QGKVTTYQISRPFNAGSAEVKGLAMAYQQT-----FGGGFGLLANYTYAD-----ASGQ 781
Mala  QLGTKIGLVSGPDNGDGGYIRGLELSASLQGELLWEPLKSFGLIISGSFTDSKVTLEKGT 804
      * .. :* * *.... :** :* . .***: . :*: * . *

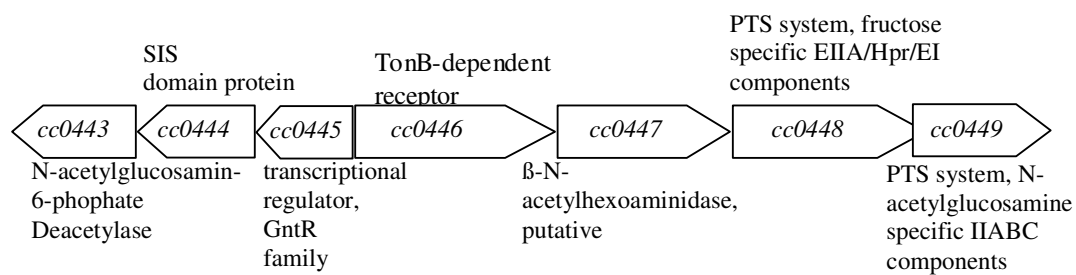
NagA  SGAPLPYSSKNQVNLSPFYENGPF SARATFTWRSKYFTGVD--RGDDMFVKA AKT--LDA 837
Mala  NPITIPGLSKTVVNTTFYYEKNGFNARISNRYRGKFLGEVAGLSAARVFRTVDKESVDA 864
      . .:* **. ** : :***. *.** : :*.***: * . :* .. * :**

NagA  TVGYAVTKN---ITMSLSGQNLLDSEYYAYAN--TTALPRGVYRTGRKLQATLNVA F 889
Mala  QIGYEFDRDGP MNGLSLLLQANNITNEPFKTYDNNDQRQTIDYQKYGATYMGVSYRF 921
      **: . . :*: *...*: :. : * * . . : * . . :. *

```

Sequenzvergleich von NagA und MalA aus *C. crescentus*. NagA bezeichnet das NagA-Protein (CC0446) aus *C. crescentus* und MalA das MalA-Protein (CC2287) aus *C. crescentus*.

Anhang 8: Gencluster um NagA in *C. crescentus* (cc0448 und cc0449 überlappen)



Anhang 9: Sequenzvergleich von MalA aus *C. crescentus* und FrpB4 aus *H. pylori*

MalA	MNTQFSRRRAWLMAGGATGLALAFVAGSAQAQTTTTAADDTKVEEVVITGIRAGLENSI	60
FrpB4	-----MLRNQFRIVFVSCIVASNLQAQETHTLG-----KVTTKGERTFEYNNK	44
	: : . : : * . . * * * * : . : * . . * * : *	
MalA	ALKKQSTSIVEAISAEDIGKLPDTSIAESLARLPGLTAQRLDGRAQVISIRGLGPDTST	120
FrpB4	MY-----IDRKELQQRQSNQIRDIFRTRADVNVASGGLMAQKIYVRGIESRLLRV	94
	* . : : : . . . * : : * * * : * : . : .	
MalA	LLNGREQVSTGDNRGVEFDQYPSEILSGVVVYKTPDAGLIGQGLSGTADLRITIRPLTYGK	180
FrpB4	TIDGVAQNGNIFHHDANTVIDPNMIKEVEVIKGAANASAGPGAVAGKLSFTTIDANDFLR	154
	: : * * . . : : : * . * . * : : : * . : : * . . : : *	
MalA	RILSANARYEMNSEKKLNPDAKDTGHRFSATYVNQFANDTVGLALAISSDISTPTQSKRFN	240
FrpB4	KNQTYGAKAEAAFYTNFGYRMNAT--AAYRGKNWDILAYYNHQNIFYRDGNNAFRN--VFH	212
	: : . * : * . : : : * : . . : : * . : * . . . : *	
MalA	AWGYPTINAANDRVIGGAKPYIQSNNLERFGAIGVLEYKPNKVTTSLDVYYSEFQEEQI	300
FrpB4	PN--YDLQDPSNSDMSVGTSEVNS-----VLAKINGYINETDSISVSYNLTRDNSTRL	264
	. * : : * . : * : . : : * . . . : : * : . : * : . : . : :	
MalA	LRGIELPLQWSSATLQPTRTTTAGLITNGTFSGVKGVMRNDLNTRDTTLKSAGWNLNYLT	360
FrpB4	LR--PNTTSALSKANDPGSQPAPFVIDFGKELAHTINFNHNLSLKYKHEGGPNFNPQPRVE	322
	** . . * : : * . . . : : * . . . : : * . . . : *	
MalA	DNGWSLTDDLSSYSSADRTDVIFESYSGTGPNGVGATDTLGFTTTPGAGTMFASTLDYTDR	420
FrpB4	STAF LGVRGGNYPVNVN--PFAYNSNEPANPDYIPEVKEWCNNPDNISQCTQGAIRPSNGG	381
	. . . : . . . * : : * . . : * : : . . . : . : . .	
MalA	NQFKLTDPQ--GWGGG--ASGGALTQAGFYNTPSITDELTAARFTAKRDLEWGPVKSVEF	476
FrpB4	YQIGYGTGPSINWQGTSDSSGGAQAGYGQLNAISTSANVYHGLVPKNPDYDTPPNAQNP	441
	* : * : . * * : * * * : * * : * : : . . : * : * : :	
MalA	GLNASRREKDKVHESFLTFGGRIAAGAPTSRAIPQEAIIGVAKLDLIGIKAMLAYDPTY	536
FrpB4	SANDWTLG--NADAEGTLARRIFLINSGVNFKVTHPISEDYGNVFHEYGMIYQNLVFSGLD	500
	. * : : . . : : * : * . . : * . * . : : : : . .	
MalA	LLKNGFYTLIADANPAVQTRNWSVREDVQVAYAKFGVDSQVGSIPVTGNFGLQVVRTDQF	596
FrpB4	KGKNGYYKNNIDPNDPNP--GLPYRHYYTDQSSQYPQNLNT--PNPLYRNMPQNSHAIGNI	558
	* * : * . * . . . * . : : : : . . . * : * : : . : :	
MalA	SKGVAVNPSAPASPTVTDDGAKYTYALPSLNLTFDAGNELYIRVGAARTLARARMDELRA	656
FrpB4	IGGFMQANYNILSNVIVGAGTRYDIYT--LLDKNGRTHVTSGFSPSATVLYNPIESIGL	615
	* . * . . . * : * * : : . . . : : * : : : :	
MalA	SQSFNQNTSRLTSTDPNNSYFSANGGNPNLRPYIADGVDVAVEKYFGRSAYLSAAVYHKE	716
FrpB4	KVSYAYVTKGALPGDGVLMRDPTVIYQRLRPAIGQNVEFNVD--FNSKYFNVRGAIFYQV	674
	. * : * . . * . : : : * * * * . . : * : : . : : * . : :	
MalA	LSNFVNSN--SSSYKDFSDYLFLLSTAQQAQLGTKIGLVSGPDNGDGGYIRGLELSASLQ	774
FrpB4	INNFINSYGQDTSKNGGGNATAKNMSGNLPETINIYGYEVSNGVRYKNFLGTFVSARSWP	734
	: . * * : * . : * . . : : : . : * . : : : : : *	
MalA	GELLWEPLKSFGLIIS--GSFTDSKVLTLEKGTNPITIPGLSKTVVNTTFYYEKNGFNARIS	833
FrpB4	TARGHLLADTYALAATTGNVFILKADYDVRWGLTTLTWSRFVTN--MYEY--YSIYYP	790
	. . . : * : * . . * . : : : * . * : * . * : * * : . . .	


```

Mala  NRYRGKFLGEVAGLSAARVFRTVDKESVVDAQIGYEFDRDGP MNGLSLLLQANNITNEPFK 893
FrpB4 QYGLIKIHKPGYGVHNVFINWTPPSKKWQGLRISAVFNN-ILNKQYVDQTSVFQASADAP 849
      :  * :      * : . : * . : . : * . * : : * : : : .

Mala  TYDNNDQRQTIDYQKYGATYMGVSYRF 921
FrpB4 ASDMIPK GKRMALPAPGFNARFEVSYQF 877
      : * : : : * . . * : *

```

Sequenzvergleich von Mala aus *C. crescentus* und FrpB4 aus *H. pylori*.
Mala bezeichnet das Mala-Protein (CC2287) aus *C. crescentus* und FrpB4 das FrpB4-Protein (HP1512) aus *H. pylori*.

Anhang 10: Sequenzvergleich von LacI aus *E. coli* und Mall aus *C. crescentus*

```

EcLacI -----MAKSDTGRKRVTLTDVARAAGVSKSTVSLVLNDSSLIK 38
CcMall MQSRTNRALWGSEKICRNLCIRGEFGVSKGATRLEDLAKLAGVSISTASRALNDSPAVN 59
      : : . . . : . * * : * : * : * : * : * : * : * :

EcLacI KETQQKVQQAIEQLGYVYNRFAANLRSQKSLTIGVVID-----DLINPFFAEFTMGL 90
CcMall KRTKQLIWKLAREMDYPFRRYMPAGPIGAEATIAIVTPRPQGRGSSMSDPFFLELLAGV 118
      * . * : : . . . * : * : . . * : * : . : : * : * : * :

EcLacI EMTLAEHGFI TVMSNTSQRSDRQKQVLDTLLEHHVAGIVLCPVNSTSEADLQRYANSST 149
CcMall GEAAERERGCDVILSHIAPT N--YDDLSEAMTTSRAEGVIFLGQ-SSLHAAFNRLAETEN 174
      : * : * . . . : : . . : : : . . * : : * : * : * : . .

EcLacI PLLITMRPLDWQQLPVDYVGVD SHAGVREATEYLIQQGHRDIVFIGG--LTHHMRYQG 205
CcMall RFVWVGAQLPDQNYCS--VGS DNMGGRRATLHLQRLGRKRIVFLGDTEAPEAMQRHRG 231
      : : * * : * * . * * . * : * : * : * : * : * : * :

EcLacI YLEAMNHGHLQPWSTDAFSLRAEPTQANGYQLMQQLLDMPSPPTAVICYNDLMAFGAES 264
CcMall YLDALEHAKLG--VDPDLIVPAHFEVESAEAAVDSLIHNGITFDGVVAASDLIALGAIR 288
      * : * : * * : : * . . . : * : . . * : . * : * : * :

EcLacI ALGERGLFAGEDISLIGNDGVAACAYSNPPLTTIAVEPLALGKQAAQQILRRIAQPDAP 323
CcMall ALKHAGLSVPGDVSMGFDNVPFSRYASPALSTIAQDTTKAGKLMVSKLLD--SGERAS 345
      * * . * * . * : : * * . * . * : * : * : * : . . * * . : : * .

EcLacI LSHYIYRPTLQIRASTGKRGR 344
CcMall RSE RVP-TDLIIRES CGG--- 362
      * . : . * * * *

```

Sequenzvergleich von LacI aus *E. coli* und Mall aus *C. crescentus*.
LacI bezeichnet das LacI-Protein (A1AIN0) aus *E. coli* und Mall das Mall-Protein (CC2284) aus *C. crescentus*.

8 Abkürzungen

2-D	zweidimensional
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
CC	<i>Caulobacter crescentus</i>
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CM	Cytoplasmamembran
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxypropansulfonat
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cv	column volume
Da	Dalton
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid

ds	Doppelstrang
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDDA	Ethylendiaminodiacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Leitfähigkeit
Gm	Gentamycin
GlcNAc	N-Acetyl- β -D-glucosamin
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo-
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_M	Michaeliskonstante
Km	Kanamycin
l	Liter
LDAO	N-N-Dimethyldodecylamin-N-oxid
μ	Mikro-
M	Molar
M2G	Minimalmedium mit Glucose
M2M	Minimalmedium mit Maltose
m	Milli
mA	Milliampère
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ng	Nanogramm

NADG	N-Acetyl- β -D-Glucosamin
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
ns	Nanosekunde
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₅₇₈	Optische Dicht bei 578 nm
ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PYE	Pepton, Hefeextrakt
R	Resistenz
RNA	Ribonukleotid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Spc	Spectinomycin
Str	Streptomycin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TMD	Transmembrandomäne
TY	Trypton, Hefeextrakt
u.a.	unter anderem
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
V	Volt
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Lohmiller
Geburtsdatum: 08.08.1978
Geburtsort: Tübingen / Baden-Württemberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Bildungsweg

1989 - 1998	Allgemeine Fachhochschulreife, Andreae-Gymnasium Herrenberg
1998 – 2004	Studium der Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: organische Chemie und Immunologie Diplomarbeit: „Untersuchungen äußerer Membranrezeptoren von <i>C. crescentus</i> in Bezug auf einen TonB-abhängigen Transport“
2004 – 2008	Promotion an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen: „TonB-abhängige Substrataufnahme bei dem Gram-negativen Bakterium <i>Caulobacter crescentus</i> “

