

Heidi Neugebauer

**Identifizierung eines Maltodextrintransporters  
in der äußeren Membran von  
*Caulobacter crescentus***



Cuvillier Verlag Göttingen

### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004  
Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2004  
ISBN 3-86537-261-9

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://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, 2004  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-261-9

**Identifizierung eines Maltodextrintransporters  
in der äußeren Membran von  
*Caulobacter crescentus***

**Dissertation**

der Fakultät für Biologie

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Heidi Neugebauer, geb. Brand**

aus Leonberg

2004

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2004

Dekan: Prof. Dr. F. Schöfl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hantke

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.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim vom Zellbiologischen Institut der Universität Tübingen, der mir die Durchführung der 2-D-Gelelektrophorese und die MALDI-TOF-Analyse in seinem Institut ermöglichte. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Winfried Kammer für das Einarbeiten in die Methodik der 2-D-Gelelektrophorese und Herrn Dr. Gerold Schwarz für die Durchführung der MALDI-TOF-Analyse.

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. Susanne Mahren danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und für viele unterhaltsame Gespräche.

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

Annette Sauter, Silke Stern und Franziska Endriß danke ich für viele abwechslungsreiche Stunden im und außerhalb des Labors und für ihre Hilfsbereitschaft.

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

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Mann Alexander bedanken.

Danke für deine Hilfsbereitschaft, für deine Unterstützung und für viele aufmunternde Worte!



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Substrattransport bei Bakterien	1
1.2 Energie-Transduktionskomplexe	3
1.3 TonB-abhängige Rezeptoren	4
1.4 <i>Caulobacter crescentus</i> und seine TonB-abhängigen Rezeptoren	6
1.5 Aufgabenstellung	8
<b>2. Material und Methoden</b>	9
<b>2.1 Material</b>	9
2.1.1 Geräte und Chemikalien	9
2.1.2 Medien	11
2.1.3 Medienzusätze	12
2.1.4 Lösungen und Puffer	13
2.1.4.1 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	13
2.1.4.2 Lösungen für SDS-PAGE	13
2.1.4.3 Lösungen für Western Blots	14
2.1.4.4 Lösungen für Southern Blots	14
2.1.4.5 Lösungen zur Isolierung von Gesamtmembranen	15
2.1.4.6 Lösungen zur Proteinaufreinigung	16
2.1.4.7 Lösungen zur 2D-Gelelektrophorese	17
2.1.4.7.1 Lösungen für Silberfärbung	18
2.1.4.7.2 Lösungen für Coomassie-Färbung	18
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme	19
2.1.6 Klonierungsvektoren	19
2.1.7 Plasmide	20
2.1.8 Plasmidkonstruktionen	21
2.1.9 Synthetische Oligonukleotide	22
<b>2.2 Methoden</b>	25
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1.1 Kulturbedingungen von <i>C. crescentus</i>	25
2.2.1.2 Konjugation	25
2.2.1.3 Wachstumstests	25

---

2.2.2 DNA-Methoden	26
2.2.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA	26
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.2.4 Klonierungstechniken	27
2.2.2.5 Konstruktion chromosomaler Mutanten in <i>C. crescentus</i>	27
2.2.2.5.1 Die <i>malA::</i> -Mutante HB2003	28
2.2.2.5.2 Die <i>tonB::</i> -Mutante HB2003	29
2.2.2.5.3 Die <i>tonB:: exbBD1::Gm<sup>R</sup></i> -Doppelmutante HB2006	30
2.2.2.5.4 Die <i>exbBD1::Gm<sup>R</sup></i> -Mutante HB2007	30
2.2.2.5.5 Versuch der Konstruktion von <i>exbBD1::</i> bzw. <i>exbBD2::Gm<sup>R</sup></i> in JS1003	31
2.2.2.6 Southern Blot, Hybridisierung und Detektion	31
2.2.3 Proteintechniken	32
2.2.3.1 Isolierung der äußeren Membran von <i>C. crescentus</i>	32
2.2.3.2 Proteinbestimmung	33
2.2.3.3 Überexpression von Proteinen	33
2.2.3.4 Isolierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i>	33
2.2.3.5 Aufreinigung von MalAHis <sub>6</sub>	34
2.2.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.3.7 Western Blot	35
2.2.3.8 Immunologischer Nachweis	35
2.2.3.9 Kanalmessung in „black lipid“-Membranen	35
2.2.3.10 2-D-Gelelektrophorese	36
2.2.3.10.1 Rehydratisierung der IPG-Streifen	36
2.2.3.10.2 Probenvorbereitung für die Isoelektrische Fokussierung	36
2.2.3.10.3 Isoelektrische Fokussierung	37
2.2.3.10.4 Equilibrierung	37
2.2.3.10.5 2. Dimension (SDS-PAGE)	38
2.2.3.10.6 Färbung der Gele	38
2.2.3.10.6.1 Silberfärbung	38
2.2.3.10.6.2 Coomassie-Färbung	39
2.2.3.11 Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF)	39

---

<b>3. Ergebnisse</b>	40
3.1 Untersuchung des äußeren Membranproteinmusters von <i>Caulobacter crescentus</i> in Abhängigkeit von verschiedenen Nährstoffangeboten	40
3.1.1 Eindimensionale SDS-PAGE der äußeren Membranproteine von <i>C. crescentus</i>	40
3.1.2 2-D-Gelelektrophorese der äußeren Membranproteine von <i>C. crescentus</i>	41
3.1.2.1 Optimierung der Bedingungen für die 2-D-Gelelektrophorese	41
3.1.2.2 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> nach Anzucht in verschiedenen Medien mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese	47
3.1.2.2.1 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> anhand von Silber-gefärbten 2-D-Gelen	47
3.1.2.2.2 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> anhand von Coomassie-gefärbten 2-D-Gelen	52
3.1.3 Identifizierung der Proteinspots durch Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF)	59
3.1.4 Datenbankinformationen über CC2287 (MalA)	61
3.2 Untersuchungen zur Funktion des äußeren Membranrezeptors CC2287 (MalA)	62
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der <i>malA::T</i> - Mutante HB2003 bzgl. Maltodextrinaufnahme	62
3.2.2 Kann MalA die Funktion von LamB in <i>E. coli</i> übernehmen?	63
3.2.2.1 Klonierung und Expression von <i>malA</i> in <i>E. coli</i>	64
3.2.2.2 Klonierung von <i>cc2237</i> und <i>cc2335-2336</i> in <i>E. coli</i>	65
3.2.2.3 Komplementationsversuch von <i>E. coli</i> KB419 mit MalA	65
3.2.2.3.1 Überprüfung der MalA-Expression in <i>E. coli</i> KB419	67
3.2.3 Kann Acarbose an MalA binden?	68
3.2.4 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme Energie-abhängig?	70
3.2.4.1 Herstellung der <i>tonB::T</i> -Mutante HB2004	70
3.2.4.2 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme TonB-abhängig?	71
3.2.4.3 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme ExbBD-abhängig?	72
3.2.4.4 Aufreinigung von MalA-His <sub>6</sub>	74
3.2.4.5 Einzelkanalmessungen von MalA an künstlichen Membranen	77
3.2.4.5.1 Einzelkanalmessungen von MalA-His <sub>6</sub> nach SDS-Solubilisierung	77
3.2.4.5.2 Einzelkanalmessungen von MalA-His <sub>6</sub> nach Harnstoff-Solubilisierung	82
3.2.4.5.3 Versuch der MalA-Isolierung aus <i>C. crescentus</i>	82

3.3 Untersuchungen zur Funktion der Proteine TonB und ExbBD aus <i>C. crescentus</i>	83
3.3.1 Komplementationsversuch einer <i>E. coli tonB</i> -Mutante mit TonB und ExbBD aus <i>C. crescentus</i>	83
3.3.2 Kann <i>C. crescentus</i> ohne TonB (CC2327) und ExbBD1 (CC2335-2336) unter Eisenmangel wachsen?	85
3.3.3 Erfolgt die Siderophoraufnahme bei <i>C. crescentus</i> TonB- bzw. ExbBD1-abhängig?	87
3.3.4 Sequenzanalyse zur Identifizierung homologer TonB-Proteine von <i>C. crescentus</i>	92
3.3.5 Identifizierung des Tol/PAL-Clusters in <i>C. crescentus</i> durch Sequenzvergleiche	92
<b>4. Diskussion</b>	<b>94</b>
4.1 Vergleich des Membranproteinmusters von <i>C. crescentus</i> nach Anzucht in verschiedenen Medien	94
4.2 MalA hat die Funktion eines Maltodextrintransporters	97
4.3 Werden Maltodextrine über MalA Energie-abhängig aufgenommen?	101
4.4 Hinweise auf das Vorhandensein eines weiteren TonB-Proteins	108
4.5 Hypothese zur Funktion von MalA	109
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>111</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>119</b>
<b>8. Abkürzungen</b>	<b>124</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Substrattransport bei Bakterien

Nährstoffe und Substrate gelangen durch Passieren der bakteriellen Zellhülle in das Innere der Bakterienzelle. Die Zellhülle unterscheidet sich bei den Gram-negativen Bakterien von den Gram-positiven Bakterien morphologisch durch eine verhältnismäßig dünne Mureinschicht und einer zweiten äußeren Membran, welche eine Lipid-Doppelschicht darstellt und aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaut ist. In diese Phospholipid-doppelschicht sind Proteine eingelagert, die entweder in die Membran eingebettet sein können oder über einen Lipid-Anker in der Membran fixiert sind (Nikaido, 1996A). Diese Membranproteine spielen eine Rolle bei der Zellhüllenstabilisierung, der Proteintranslokation und dem Export von antimikrobiellen Substanzen. Sie können enzymatische Aktivität besitzen und sie sind verantwortlich für die Aufnahme von Nährstoffen und Substraten (Buchanan; 1999; Koebnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000).

Für den Stoffaustausch durch zelluläre Membranen bzw. Membranproteinen gibt es die klassische Einteilung in Diffusion, erleichterte Diffusion und aktiven Transport.

#### Diffusion

Als Diffusion wird der Stofftransport entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand bezeichnet (Delcour, 2003). Bei diesem passiven Transport sind Membranproteine beteiligt, die einen „offenen“ Kanal in der äußeren Membran bilden, durch den hydrophile Moleküle kleiner als 600 Dalton in die Zelle diffundieren (Nikaido, 1994). Diese auch als unspezifische Porine bezeichnete Proteinklasse umfasst in *E. coli* die Proteine OmpF, OmpC und PhoE, die keine Substratspezifität aufweisen (Nikaido, 1996A). Porine bilden in der äußeren Membran Trimere, wobei jedes Monomer einen eigenen wassergefüllten Kanal darstellt (Klebba und Newton, 1998; Schirmer, 1998). Sie bestehen aus antiparallelen  $\eta$ -Faltblättern, die eine tonnenartige Proteinstruktur in der äußeren Membran ausbilden mit relativ weitem Eintritt und Ausgang und einer starken zentralen Verengung. Die Durchlässigkeit des Kanals wird durch extrazelluläre Schleifen („loops“) reguliert, die in das Innere des  $\eta$ -Barrels zurückfalten (Cowan *et al.*, 1992) und somit nur kleineren Molekülen den Durchfluss gewähren. Lipophile Moleküle werden am Durchtritt durch starke elektrostatische Kräfte gehindert, die von geladenen Aminosäurereste in der Region der Kanalverengung hervorgerufen werden.

### **Erleichterte Diffusion**

Neben der reinen Diffusion durch unspezifische Porine können Substrate auch durch erleichterte Diffusion mit Hilfe spezifischer Porine über die äußere Membran aufgenommen werden. Diese Porine bilden ebenfalls Trimere, besitzen jedoch eine spezifische Affinität zu ihren Substraten. Bei geringen Nährstoffkonzentrationen wird somit die Aufnahme des Substrates durch eine spezifische reversible Bindung erhöht. So gelangen beispielsweise bei *E. coli* Maltose und Maltodextrine durch erleichterte Diffusion über den Membranrezeptor LamB in die Zelle (Benz, 1994). LamB besteht aus 18 antiparallelen  $\eta$ -Faltblättern und bildet in der äußeren Membran ebenfalls eine „Tonnenstruktur“ aus. Wie bei unspezifischen Porinen wird auch hier die Durchlässigkeit des Kanals durch extrazelluläre „loops“, die in das Innere des  $\eta$ -Barrels zurückfalten, reguliert (Schirmer *et al.* 1995; Schirmer, 1998; Braun *et al.*, 2001). Die Substratbindestelle von LamB befindet sich im Zentrum der Kanalverjüngung (Dutzler *et al.*, 1996). Dort bildet eine Abfolge von sechs aromatischen Aminosäureresten eine durchgehende Kette entlang der Längsachse des  $\eta$ -Barrels, die auch als „greasy slide“ bezeichnet wird und der Substratbindung und –weiterleitung dienen. Dabei werden die Maltodextrine am distalen extrazellulären Ende des „greasy slide“ gebunden und diffundieren anschließend durch den Kanal zum periplasmatischen Ende (Van Gelder *et al.*, 2002).

Das Phagen T6-Rezeptorprotein Tsx ist ein weiteres spezifisches Porin (Schneider *et al.*, 1993), durch welches Nukleoside durch erleichterte Diffusion in die Zelle gelangen (Maier *et al.*, 1988; Fsihi *et al.*, 1993).

### **Aktiver Transport**

Essentielle Nährstoffe, deren Molekulargewicht über der Ausschlussgrenze der Porine liegt (ca. 600 Dalton) können nicht durch Diffusion in die Zelle gelangen, sondern müssen über hochaffine energieabhängige Transporter gegen einen Konzentrationsgradienten aufgenommen werden. Bei *E. coli* handelt es sich dabei ausschließlich um Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-Aufnahmesysteme. Der Transport stellt hier einen aktiven energieabhängigen Prozess durch sogenannte TonB-abhängige Membranrezeptoren dar.

## 1.2 Energie-Transduktionskomplexe

Da der Aufbau der äußeren Membran und die in ihr befindlichen Porine keine Ausbildung eines Protonengradienten über die Membran zulassen, müssen Gram-negativen Bakterien die protonenmotorische Kraft der Cytoplasmamembran nutzen, um Substrate aktiv über die äußere Membran in die Zelle aufnehmen zu können (Postle und Kadner, 2003). Bis jetzt wurden in *E. coli* zwei Proteinsysteme nachgewiesen, die die Energie des elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran für energieverbrauchende Aufnahmeprozesse der äußeren Membran nutzbar machen.

Das Tol/Pal-System setzt sich aus den Proteinen TolQ, TolR und TolA zusammen, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, dem periplasmatischen Protein TolB und dem in der äußeren Membran verankerten und ins Periplasma reichende Pal-Protein. Diese Proteine können auf vielfältige Weise untereinander wechselwirken (Derouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995). Die Proteine TolQ und TolR nutzen dabei die Energie des Protonengradienten der Cytoplasmamembran und energetisieren TolA, welches die Energie für energieabhängige Prozesse an der äußeren Membran zur Verfügung stellt (Cascales *et al.*, 2001). Das Tol/Pal-System, welches in vielen Gram-negativen Bakterien vorhanden ist (Sturgis, 2001), ist für den Import von Colicinen der A-Gruppe und für den Export von Zellhüllenkomponenten verantwortlich (Braun, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2000, Cascales *et al.*, 2000). Außerdem stellt dieses System eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellstabilität der äußeren Membran dar (Bernadac *et al.*, 1998; Cascales *et al.*, 2002).

Homologiestudien zeigten, dass die Transmembrandomäne von TolQ und TolR strukturelle und funktionelle Homologien zu den Proteinen MotA und MotB des Flagellenmotors aufzeigen, welche am basalen Ende des in der Cytoplasmamembran verankerten Flagellums lokalisiert sind (Cascales *et al.*, 2001). Man vermutet, dass MotA und MotB den Stator des Flagellenmotors bilden (Zhou *et al.*, 1998a) und auch hier der Protonengradient der Cytoplasmamembran von MotA und MotB genutzt wird um ein Drehmoment im Motor zu erzeugen (Braun *et al.*, 1999).

Das zweite energieübertragende System ist das TonB/ExbBD-System, welches für den energieabhängigen Transport von Eisensiderophoren und Vitamin B<sub>12</sub> in die Zelle verantwortlich ist. Zudem ist es für die Aufnahme von Colicinen der B-Gruppe und der rezeptorvermittelten Infektion einiger Bakteriophagen notwendig (Braun, 1995). Homologe TonB- und ExbBD-Proteine konnten in vielen Gram-negativen Bakterien gefunden werden (Moeck und Coulton, 1998; Larsen *et al.*, 1996). Die Proteine TonB, ExbB und ExbD bilden

einen strukturellen Energietransduktionskomplex in der Cytoplasmamembran. TonB, welches über seinen N-Terminus in der Cytoplasmamembran verankert ist erstreckt sich ins Periplasma und kann mit den Rezeptoren der äußeren Membran über deren sogenannte TonB-Box in Wechselwirkung treten (Kadner, 1990; Postle, 1993). Die Bindung von TonB an äußere Membrantransporter wurde genetisch durch Suppressionsanalysen (Braun, 1995) und chemisch durch Formaldehydvernetzung (Moeck *et al.*, 1997) und durch die *in vivo* Bildung von Disulfidbrücken (Cadieux *et al.*, 1999; Ogierman und Braun, 2003) gezeigt. ExbB stellt ein integrales Membranprotein der Cytoplasmamembran dar (Kampfenkel und Braun, 1993), wohingegen ExbD ebenfalls in der Cytoplasmamembran verankert ist, jedoch einen großen Proteinanteil im Periplasma aufweist (Kampfenkel und Braun, 1992). Die Funktion von TonB ist für die Energetisierung der Rezeptoren 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 völlig aufgeklärt. Ein Modell beschreibt die eigentliche Energieübertragung zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran durch eine Reihe von Konformationsänderungen des Proteins TonB (Letain und Postle, 1997). Dabei ändert sich vermutlich die Konformation von TonB in Abhängigkeit von der protonenmotorischen Kraft der Cytoplasmamembran. Das so energetisierte TonB ist dann in der Lage mit dem Rezeptor der äußeren Membran zu interagieren und diesen durch eine weitere Konformationsänderung in eine energetisierte Form zu überführen (Moeck und Coulton, 1998).

### **1.3 TonB-abhängige Rezeptoren**

TonB-abhängige Rezeptoren sind in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien lokalisiert und für den aktiven Transport von Substraten mit Hilfe des TonB/ExbBD-Komplexes verantwortlich. Röntgenstrukturanalysen verschiedener TonB-abhängiger Rezeptoren zeigen einen grundsätzlich ähnlichen Aufbau. Sie bestehen alle aus 22 antiparallelen  $\eta$ -Faltblättern, die eine Barrel-Domäne aufbauen und die äußere Membran durchspannen. Charakteristisch ist außerdem der sich von der periplasmatischen Seite her in den von der  $\eta$ -Barrel-Domäne gebildete Kanal zurückfaltende N-Terminus, der den Kanal verschließt und auch als Korkdomäne bezeichnet wird (Ferguson *et al.*, 1998B; 2002; Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999; Chimento *et al.*, 2003). Bislang sind TonB-abhängige Energie-gekoppelte Transportsysteme bei *E. coli* nur für die Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-

Aufnahme beschrieben 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). Man vermutet, dass eine diffusionskontrollierte Aufnahme über die äußere Membran aufgrund der geringen Konzentration und der Größe der Eisenkomplexverbindungen für die Eisenversorgung nicht ausreicht. Somit werden die Eisenkomplexverbindungen an der Zelloberfläche durch hochspezifische Rezeptorproteine gebunden und nach Bindung aktiv mittels Energieverbrauch durch die äußere Membran ins Periplasma transportiert. Von dort wird das Eisen oder die Eisensiderophorkomplexe durch ABC-Transporter über die Cytoplasmamembran in das Cytoplasma transportiert. Die  $K_M$ -Werte für den aktiven Transport durch die äußere Membran liegen im nanomolaren Bereich (Newton *et al.*, 1999). Bei *E. coli* sind bisher sieben TonB-abhängige Rezeptoren für Eisen(III)-Siderophorkomplexe beschrieben worden. Die Rezeptoren FhuA, FhuE und IutA binden die Hydroxamat-Siderophore Ferrichrom bzw. 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 Catecholat-Siderophoren gehörende ebenfalls von *E. coli* synthetisierte Enterobactin wird von dem Rezeptorprotein FepA aufgenommen (Lundrigan und Kadner, 1986). Zwei Vorstufen der Enterochelin-Synthese, Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure werden auch 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 mindestens ein weiteres hypothetisches Rezeptorprotein YbiL mit Homologie zum Yersiniabactin-Rezeptor aus *Yersinia enterocolitica* identifiziert werden (Blattner *et al.*, 1997). Außerdem konnten homologe Proteine des Häm-Rezeptors HemR von *Yersinia enterocolitica* in *E. coli* gefunden werden. Ebenso in die Gruppe der unter Eisenmangel stark exprimierten Membranrezeptoren in *E. coli* gehört BtuB, wodurch Vitamin B<sub>12</sub> transportiert wird (Bassford *et al.*, 1976; Heller und Kadner, 1985). Die Kristallstrukturen der Rezeptoren FhuA, FecA, FepA und BtuB wurden bestimmt (Ferguson *et al.*, 1998B, 2001, 2002; Locher *et al.*, 1998; Chimento *et al.*, 2003), die Studien zur Aufklärung der Transportmechanismen ermöglichen. 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* sind in anderen Bakterienarten TonB-abhängige Rezeptoren bzw. Transportprozesse wenig charakterisiert. Die fortschreitende Sequenzierung der

Bakteriengenome bestätigt allerdings, dass TonB-abhängige Membranrezeptoren weit verbreitet sind und zum Teil in einer großen Anzahl in den jeweiligen Bakterienarten zu finden sind.

#### **1.4 *Caulobacter crescentus* und seine TonB-abhängigen Rezeptoren**

*Caulobacter crescentus*, ein in die  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien eingeordnetes, stäbchenförmiges, Gram-negatives Bakterium lebt ausschließlich in nährstoffarmen Gewässern und stellt dort das am häufigsten zu findende nicht-pathogene Bakterium dar.

Charakteristisch für *C. crescentus* ist sein Differenzierungs- und Zellteilungssystem (Shapiro *et al.* 2002; McAdams und Shapiro 2003). Das Bakterium teilt sich stets asymmetrisch, wobei frei schwimmende Tochterzellen entstehen, die unterschiedliche Polstrukturen aufweisen. Im motilen Stadium ist die „Schwärmerzelle“ an einem Pol begeißelt, wodurch mit Hilfe des chemokinetischen Apparates eine gezielte Bewegung auf chemische Stoffe in Richtung des Konzentrationsgradienten möglich ist. Nach Freisetzung des Flagellums kann sich am selben Pol eine Art Stiel („stalk“) ausbilden, der in Nahrungsquellen ein Anheften an festen Oberflächen, wie z. B. Steinen ermöglicht. In diesem sessilen Stadium kommt es zur DNA-Replikation und Zellteilung. *Caulobacter crescentus* wird dadurch als Modellorganismus für Differenzierungsstudien gesehen.

Über Stoffwechseleigenschaften ist bei *C. crescentus* bislang noch wenig bekannt.

*C. crescentus* ist obligat aerob, heterotroph und in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen zu nutzen (Poindexter, J. S., 1964). Im Vergleich zu anderen Organismen besitzt *C. crescentus* in der äußeren Membran eine Vielzahl von Proteinen, deren Molekulargewicht über 70 kDa liegt (Agabian und Unger, 1978). Interessanterweise weist dieser Organismus die bisher größte Anzahl an vorhergesagten TonB-abhängigen Membranrezeptoren auf. Die Genomsequenz von *C. crescentus* (Nierman *et al.*, 2001) sagt 65 TonB-abhängige Rezeptoren der äußeren Membran voraus, die damit die größte Proteinfamilie in diesem Organismus darstellen. Im Gegensatz dazu werden keine homologen Proteine des in *E. coli* vorkommenden Porin-Typs OmpF, LamB, OmpX, OmpG, OmpC, PhoE und Tsx vorhergesagt (Phadke *et al.*, 2001). Da *C. crescentus* somit kaum klassische Porine besitzt, welche die Diffusion von Nährstoffen erlauben könnte die große Anzahl TonB-abhängiger Rezeptoren als Kompensation dieser Porine gesehen werden (Ireland *et al.*, 2002). Die Homologie der 65 Rezeptoren zu den charakteristischen TonB-abhängigen Transportern ist jedoch gering.

Zweidimensionale Gelelektrophoresen von äußeren Membranfraktionen von *Caulobacter crescentus* identifizierten 21 Proteine, deren Funktionen allerdings nicht näher charakterisiert wurden (Molloy *et al.*, 2001). Es wurde deutlich, dass sich das Proteinmuster der äußeren Membran von *Caulobacter crescentus* deutlich von dem der *Enterobacteriaceae* unterscheidet. Auffallend war, dass eine große Anzahl an Proteinen in der äußeren Membran von *C. crescentus* ein Molekulargewicht von mehr als 70 kDa aufweist. Die Schwierigkeit, alle vorhergesagten 65 TonB-abhängigen Rezeptoren durch 2-D-Gelelektrophorese aufzutrennen und detektieren zu können lag daran, Bedingungen zu finden unter denen Membranproteine in Lösung gebracht werden können. So konnten in einer weiteren 2-D-Studie von *C. crescentus* 41 Proteine der äußeren Membran zugeteilt werden, von denen 16 als TonB-abhängige Rezeptoren angesehen wurden (Phadke *et al.*, 2001). Eine TonB-abhängige Funktion wurde allerdings bisher für keines der 65 Rezeptorproteine beschrieben. In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster der Gene, u.a. auch die Expression verschiedener TonB-abhängiger Rezeptoren, bei Anzucht in Komplexmedium und Minimalmedium stark variiert (Hottes *et al.*, 2004).

Mit einer vorhergesagten Anzahl von 65 TonB-abhängigen Rezeptoren könnte *C. crescentus* fast doppelt so viele TonB-abhängige Proteine besitzen als bis jetzt in irgendeinem bekannten Genom gefunden wurde. So besitzt das Genom von *Pseudomonas aeruginosa* 34 TonB-abhängige Rezeptoren (Stover *et al.*, 2000; Nierman *et al.*, 2001) und alle anderen sequenzierten Genome enthalten nicht mehr als 13 TonB-abhängige Proteine (Ireland *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt ist bei *E. coli* bislang nur die Aufnahme von Eisen und Vitamin B<sub>12</sub> energieabhängig durch TonB-abhängige Rezeptoren beschrieben worden. Da in *C. crescentus* jedoch eine große Anzahl von Transportern vorhergesagt wird und kaum Porine zu finden sind, die eine Diffusion von Substraten erlauben, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass neben der Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-Aufnahme auch andere Nährstoffe und Substrate energieabhängig über TonB-abhängigen Rezeptoren in die Zelle transportiert werden müssen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass viele der TonB-abhängigen Rezeptoren von *C. crescentus* nicht die typische Operonstruktur aufweisen, die man sonst bei Eisen-transportierenden äußeren Membranproteinen findet (Phadke *et al.*, 2001). In weiteren Studien 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 bei *Bacteroides thetaiotaomicron* verantwortlich sind (Cheng *et al.*, 1995).

## 1.5 Aufgabenstellung

Die Genomsequenz von *Caulobacter crescentus* sagt 65 TonB-abhängige Membranrezeptoren voraus (Nierman *et al.*, 2001). Da diese Proteine nicht alle für die Eisenversorgung notwendig sein können, soll untersucht werden, ob einem der äußeren Membranproteine eine Transportfunktion für andere Substrate als Eisen zugeordnet werden kann.

Da in der Natur Stärkeabbauprodukte pflanzlichen Ursprungs vorhanden sind und *E. coli* Maltodextrine durch erleichterte Diffusion mit Hilfe des Proteins LamB durch die äußere Membran schleusst, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die Maltodextrinaufnahme im Laufe der Evolution von der erleichterten Diffusion zum aktiven Transport bei *C. crescentus* entwickelt hat und durch TonB-abhängige Membranrezeptoren erfolgt. Zunächst sollen die Proteinmuster der äußeren Membran von *C. crescentus* bei Anzucht in Minimalmedium mit Glucose bzw. Maltose verglichen werden. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese sollen die Proteine aufgetrennt und hochregulierte Proteine mittels MALDI-TOF-Analyse bestimmt werden. Handelt es sich dabei um ein vorhergesagtes TonB-abhängiges Membranprotein, soll eine Deletionsmutante hergestellt werden und die Funktion des bestimmten Membranproteins aufgeklärt werden. Zudem soll überprüft werden, ob der Transport durch dieses Protein TonB-abhängig erfolgt.

Desweiteren sollen die in der Datenbank mit TonB und ExbBD bezeichneten Proteine aus *C. crescentus* näher charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Chemikalien

**Amersham Biosciences**, Freiburg:

Iso-Dalt-Electrophoresis System, Iso-Dalt-Electrophoresis System Gel Caster ID 220;  
Multiphor II; Immobiline DryStrips pH 4-7, 18 cm; Molekulargewichtsstandard;  
Pharmalyte 3-10, PD10-Säulen

**Amicon**, Beverly MA, USA:

Zentrifugationsfiltrerröhrchen Centriprep YM-30

**AppliChem**, Darmstadt:

CHAPS, DTT, Harnstoff, Iodacetamid, SDS

**Biometra**, Göttingen:

PCR Personal Cycler, Gelelektrophoresekammer für Polyacrylamidgele

**Bio-Rad**, München:

Trans-Blot-System

**Carl Roth GmbH & Co**, Karlsruhe:

Acrylamid Rotiphorese Gel A (30 %), Bisacrylamid Rotiphorese Gel B (2 %)

**Difco Laboratories**, Detroit MI, USA:

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

**Eppendorf AG**, Köln:

Tischzentrifuge, Photometer 1101 M

**Heraeus Instruments GmbH**, Hanau:

Sepatech Biofuge 15, Megafuge 1.0 R

**Invitrogen**, Groningen, Niederlande:

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

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

Flachbett-Elektrophoreseapparatur Modell Horizon 58 und 11-14

**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

**Pall Life Science**, Dreieich:

Biodyne A-Nylonmembran

**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, Anti-Dig-AP-AK, Complete, CSPD, DIG DNA Labeling Mix, DNase, T4 DNA-Ligase, Anti-His<sub>6</sub> mAK, Restriktionsendonukleasen und –puffer, High Fidelity PCR Kit, Long Template PCR Kit, Trypsin

**Qiagen GmbH**, Hilden:

Ni-NTA-Spin-Säulen

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

French Pressure Cell Press

**Satorius AG**, Göttingen:

Feinwaagen, Nitrocellulosefilter 0,45 µm

**Serva Feinbiochemika GmbH**, Heidelberg:

APS, Servablau R250 und G250, Temed

**Schleicher & Schuell GmbH**, Dassel:

Nitrocellulose-Membranen

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH**, Taufkirchen:

2'-Dipyridyl, Ampicillin, BSA, Chloramphenicol, Gentamycin, IPTG, L-Arabinose, Lysozym, Maltodextrine, NBT, PMSF, SDS, Tetracyclin, Thioharnstoff, Triton X-100, LDAO, OG

**Sorvall GmbH**, Bad Homburg:

Sorvall Zentrifuge Typ RC 5B Plus

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma

**E. Merck AG**, Darmstadt.

### 2.1.2 Medien

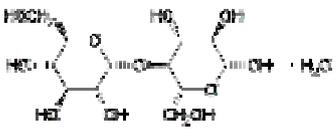
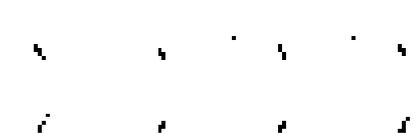
<b>PYE</b>	Bacto Pepton	2 g	
	Hefe Extrakt	1 g	
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	
	Zugabe nach Autoklavieren	CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	5 ml
	MgSO <sub>4</sub> (1 M)	800 µl	
<b>M2- Salze (10 x)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,4 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,6 g	
	NH <sub>4</sub> Cl	5 g	
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	
<b>M2- Minimalmedium (M2G) bzw. (M2M)</b>	M2-Salze (10 x)	100 ml	
	Glucose (30 %) bzw. Maltose (30 %)	10 ml	
	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	10 ml	
	CaCl <sub>2</sub> (50 mM)	10 ml	
	FeSO <sub>4</sub> (1 mM) in 0,8 mM EDTA, pH 6,8	10 ml	
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	
<b>M2-Cas-Medium</b>	siehe M2G-Minimalmedium, ohne FeSO <sub>4</sub> , mit 0,2 % Casaminosäuren		
<b>TY</b>	Bacto Trypton	8 g	
	Hefe Extrakt	5 g	
	NaCl	5 g	
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	
<b>M9-Salze (10 x)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	75 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g	
	NH <sub>4</sub> Cl	10 g	
	NaCl	5 g	
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	
<b>M9-Minimalmedium</b>	M9-Salze (10 x)	100 ml	
	Glucose (40 %)	10 ml	
	MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1 ml	
	CaCl <sub>2</sub>	1 ml	
	Thiamin (1 M)	1 ml	
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml	

### 2.1.3 Medienzusätze

<b>Agar</b>	Für Platten	15 g/l
	Für Topagar	7,5 g/l

<b>Antibiotika</b>	<b><i>Caulobacter crescentus</i></b>		<b><i>E. coli</i></b>
	<b>Platten</b>	<b>Flüssigmedium</b>	
Ampicillin (5 mg/ml)	50 µg/ml	7,5 µg/ml	50 µg/ml
Chloramphenicol (4 mg/ml)	2 µg/ml	2 µg/ml	25 µg/ml
Tetracyclin (12 mg/ml)	2 µg/ml	1 µg/ml	12 µg/ml
Gentamycin (10 mg/ml)	5 µg/ml	2,5 µg/ml	20 µg/ml
Spectinomycin (10 mg/ml)	50 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
Streptomycin (3 mg/ml)	5 µg/ml	5 µg/ml	30 µg/ml
Kanamycin (50 mg/ml)	resistent	resistent	30 µg/ml
Nalidixinsäure (2 mg/ml)	20 µg/ml (resistent)	20 µg/ml (resistent)	20 µg/ml

Chloramphenicol und Tetracyclin wurden in 70 % Ethanol gelöst. Die restlichen Antibiotika wurden in H<sub>2</sub>O dest. gelöst. Die Antibiotika wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren der Medien zugegeben.

IPTG		100 mM (24 mg/ml)
X-Gal (gelöst in N,N-dimethylformamid)		50 mM (20 mg/ml)
Saccharose		3 %
Glucose (198 g/mol)		0,1 %
Maltose (360 g/mol)		0,1 %
Maltotriose (504 g/mol)		0,1 %
Maltotetraose (667 g/mol)		0,1 %

Maltopentaose (829 g/mol)		0,1 %
Maltohexaose (991 g/mol)		0,1 %

## 2.1.4 Lösungen und Puffer

### 2.1.4.1 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50 x)	Tris/HCl pH 7,9	242 g
	Eisessig	57 ml
	EDTA	36 g
	H <sub>2</sub> 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

### 2.1.4.2 Lösungen für SDS-PAGE

Sammelgel	Acrylamid (30 %)	1,25 ml
	Bisacrylamid (2 %)	0,5 ml
	Sammelgelpuffer (0,25 M Tris/HCl, pH 6,8)	6,3 ml
	H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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	760 mg
	SDS	2 g
	Glycerin	10 ml
	-Mercaptoethanol	5 ml
	Bromphenolblau	5 mg
	H <sub>2</sub> O dest.	ad 50 ml

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

### 2.1.4.3 Lösungen für Western Blots

Transferpuffer	Tris/HCl pH 8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
TNT	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,05 %
Reaktionspuffer	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Detektionslösung	Reaktionspuffer	30 ml
	NBT (70 mg/ml in 70 % DMF)	171,4 µl
	BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF)	120 µl

### 2.1.4.4 Lösungen für Southern Blots

SSC (20 x)	NaCl	3 M
	Trinatriumcitrat	0,3 M pH 7,4
Depurinierungslösung	HCl	0,25 N
Denaturierungslösung	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Neutralisierungslösung	NaAc, pH 5,5	3 M
Hybridisierungslösung	SSC	5x
	Natrium-Lauroylsarkosin	0,1 %
	SDS	0,1 %
	Blocking Reagenz	2 %

Waschlösung 1	SSC	2x
	SDS	0,1 %
Waschlösung 2	SSC	0,1 %
	SDS	0,1 %
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	NaOH	0,2 M
		pH 7,5
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer	
Blocking-Puffer	Tween 20	0,3 %
	Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer bei 50-70 °C lösen	10 %
Blocking-Lösung	Blocking-Puffer	2 %
	Maleinsäure-Puffer	
Detektions-Puffer	Tris	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
		pH 9,5

#### 2.1.4.5 Lösungen zur Isolierung von Gesamtmembranen

Waschpuffer (für <i>C. crescentus</i> )	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
Frenchpress-Puffer (für <i>C. crescentus</i> )	Tris/HCl, pH 8,0	60 mM
	EDTA	0,2 mM
	DNase (1 mg/ml)	300 µl/15 ml
	Complete (25 x)	600 µl/15 ml
	PMSF (1 mM)	150 µl/15 ml
Frenchpress-Puffer (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 µl/15 ml
Extraktionspuffer	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Triton X-100	2 %

### 2.1.4.6 Lösungen zur Proteinaufreinigung für Ni-NTA-Spin-Säulen

Solubilisierungspuffer	Tris/HCl pH 8,0 EDTA Detergenz (z.B. SDS)	50 mM 1 mM 1 %
native Bedingungen:		
Lysepuffer (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl Imidazol SDS	50 mM 0,3 M 10 mM 0,2 %
Waschpuffer (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl Imidazol SDS	50 mM 0,3 M 20 mM 0,2 %
Elutionspuffer (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl Imidazol SDS	50 mM 0,3 M 250 mM 0,2 %
denaturierende Bedingungen:		
Lysepuffer (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tris-Cl Harnstoff	100 mM 10 mM 8 M pH 8,0 (NaOH)
Waschpuffer (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tris-HCl, pH 6,3 Harnstoff	100 mM 10 mM 8 M pH 6,3 (HCl)
Elutionspuffer D (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tris-HCl, pH 6,3 Harnstoff	100 mM 10 mM 8 M pH 5,9 (HCl)
Elutionspuffer E (für Ni-NTA-Spin-Säulen)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tris-HCl, pH 6,3 Harnstoff	100 mM 10 mM 8 M pH 4,5 (HCl)

**2.1.4.7 Lösungen für die 2-D-Gelelektrophorese**

Lysepuffer (nach Molbio)	Harnstoff	9 M
	CHAPS	4 %
	DTT	1 %
	Pharmalyte	2,5 %
	Bromphenolblau	10 µg/ml
Lysepuffer (nach Phadke)	Harnstoff	7 M
	Thioharnstoff	2 M
	TBP	2 mM
	Pharmalyte	0,5 %
	Tris	40 mM
	ASB-14	1 %
	Triton X-100	1 %
Equilibrierungspuffer	Harnstoff	6 M
	SDS	4 %
	Tris/HCl pH 8,8	50 mM
DTT-Puffer (für 10 IPG-Streifen)	Equilibrierungspuffer	100 ml
	DTT	2 g
Iodacetamid (für 10 IPG-Streifen) SDS-Laufpuffer (10 x)	Equilibrierungspuffer	100ml
	Iodacetamid	4,8 g
	Tris	26 mM
	Glycin	2 M
	SDS	0,1 %
Agarose-Lösung	Agarose	1 g
	Bromphenolblau (1 %)	250 µl
	H <sub>2</sub> O deion.	ad 50 ml
SDS-Gele (13 %)	Acrylamid/PDA-Stammlösung (T 40 %, C 2,5 %)	390 ml
	Tris/HCl pH 8,8	375 mM
	Glycerin	5 %
	Natriumthiosulfat	5 mM
	APS	10 %
	TEMED	600 µl
	H <sub>2</sub> O deion.	ad 1200 ml

**2.1.4.7.1 Lösungen für Silberfärbung ( für 10 Gele)**

Fixierer 1	Ethanol	40 %
	Essigsäure	10 %
Fixierer 3	Natriumacetat	372 g
	Glutaraldehyd (50 %)	100 ml
	H <sub>2</sub> O deion.	ad 5000 ml
NDS	NDS	2,5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 5000 ml
Silberreagenz	NaOH (5 M)	20 ml
	Ammoniak (25 %)	66,5 ml
	in H <sub>2</sub> O einrühren	4900 ml
	Silbernitrat in wenig Wasser vorgelöst dazu	40 g
Entwickler	Citronensäure	0,5 g
	Formaldehyd	5 ml
	H <sub>2</sub> O deion.	ad 5000 ml
Stopplösung	Essigsäure	100 ml
	Tris	250 g
	H <sub>2</sub> O	ad 5000 ml

**2.1.4.7.2 Lösungen für Coomassie-Färbung**

Coomassie-Färbelösung	Coomassie G-250	2 g
	Schwefelsäure (konz.)	55,5 ml
	NaOH (10 M)	220 ml
	TCA (100 %)	310 ml
	H <sub>2</sub> O deion.	ad 1,5 l
Entfärbelösung		H <sub>2</sub> O deion.

## 2.1.5 Verwendete Bakterienstämme

**Tab. 1: Bakterienstämme**

Stamm	Merkmale	Herkunft
<i>C. crescentus</i>		
NA1000	<i>syn</i> -1000, Derivat von <i>C. crescentus</i> Wildtyp-Stamm	Evinger und Agabian, 1977
JS1003	NA1000 <i>rsaA</i> ::KSAC Km <sup>R</sup> -Kassette, Amp <sup>R</sup>	Edwards und Smit, 1991
HB2003	JS1003 <i>malA</i> ::T-Kassette, Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	diese Arbeit
HB2004	JS1003 <i>tonB</i> ::T-Kassette, Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	diese Arbeit
HB2006	HB2004 <i>exbBD1</i> ::Gm <sup>R</sup> -Kassette, Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	diese Arbeit
HB2007	JS1003 <i>exbBD1</i> ::Gm <sup>R</sup> -Kassette, Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
DH5	( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 gyrA relA1</i> ( 80 <i>lacZ M15</i> ) <i>deoR nal</i> <sup>R</sup>	D. Hanahan, 1983
BL21 (DE) omp8	<i>hsdS B</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal ompT dcm</i> (DE3) <i>lamB ompF</i> ::Tn5 <i>ompA ompC neo</i> <sup>R</sup>	Prilipov <i>et al.</i> , 1998
S17-1 pir	<i>hsdR hsdM</i> <sup>+</sup> RP4-2-Tc::Mu Km::Tn7 (Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> ) Tra <sup>+</sup> pir	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
AB2847	<i>aroB malT tsx thi</i>	Braun <i>et al.</i> , 1976
H2300	AB2847 ( <i>tonB-trp</i> )	Hantke
KB419	<i>lamB</i>	Krieger-Brauer, 1979
SIP575	<i>zur</i> <sup>-</sup> 19 <i>lamB</i> ::Tn10	Patzer, 1999

## 2.1.6 Klonierungsvektoren

**Tab. 2: Klonierungsvektoren**

Vektor	Merkmale	Herkunft
pDrive Cloning Vektor	PCR-Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Qiagen
pBAD/Myc-HisB	L-Ara-induzierbarer Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pGEMTeasy	PCR-Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup>	Promega
pET-27b(+)	T7-Expressionsvektor, Km <sup>R</sup>	Novagen
pBHR1	Broad Host Range Vector, Cam <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	MoBiTec

## 2.1.7 Plasmide

Tab. 3: Plasmide

Plasmid	Merkmale	Herkunft
pHP45	enthält T-Kassette ( $Sm^R/Spc^R$ ), $Amp^R$	Prentki und Krisch, 1984
pBSL202	R6K <i>oriV</i> , RP4 <i>oriT</i> , $Amp^R$ , $Gm^R$	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pBSL204	R6K <i>oriV</i> , RP4 <i>oriT</i> , $Amp^R$ , $Tet^R$	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pMR20	RK2-based $Tet^R$ broad host range-Vektor	R. Roberts und C. Moor (Jenal und Fuchs, 1998)
pJS14	pBBR1-based $Cam^R$ broad host range-Vektor	J. Skerker (Jenal und Fuchs, 1998)
pNPTS138	$Kan^R$ derivative of pLITMUS with <i>sacB</i> and <i>oriT</i>	D. Alley (Jenal und Fuchs, 1998)
pNPTS138Tet	pNPTS138 mit $Tet^R$ , $Km^R$	diese Arbeit
pBAD2287His	pBAD/Myc-HisB <i>ccmalA</i> mit HisTag, $Amp^R$	diese Arbeit
pHB138	pNPTS138Tet <i>cc2286Tcc2288</i> ; $Km^R$ , $Tet^R$ , $Spc^R$ , $Str^R$	diese Arbeit
pHB139	pNPTS138Tet <i>cc2326Tcc2328</i> ; $Km^R$ , $Tet^R$ , $Spc^R$ , $Str^R$	diese Arbeit
pMR2287	pMR20 <i>ccmalA</i> , $Tet^R$	diese Arbeit
pETcctonB	pET-27(b)+ <i>cctonB</i> , $Km^R$	diese Arbeit
pETcctonBHis	pET-27(b)+ <i>cctonB</i> mit HisTag, $Km^R$	diese Arbeit
pHB140	pNPTS138Tet mit <i>cc2334Gm<sup>R</sup>cc2337</i> , $Km^R$ , $Tet^R$	diese Arbeit
pHB141	pNPTS138Tet mit <i>cc3231Gm<sup>R</sup>cc3234</i> , $Km^R$ , $Tet^R$	diese Arbeit
pHB142	pNPTS138Tet mit <i>cc3231Tcc3234</i> , $Km^R$ , $Tet^R$ , $Spc^R$ , $Str^R$	diese Arbeit
pETextonB	pETcctonB mit <i>exbBD1</i>	diese Arbeit
pMRexb1	pMR20 <i>ccexbBD1</i> , $Tet^R$	diese Arbeit

### 2.1.8 Plasmidkonstruktionen

**Tab. 4: Plasmidkonstruktionen**

Plasmid	Konstruktion
pNPTS138Tet	1,4 kb <i>MluI</i> -Tet <sup>R</sup> -Fragment aus pBSL204 in pNPTS138
pBAD2287Stop	2,8 kb <i>BglII/KpnI</i> -PCR-Fragment mit den Primern 2287forBglII und 2287revKpnStop in pBADMyc/HisB
pBAD2287His	2,8 kb <i>BglII/KpnI</i> -PCR-Fragment mit den Primern 2287forBglII und 2287revKpnHis in pBADMyc/HisB
pHB138	<i>cc2286T cc2288</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.5.1)
pHB139	<i>cc2326T cc2328</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.5.2)
pMR2287	3 kb <i>BglII/KpnI</i> -PCR-Fragment mit den Primern 2287BglIIfor und 2287KpnIrev in pMR20
pETcctonB	743 bp <i>NdeI/EcoRI</i> -PCR-Fragment mit den Primern cctonBP1NdeI und cctonBP2EcoRI in pET-27(b)+
pETcctonBHis	743 bp <i>NdeI/EcoRI</i> -Fragment mit den Primern cctonBP1NdeI und cctonBP2ohneStop in pET-27(b)+
pETextonB	1,3 kb <i>EcoRI/SalI</i> -PCR-Fragment mit den Primern CcexbBP1EcoRI und CcexbDP2SalI in pETcctonB
pHB140	<i>cc2334Gm<sup>R</sup>cc2337</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.5.3)
pHB141	<i>cc3231Gm<sup>R</sup>cc3234</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.5.5)
pHB142	<i>cc3231T cc3234</i> über <i>SpeI</i> in pNPTS138Tet (siehe auch 2.2.2.5.5)
pMRexb1	1,5 kb <i>PstI/BamHI</i> -PCR-Fragment mit den Primern ccexbBD1revPstI und ccexbBD1forBamHI in pMR20

### 2.1.9 Synthetische Oligonukleotide

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

**Tab. 5: Synthetische Oligonukleotide**

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
<b>Primer für Konstruktion HB2003</b>		
P1rNotI	5'-ATAAGAAT <u>G</u> C/GGCCGCGATCCACCGACCATAAA CCT-3'	2486973- 2486993
P1rBglII	5'-GAA/GATCTTGTTCATACGAGTTCCCTCCC-3'	2488145- 2488165
P2fBglII	5'-GAA/GATCTCTACCGCTTCTAATCCCCAAG-3'	2490913- 2490932
P2rNotI	5'-ATAAGAAT <u>G</u> C/GGCCG <u>C</u> TTGTAGTGCAGCACCA GAA-3'	2492273- 2492292
P1fSpeI	5'-GGA/CTAGTCGATCCACCGACCATAAACCT-3'	2486973- 2486993
P2rSpeI	5'-GGA/CTAGTCCTTGTAGTGCAGCACCCAGAA-3'	2492273- 2492292
<b>Primer für Klonierung cc2287 in pBADMycB</b>		
2287forBglII	5'-GAA/GATCTATGAACACCCAATTTTCGCGCCGTCG CGCCTGGCTGATG-3'	2488159- 2488196
2287revKpnstop	5'-GGGGTAC/CGAGACTGCAGGAGGAGGCTTGGGGA TTAGAAGCGGTACG-3'	2490911- 2490949
2287revKpnHis	5'-GGGGTAC/CGAGACTGCAGGAGGAGGCTTGGGGA GAAGCGGTACG-3'	2490911- 2490949
<b>Primer für Klonierung cc2287 in pMR20</b>		
2287BglIIfor	5'-GAA/GATCTAGTGCGCAAAGAAGACACACATCG -3'	2487990- 2488014
2287KpnIrev	5'-GGGGTAC/CAGACTGCAGGAGGAGGCTTGGGGAT TAGAAGCGGTACG-3'	2490911- 2490948
<b>Primer für Klonierung NHisc2287 in pBHR1</b>		
cc2287ClaIfor HisN	5'-CCAT/CGATGCACGGCGTCACACTTTGCTATG-3'	188-210 in pBADMycHisB
cc2287AseIrev HisN	5'-CCGAGCGCGAT/TAATTGGGGATTAGAAGCGGTA CG-3'	2490911- 2490930
cc2287ClaIrev HisN	5'-CCAT/CGATGCACGGCGTCACACTTTGCTATG-3'	2490911- 2490930
<b>Primer für Klonierung cc2287HisC in pBHR1</b>		
cc2287ClaIfor HisC	5'-CCAT/CGATATATGAACACCCAATTTTCGCGCC-3'	2488158- 2488180

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
cc2287AseIrev HisC	5'-CCGAGCGCGAT/TAATTCAGACCGCTTCTGCGTTC TGA-3'	509-528 in pBADMycHisB
cc2287ClaIrev HisC	5'-CCAT/CGATCAGACCGCTTCTGCGTTCTGA-3'	509-528 in pBADMycHisB
<b>Primer für Konstruktion HB2004</b>		
CCP1forSpeI	5'-GA/CTAGTGTGTTCCGGGAACTGGGATTTTCAGA AG-3'	2529101-2529128
CCP1revEcoRV	5'-GCGAT/ATCCGCACCCCTCGAAGAACGTGGTTAA TCGT-3'	2530051-2530079
CCP2forEcoRV	5'-GCGAT/ATCGCCATCTCCGTGTCAGTAGCTCTT-3'	2531007-2531030
CCP2revNdeI	5'-GGAATTCCA/TATGACATGGTCGCGGCTTATCTGA CGGGTGATAAC-3'	2532268-2532299
CCP2revSpeI	5'-GGA/CTAGTCATGGTCGCGGCTTATCTGACGGGT GATAAC-3'	2532268-2532299
CCPfor	5'-GCATGTGCTCAGGAGTCACCGATCATAGTTAACC C-3'	2530016-2530050
CCPrev	5'-GGTCAGCCGCGAAATGATCCTGAACTTCATCGCT G-3'	2531051-2531085
CctonBmutrev	5'-CTCGATCTAGAAAGCGCAACCGTCGAGGTC-3'	2532418-2532448
<b>Primer für Konstruktion +exbBD1 (HB2006, HB2007)</b>		
ccexbBD1_P1 SpeI	5'-GA/CTAGTCCGAGGACCTCTAGATCCACAATCTA GCGCTCTAACC-3'	2537387-2537424
ccexbBD1_P2 EcoRV	5'-CGCGAT/ATCATGGAGGTGATGAACACCCTCCAG GATAACGGCTTC-3'	2538350-2538385
ccexbBD1_P3 EcoRV	5'-CGCGAT/ATCCCACCCTAACTCTGAATAGTCCGCC TGGAGCTCGATAG-3'	2539722-2539759
ccexBBD1_P4a BamHI	5'-CGG/GATCCGTGTTGTTTGGATCGCTGGTTGGTTT TCAGGCGTTCCGC-3'	2540932-2540970
ccexbBD1_P4 SpeI	5'-GA/CTAGTGTGTTGTTTGGATCGCTGGTTGGTTT CAGGCGTTCCGC-3'	2540932-2540970
seqccexbBD1_for	5'-CTTCGCCAGATAAGCGAACAGC-3'	2538154-2538175
seqccexbBD1_rev	5'-CGCTTCGAAACGATCCTTCT-3'	2539827-2539846
<b>Primer für Konstruktion +exbBD2</b>		
ccexbBD2_P1 SpeI	5'-GA/CTAGTCGGGGTCTCCTTGTTTCATCTTTTCAAG CCTC-3'	3494713-3494744
ccexbBD2_P2 EcoRV	5'-CGCGAT/ATCTTCAACAAGATCAACCTGATCACCT AGACCGGC-3'	3495634-3495666
ccexbBD2_P3 EcoRV	5'-CGCGAT/ATCCGGTGAAACTATGACAATCGTCGA GCGATCCGG-3'	3496851-3496883

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
ccexbBD2_P4a BamHI	5'-CGG/GATCCGCCTTGTTCGATGAAGGCTAGCAGC ATGCG-3'	3498185- 3498214
ccexbBD2_P4 SpeI	5'-GA/CTAGTGCCTTGTTCGATGAAGGCTAGCAGCA TGCG-3'	3498185- 3498214
seqexbBD2for1	5'-CTTGACTGTTTCCACGGCA-3'	3495444- 3495463
seqexbBD2rev1	5'-CAAGCTCTCACCCCTGGCTGAT-3'	3496914- 3496934
<b>Primer für Klonierung cctonB und ccexbBD1 auf pET27(b)+</b>		
cctonBP1NdeI	5'-CCA/TATGGCCCTGGCCCTGAATCCCAAT-3'	2530215- 2530236
cctonBP2EcoRI	5'-GG/AATTCGTCTGCGTCAAGGGGCTGTCA-3'	2530932- 2530953
CCexbBP1 EcoRI	5'-GG/AATTCTAAGGAGATATATGCTCGACATTA CGGAAGACCCC-3'	2539634- 2539660
CCexbBP2Sall	5'-ACGCG/TCGACCCCTACTGGCTATCATCCCGTC-3'	2538310- 2538332
cctonBP2ohne Stop	5'-GG/AATTCTGTCTGCGTCAAGGGGCTGGGCGCCC GCGTTGAAG-3'	2530916- 2530950
<b>Primer für Klonierung ccexbBD1 in pMR20</b>		
ccexbBD1rev PstI	5'-AACTGCA/GGCGGACTATTCAGAGTTAGGGTGG GAC-3'	2539718- 2539746
ccexbBD1for BamHI	5'-CGG/GATCCCATGCATCACCCCTACTGGCTATC ATC-3'	2538297- 2538326

Tab. 6: Sequenzierprimer

Primer	Sequenz	Position im CC-Genom
pBADfor	5'-AACAAAAGTGTCTATAATCACGGC-3'	141-164 in pBADMycHisB
seqpBADrev	5'-TCAGACCGCTTCTGCGTTCTG-3'	510-530 in pBADMycHisB
2287seqmut	5'-CGACCAGTATCCGTCGGAAATC-3'	2488572- 2488593
2287seqf1	5'-CATCAACGCGGCAATGATC-3'	2488896- 2488915
2287seqf2	5'-GAAGTCCACGAAAGCTTCCT-3'	2489620- 2489639
2287seqf3	5'-CCAGTCGTTCAACCAGAATACC-3'	2490129- 2490151
2287seqf4	5'-GCAAGTTCCTGGGTGAAGTC-3'	2490671- 2490690
cctonseq	5'-AGCGCAGCGCTGAAAATCTCTCGGTTCTTC-3'	2530821- 2530850
exbBDseq	5'-GCATCATGACCTCGTTCATC-3'	2538967- 2538987

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kulturbedingungen von *Caulobacter crescentus*

*Caulobacter crescentus* wurde im Komplexmedium PYE bzw. Minimalmedium M2 mit entsprechender C-Quelle angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Auf Agarplatten war das Wachstum nach 2-3 Tagen sichtbar.

#### 2.2.1.2 Konjugation

Die Transformation von *Caulobacter crescentus* mit Plasmid-DNA erfolgte über Konjugation. Als Donor diente *E. coli* S17-1  $\zeta$  pir. Dazu wurden 1 ml ÜNK des Rezipienten *C. crescentus* mit 100  $\mu$ l ÜNK des Donors, welcher das zu transformierende Plasmid enthielt, vermischt. Nachdem für 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert worden war wurde das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und auf einen auf einer PYE-Platte liegenden Nitrocellulosefilter (0,45  $\mu$ M, Satorius) gegeben. Es folgte eine Inkubation der Platte für 3-4 Stunden bei 30 °C. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PYE vom Filter runtergewaschen, 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Gegen den Donor *E. coli* wurde mit Nalidixinsäure (20  $\mu$ g/ml) selektiert. Konjuganten wuchsen nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30 °C.

#### 2.2.1.3 Wachstumstests

Für Wachstumsstimulations- bzw. Wachstumsinhibitionstests mit Maltodextrinen, Siderophoren, Acarbose und Phagen wurde eine ÜNK des zu untersuchenden Stammes oder eines Indikatorstammes auf eine Zelldichte von  $OD_{578} = 1,0$  eingestellt. 100  $\mu$ l davon wurden mit 3 ml vorgewärmtem Topagar (50 °C) gemischt und auf eine Agarplatte gegossen. Nach Abkühlen des Topagars wurden Filterplättchen ( $\cdot$  = 6 mm, Schleicher & Schuell), die zuvor mit 10  $\mu$ l der zu testenden Substanz getränkt und anschließend getrocknet worden waren, aufgelegt.

## 2.2.2 DNA-Methoden

### 2.2.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA

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

### 2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

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

### 2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik (Saiki *et al.* 1988) wurde angewandt, um plasmid- und chromosomal-codierte Gensequenzen zu amplifizieren. 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 und dTTP
10 %	10 x Reaktionspuffer
10 %	DMSO
1 U	DNA-Polymerase [ <i>Taq</i> (Peqlab, Erlangen); <i>Taq/Tgo</i> , Expand High Fidelity und Expand Long Template PCR System (Roche, Basel)]

Die Amplifikation erfolgte im Personal Cycler 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 1 min Denaturieren 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*, wobei jedoch

die Annealingtemperatur bei 65 °C startete und sich mit jedem Zyklus um 0,5 °C erniedrigte. Somit konnte die optimale Annealingtemperatur erreicht werden.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel überprüft und mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits (Macherey Nagel, Düren) isoliert.

#### **2.2.2.4 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 waren 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 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der von Dangert und Ehrlich (1979) beschriebenen CaCl<sub>2</sub>-Methode. Die Transformation wurde nach der Anleitung von Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt. Dabei wurden die kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA zuerst 30 min auf Eis und anschließend 90 sec bei 42 °C inkubiert. Vor dem Ausplattieren erfolgte eine 30 bis 90 minütige Inkubation in 1,5 ml TY-Medium bei 37 °C zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz der transformierten Zellen. Die Zellen wurden danach auf Selektionsplatten ausplattiert.

#### **2.2.2.5 Konstruktion chromosomaler Mutanten in *C. crescentus***

Die chromosomale Mutagenese erfolgte nach der in Jenal und Fuchs (1998) beschriebenen Methode. Nach dem Prinzip der homologen Rekombination wird das entsprechende Gen in zwei Schritten durch eine Resistenzkassette ersetzt. Bei dem verwendeten Vektor pNPTS138Tet handelt es sich um einen Vektor, der in *C. crescentus* nur repliziert wird, nachdem er ins Genom integrieren konnte. Es wurde ein Plasmid konstruiert, welches die stromauf- und -abwärts angrenzenden Genbereiche des zu deletierenden Gens enthält. Desweiteren wurden die beiden Genbereiche durch eine Resistenzkassette miteinander verbunden. Im ersten Rekombinationsereignis inseriert das Plasmid über homologe

Genbereiche vollständig ins Chromosom. Im zweiten Rekombinationsereignis dient das *sacB*-Gen, welches sich auf dem verwendeten Vektor pNPTS138Tet befindet, als Marker für die positive Selektion auf den Verlust des Vektoranteils. *SacB* 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 wird im idealen Fall das intakte chromosomale Gen durch eine Resistenzkassette ersetzt.

In Anhang 1 ist die schematische Darstellung der Konstruktion der im folgenden beschriebenen Mutanten abgebildet.

#### 2.2.2.5.1 Die *malA::T*- Mutante HB2003

Zunächst wurden die 1,2 kb (*cc2286*) bzw. 1,4 kb (*cc2288*) großen angrenzenden Genbereiche von *malA* (*cc2287*) über PCR mit Hilfe der Primer P1rNotI/P1rBglII bzw. P2fBglII/P2rNotI amplifiziert. Nach Verdau der PCR-Produkte mit *BglII* und anschließender Ligation wurde der Ligationsansatz als Template für die Amplifikation des 2,6 kb großen DNA-Fragmentes *cc2286cc2288* mit den Primern P1rNotI und P2rNotI eingesetzt. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pDrive zwischenkloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde mit *BglII* linearisiert und mit Klenow-Fragment behandelt. Dadurch konnte die  $\text{Spc}^{\text{R}}/\text{Str}^{\text{R}}$ -Kassette T (2 kb-*SmaI*-Fragment aus pHP45T) über die blunt-Schnittstelle zwischen *cc2286* und *cc2288* inserieren. Nach Amplifikation von *cc2286Tcc2288* 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*- $\text{Tet}^{\text{R}}$ -Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pHB138 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1  $\zeta$  pir eingeschleußt und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* JS1003 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde gegen den Donor und mit Spectinomycin/Streptomycin auf die Integration von pHB138 ins Caulobactergenom selektioniert, so dass lediglich Kolonien des Stammes JS1003 mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Mit 3 % Saccharose wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *malA*-Gen selektioniert. Die Kolonien wurden auf  $\text{Tet}^{\text{S}}$  getestet und abschließend über PCR mit den Primern P1fSpeI/P2rSpeI und 2287EcoRVfor/2287EcoRVrev kontrolliert. Im Falle von *malA::T* wies das PCR-Produkt des Primerpaars P1fSpeI/P2rSpeI eine Größe von 4,6 kb im Vergleich zum 5,3 kb großen Wildtyp PCR-Fragment auf. Das PCR-Produkt der Primer 2287EcoRVfor/2287EcoRVrev zeigte bei der *malA::T*-Mutante eine

Größe von 2,1 kb im Gegensatz zur Wildtyp-Bande von 2,9 kb. Die *malA*-Deletion wurde schließlich durch Sequenzierung überprüft.

Die resultierende *malA::T* -Mutante wurde HB2003 genannt.

#### 2.2.2.5.2 Die *tonB::T*-Mutante HB2004

Hier wurden die 1 kb (*cc2326*) bzw. 1,3 kb (*cc2328*) großen angrenzenden DNA-Bereiche von *tonB* (*cc2327*) über PCR mit Hilfe der Primer CCP1forSpeI/CCP1revEcoRV bzw. CCP2forEcoRV/CCP2revNdeI amplifiziert. Nach Verdau der Produkte mit *EcoRV* und anschließender Ligation wurde das Ligationsprodukt als template für die Amplifikation des 2,3 kb großen DNA-Fragmentes *cc2326cc2328* mit den Primern CCP1forSpeI und CCP2revSpeI eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pDrive zwischenkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert und mit Klenow-Fragment behandelt. Durch die entstandene blunt-end-Schnittstelle konnte die Spc<sup>R</sup>/Str<sup>R</sup>-Kassette T (2 kb-*SmaI*-Fragment aus pHP45T) zwischen *cc2326* und *cc2328* inserieren. Das *cc2326TCC2328*-Fragment wurde über *SpeI* herausgeschnitten und in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet (pNPTS138 mit 1,4 kb *MluI*-Tet<sup>R</sup>-Fragment aus pBSL204) kloniert. Das resultierende Plasmid pHB139 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1  $\zeta$  pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* JS1003 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde auf den Rezipienten und mit Spectinomycin/Streptomycin auf die Integration von pHB139 selektioniert, so dass lediglich Kolonien des Stammes JS1003 mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Mit 3 % Saccharose wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *tonB*-Gen selektioniert. Die Kolonien wurden auf Tet<sup>S</sup> getestet und abschließend über PCR mit den Primern CCPfor und CCPrev kontrolliert. Im Falle von *tonB::T* zeigte das PCR-Produkt eine Größe von 2,1 kb im Vergleich zum 1,1 kb großen Wildtyp PCR-Fragment. Die resultierende *tonB::T* -Mutante wurde HB2004 genannt. Zusätzlich wurde die *tonB*-Deletion durch Sequenzierung und Southern Blot (2.2.2.6) kontrolliert. Die für den Southern Blot hergestellte *tonB*-Sonde wurde mit Hilfe der Primer cctonBP1NdeI und cctonBP2EcoRI über PCR von chromosomaler *Caulobacter*-DNA amplifiziert. Die genomische DNA von HB2004 wurde vor dem Agarosegelauftrag mit *BamHI* bzw. *BamHI* und *NotI* verdaut.

### 2.2.2.5.3 Die *tonB*::T *exbBD1*::Gm<sup>R</sup>-Doppelmutante HB2006

Als Ausgangsstamm wurde die *tonB*::T-Mutante HB2004 verwendet.

Für die *exbBD1*-Deletion (*cc2335-cc2336*) wurden die angrenzenden 1 kb (*cc2334*) bzw. 1,25 kb (*cc2337*) großen DNA-Bereiche über PCR mit Hilfe der Primer *ccexbBD1\_P1SpeI/ccexbBD1\_P2EcoRV* bzw. *ccexbBD1\_P3EcoRV/ccexbBD1\_P4aBamHI* amplifiziert. Nachdem die PCR-Produkte mit *EcoRV* verdaut und ligiert wurden, wurde das Ligationsprodukt als template für die Amplifikation des 2,25 kb großen DNA-Fragmentes *cc2334cc2337* mit den Primern *ccexbBD1\_P1SpeI* und *ccexbBD1\_P4SpeI* eingesetzt. Es folgte die Zwischenklonierung des PCR-Produktes in pDrive. Das Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert und mit Klenow-Fragment behandelt. Daraufhin konnte über Blunt-End das Gm<sup>R</sup>-Gen (0,6 kb *MluI*-Fragment aus pBSL202, mit Klenow-Fragment behandelt) zwischen *cc2334* und *cc2337* inserieren. Das *cc2334Gm<sup>R</sup>cc2337*-Fragment wurde über *SpeI* herausgeschnitten und in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet kloniert.

Das resultierende Plasmid pHB140 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1  $\zeta$  pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* HB2004 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde auf den Rezipienten und mit Spectinomycin/Streptomycin auf die Integration von pHB140 selektioniert, so dass lediglich Kolonien des Rezipientenstammes mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Mit 3 % Saccharose wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *exbBD1*-Gen selektioniert. Die Kolonien wurden auf Tet<sup>S</sup> getestet und abschließend über PCR mit den Primern *ccexbBD1\_P1SpeI* und *ccexbBD1\_P4SpeI* kontrolliert. Im Falle von *exbBD1*::Gm<sup>R</sup> zeigte das PCR-Produkt eine Größe von 2,8 kb im Vergleich zum 3,5 kb großen Wildtyp PCR-Fragment. Die *exbBD1*-Deletion wurde abschließend durch Sequenzierung überprüft.

Die resultierende *tonB*::T, *exbBD1*::Gm<sup>R</sup>-Doppelmutante wurde HB2006 genannt.

### 2.2.2.5.4 Die *exbBD1*::Gm<sup>R</sup>-Mutante HB2007

Die Konstruktion von HB2007 erfolgte wie unter 2.2.2.5.2 beschrieben, außer dass als Rezipient der Stamm JS1003 gewählt wurde. Die *exbBD1*::Gm<sup>R</sup>-Mutante wurde HB2007 genannt.

### 2.2.2.5.5 Versuch der Konstruktion von *exbBD2::T* bzw. *exbBD2::Gm<sup>R</sup>* in JS1003

Für die *exbBD2*-Deletion (*cc3232-cc3233*) wurden die angrenzenden 1 kb (*cc3231*) bzw. 1,4 kb (*cc3234*) großen DNA-Bereiche über PCR mit Hilfe der Primer *ccexbBD2\_P1SpeI/ccexbBD2\_P2EcoRV* bzw. *ccexbBD2\_P3EcoRV/ccexbBD2\_P4aBamHI* amplifiziert. Nachdem die PCR-Produkte mit *EcoRV* verdaut und ligiert wurden, wurde das Ligationsprodukt als template für die Amplifikation des 2,4 kb großen DNA-Fragmentes *cc3231cc3234* mit den Primern *ccexbBD2\_P1SpeI* und *ccexbBD2\_P4SpeI* eingesetzt. Es folgte die Zwischenklonierung des PCR-Produktes in pDrive. Das Plasmid wurde mit *EcoRV* linearisiert und mit Klenow-Fragment behandelt. Daraufhin konnte über Blunt-End das *Gm<sup>R</sup>*-Gen (0,6 kb *MluI*-Fragment aus pBSL202, mit Klenow-Fragment behandelt) bzw. T (2 kb *SmaI*-Fragment aus pHP45T) zwischen *cc3231* und *cc3234* inserieren. Das *cc3231Gm<sup>R</sup>cc3234-* bzw. das *cc3231Tcc3234*-Fragment wurde jeweils über *SpeI* herausgeschnitten und jeweils in den *SpeI*-linearisierten Vektor pNPTS138Tet kloniert.

Das resultierende Plasmid pHB141 bzw. pHB142 wurde in den *E. coli*-Stamm S17-1  $\zeta$  pir transformiert und über Konjugation (2.2.1.2) in den Rezipientenstamm *C. crescentus* JS1003 bzw. HB2004 übertragen. Mit Nalidixinsäure wurde auf den Rezipienten und mit Spectinomycin/Streptomycin auf die Integration von pHB141 bzw. pHB142 selektioniert, so dass lediglich Kolonien des Rezipientenstammes mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Mit 3 % Saccharose wurde auf das zweite Rekombinationsereignis und den Verlust des *sacB*-Gens mitsamt Plasmid und dem chromosomalen, intakten *exbBD2*-Gen selektioniert. Die Kolonien wurden auf Tet<sup>S</sup> getestet und abschließend über PCR mit den Primern *seqexbBD2for1* und *seqexbBD2rev1* kontrolliert. Im Falle von *exbBD2::T* bzw. *exbBD2::Gm<sup>R</sup>* sollte das PCR-Produkt eine Größe von 2,2 kb bzw. 1 kb im Vergleich zum 1,5 kb großen Wildtyp PCR-Fragment aufweisen.

### 2.2.2.6 Southern Blot, Hybridisierung und Detektion

Der Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Biodyne A-Nylonmembranen (Pall) erfolgte nach dem Vakuum-Blot-Verfahren mit einer VacuGene 2016-Apparatur (LKB) entsprechend den Herstellerangaben. Bei einem Unterdruck von 40 mbar wurden folgende Lösungen nacheinander auf das Gel pipettiert: Mit 0,25 M HCl wurde die DNA depuriniert, nach dem Farbumschlag wurde mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert und abschließend mit 3 M Natriumcitrat pH 5,5 neutralisiert. Geblottet wurde für 1 h mit 20 x SSC. Um die

DNA an die Membran zu fixieren, wurde sie 2 Minuten mit einem Mighty Bright-UV-Transilluminator (Hoefer) bestrahlt. Die nachfolgenden Schritte wurden in einem Hybridisierungsofen Mini Oven MK II (MWG) durchgeführt. Die Membran wurde für mindestens 2 h mit 20 ml Hybridisierungslösung (5 x SSC, 2 % Blockierungsreagenz (Boehringer), 0,1 % Lauroylsarkosin, 0,02 % SDS) bei 68 °C vorhybridisiert. Die DNA-Sonde wurde mit Hilfe des DIG DNA Labeling Kits (Boehringer) nach Angaben des Herstellers mit Digoxigenin markiert. Die vorhybridisierte Membran wurde über Nacht mit der hitzedenaturierten DNA-Sonde in 2,5 ml Hybridisierungslösung bei 68 °C inkubiert. Die Membran wurde bei RT zweimal je 5 min mit 50 ml 2 x SSC, 0,1 % SDS und zweimal je 15 min mit 50 ml 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern, konjugiert an alkalische Phosphatase (Boehringer) und CSPD (Boehringer) als Substrat für die alkalische Phosphatase nach Herstellerangaben. Die markierten DNA-Fragmente wurden mit einem Röntgenfilm X-Omat DS (Kodak) detektiert.

### **2.2.3 Protein-Techniken**

#### **2.2.3.1 Isolierung der äußeren Membran von *Caulobacter crescentus***

2x 500 ml PYE-Medium bzw. 4x 500 ml M2G und M2M-Medium wurden mit jeweils 20 ml ÜNK versetzt und bei 30 °C für 2-3 Tage inkubiert. Nach Einstellung von 500 ml Kulturvolumen auf eine OD von 0,8 wurden die Zellen bei 10000 g für 20 min abzentrifugiert. Nach Waschen mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 wurden die Zellen in je 20 ml Frenchpress-Puffer resuspendiert. Es folgte der Zellaufschluss mittels Frenchpress in 3 Durchgängen á 16000 psi. Nichtaufgeschlossene Zellen wurden zweimal durch 20 minütige Zentrifugation bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 20 ml Extraktionspuffer versetzt. Die Methode zur Isolierung der äußeren Membran beruht auf einer geringeren Empfindlichkeit der äußeren Membran im Vergleich zur inneren Membran gegenüber Triton X-100 in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> nach dem Zellaufschluss. Nach einer 60 minütigen Zentrifugation bei 18000 rpm wurde das Pellet, welches die äußere Membranfraktion darstellt zweimal mit je 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde abschließend in 200-500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.3.2 Proteinbestimmung

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

### 2.2.3.3 Überexpression von Proteinen

Die Überexpression erfolgte sowohl mit Hilfe des Arabinose-regulierten Expressionsvektors pBAD/MycHisB als auch mit Hilfe des T7-Expressionsvektor pET-27b(+) im Stamm BL21 (DE) omp8. Bei der Überexpression von MalA mittels pBAD/MycHisB wurden 200 ml Kulturvolumen mit 2 ml ÜNK angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5 wurde mit 0,002 % L-Arabinose induziert und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach auf eine OD<sub>578</sub> von 0,5 eingestellt und bei 4000 rpm 10 min abzentrifugiert.

Bei der Überexpression von TonB und ExbBD mittels pET-27b(+) wurden 50 ml Kulturvolumen mit 500 µl ÜNK angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert und 2 Stunden bei 37 °C weitergeschüttelt. Die Zellen wurden dann auf eine OD von 0,5<sub>578</sub> eingestellt und bei 4000 rpm 10 min abzentrifugiert.

### 2.2.3.4 Isolierung der äußeren Membran von *E. coli*

Die unter 2.2.3.3 abzentrifugierten überexprimierten Zellen wurden in 15 ml Frenchpress-Puffer resuspendiert. Es folgte der Zellaufschluss mittels Frenchpress in 1-2 Durchgängen á 16000 psi. Nichtaufgeschlossene 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 H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde abschließend in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert bzw. zur Aufreinigung (2.2.3.5) eingesetzt.

### 2.2.3.5 Aufreinigung von MalAHis<sub>6</sub>

Die äußere Membranpräparation aus 200 ml Kulturvolumen (2.2.3.4) wurde in 2,5 ml Solubilisierungspuffer mit 1 % SDS (native Bedingungen; 2.1.4.6) bzw. 8 M Harnstoff (Lysepuffer, denaturierende Bedingungen; 2.1.4.6) suspendiert und über Nacht bei 12 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C 20 min bei 14000 rpm abgefugt. Im Überstand befanden sich die durch das Detergenz aus der äußeren Membran herausgelösten Proteine bzw. MalAHis<sub>6</sub>. Das Solubilisat wurde mit Hilfe von PD10-Säulen (Amersham Biosciences) umgepuffert, wobei die löslichen Proteine danach in Lysepuffer mit 0,2 % SDS bzw. 8 M Harnstoff vorlagen. Die umgepufferten Proben wurden anschließend mit Zentrifugationsfiltrerröhrchen (Amicon) auf 600 µl Volumen eingeeengt. MalAHis<sub>6</sub> wurde 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, in dem 2 min bei 700 x g zentrifugiert wurde. Pro Säule wurden 600 µl des konzentrierten Protein-Solubilisats geladen und ebenfalls 2 min bei 700 x g zentrifugiert. Mit je 600 µl Waschpuffer wurden unspezifisch gebundene Proteine durch 2 x 2 min Zentrifugation bei 700 x g ausgewaschen. Die Elution des His-Tag-Proteins MalAHis<sub>6</sub> erfolgte mit 2 x 100 µl Elutionspuffer durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 700 x g. Um die Löslichkeit zu bewahren wurden die 0,2 % SDS enthaltenen Proteinfractionen bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.2.3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

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 erzielt. Dazu wurden die Proben 1:1 mit SDS-PAGE-Auftragungspuffer versetzt und vor dem Gelauftrag 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Für das Proteingel wurden jeweils 15 µl Probe eingesetzt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine 10 kDa-Proteinleiter von Fermentas. Die angelegte Stromstärke betrug 25 mA. Das Anfärben der Proteine erfolgte für 40 min in der Färbelösung. Die Entfärbung fand unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung statt.

### 2.2.3.7 Western Blot

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einer Trans-Blot-Apparatur (Bio-Rad) bei 4 °C für 2 Stunden bei 200 mA elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µM, Schleicher & Schuell) übertragen. Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde der vorgefärbte Molekulargewichtsstandard der Firma Fermentas verwendet.

### 2.2.3.8 Immunologischer Nachweis

Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran erfolgte zunächst eine Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C in 3 % BSA/TNT-Puffer, bevor die Bindung mit dem Primärantikörper (antiHis<sub>6</sub>-mAK) in 30 ml TNT-Puffer mit 1 % BSA für 1,5 h bei RT erfolgte. Danach wurde die Membran dreimal mit TNT-Puffer für je 10 min gewaschen. Es folgte eine 90 minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-mAK-AP) in 30 ml TNT-Puffer mit 1 % BSA. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer für je 10 min wurden die mit Antikörper markierten Proteinbanden durch die Detektionslösung sichtbar gemacht. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit bidestilliertem Wasser gestoppt.

### 2.2.3.9 Kanalmessung in „black lipid“-Membranen

Die Experimente zur Kanalmessung von MalA 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 mm<sup>2</sup> großen Loch in zwei 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, 1 M LiCl, 1 M KAc) 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 MalA-Proben zugegeben. Außerdem wurde in jedes Kompartiment eine Kalomelektrode 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.

### **2.2.3.10 2-D-Gelelektrophorese**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde am Zellbiologischen Institut bei Prof. Dr. A. Nordheim unter der Anleitung von Dr. W. Kammer durchgeführt.

Bei der 2-D-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In der ersten Dimension wandern die Proteine während der isoelektrischen Fokussierung aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld. Sobald sie ihren isoelektrischen Punkt (pI) erreicht haben wird die Wanderung gestoppt, da Proteine an diesem Punkt nach außen elektrisch neutral sind. In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine während einer SDS-PAGE aufgrund des Molekulargewichts.

#### **2.2.3.10.1 Rehydratisierung der IPG-Streifen**

Um die trockene Gelmatrix der IPG-Streifen zu hydratisieren, wurden die Streifen in Lysepuffer (2.1.4.7) inkubiert. Dazu wurden abgeschnittene 5 ml Plastikpipetten verwendet, in die jeweils ein IPG-Streifen mit der Gelmatrixseite nach unten gelegt wurde. 300  $\mu$ l Lysepuffer wurden vorsichtig an den Rand des IPG-Streifens pipettiert, so dass die gesamte Pufferlösung durch Kapillarkraft in das Gel eingesogen und über Nacht rehydratisiert wurde.

#### **2.2.3.10.2 Probenvorbereitung für die Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)**

Die unter 2.2.3.1 beschriebene äußere Membranfraktion von *Caulobacter crescentus* JS1003 wurde einer Acetonfällung unterzogen, um die Membranproteine aus der Lipidschicht herauszulösen, da die Lipide bei der anschließenden isoelektrischen Fokussierung stören könnten. Dazu wurde die Membranfraktion mit eiskaltem 66 %-igem Aceton im Verhältnis 1:2 vermischt und ÜN bei  $-20$  °C inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und  $4$  °C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100  $\mu$ l 66 %-igem Aceton gewaschen und erneut für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50  $\mu$ l Lysepuffer (2.1.4.7) aufgenommen. Um die Proteine besser in Lösung zu bekommen, wurden die Proben 10 x für 1 sec im Wasserbad beschallt. Um die noch unlöslichen Proteine zu entfernen, wurde für 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der komplette Überstand wurde für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt.

### 2.2.3.10.3 Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden die Immobiline DryStrips (Amersham Pharmacia), pH 4-7, 18 cm verwendet. Die über Nacht rehydratisierten IPG-Streifen wurden mit Millipor-Wasser abgespült, mit einem feuchten Whatmanpapier abgetupft und anschließend in die Multiphor II Kammer gelegt, wobei die saure Seite der Streifens zur Anode und die alkalische Seite zur Kathode zeigte. Der Kontakt zwischen den IPG-Streifen und den Elektroden wurde über feuchte Elektrodenstreifen aus Whatman-Papier vermittelt. Die Streifen wurden mit Öl überschichtet, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Danach wurden die vorbereiteten Proben (2.2.3.10.2) in den Cup-Loading-Aufsatz pipettiert. Am Ende wurden die Elektroden aufgesetzt und der Lauf gestartet.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte für 48 h bei folgenden Parametern:

Spannung [V]	Zeit [h]
150	2
300	5
600	2
1500	2
3500	30
6000	7

Nach dem Lauf konnten die Streifen in Plastikröhrchen überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder gleich für die Equilibrierung eingesetzt werden.

### 2.2.3.10.4 Equilibrierung

Vor dem Start der 2. Dimension wurden die IPG-Streifen für jeweils 20 min in den SDS-haltigen Equilibrierungspuffern 1 und 2 (2.1.4.7) equilibriert, um sie für die SDS-PAGE anzugleichen und eventuell ausgefallene Proteine wieder in Lösung zu bringen. Das im 1. Equilibrierungspuffer enthaltene DTT sollte vorhandene Disulfidbrücken lösen, wobei das überschüssige Reduktionsmittel DTT durch Iodacetamid, welches sich im 2. Equilibrierungspuffer befindet inaktiviert wurde. Die Inaktivierung von DTT verhindert, dass die noch nicht reduzierten Proteine während der Elektrophorese nach und nach reduziert wurden und minimierte auf diese Weise die vertikale Streifenbildung in den gefärbten 2D-Gelen (Gorg *et al.*, 1988).

### 2.2.3.10.5 2. Dimension (SDS-PAGE)

Die Herstellung der SDS-Gele für die 2. Dimension erfolgte im Iso-Dalt-Elektrophoresis Systems Gel Caster nach Angaben des Herstellers. Es wurden zwölf 13 %-ige Gele gegossen. Nach der Equilibrierung wurden die IPG-Streifen jeweils auf ein Polyacrylamidgel gegeben und mit Agarose fixiert. Zusätzlich wurden 4  $\mu$ l Molekulargewichtsstandard auf einem Filterplättchen mitaufgelegt. Der Gellauf erfolgte in der Iso-Dalt-Elektrophorese Kammer über Nacht bei 20  $\text{^\circ C}$  und 250 mA für 18 h.

### 2.2.3.10.6 Färbung der Gele

#### 2.2.3.10.6.1 Silberfärbung

Silber färbt die Proteine unspezifisch an und ist sensitiver als die Coomassie-Färbung (Rabilloud, 1992). Die Silberfärbung ist daher die Methode der Wahl bei Proben mit einer geringen Proteinmenge. Bei dieser Färbung werden die Proteine durch Glutaraldehyd oxidiert und vernetzt, so dass sie anschließend allerdings nicht mehr für die Identifizierung mit dem Massenspektrometer zur Verfügung stehen. Jedes Gel wurde in jeweils 500 ml gewaschen und gefärbt nach folgendem Protokoll:

**Tab. 7: Silberfärbung der 2-D-Gele**

Schritt	Dauer	Lösung für 5000 ml
Fixierer 1	1 h	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Waschen	5 min	Millipore-H <sub>2</sub> O
Fixierer 3	30 min	372 g Natriumacetat, 100 ml 50 % Glutaraldehyd, auffüllen mit Millipore-H <sub>2</sub> O auf 5000 ml
Waschen	3 x 10 min	Millipore-H <sub>2</sub> O
NDS	45 min	2,5 g Naphtalindisulfonsäure in Millipore-H <sub>2</sub> O
Silberreagenz	30 min	20 ml 5 M NaOH, 66,5 ml 25 % Ammoniak, 40 g Silbernitrat (1g/1,5 ml), auffüllen mit Millipore-H <sub>2</sub> O auf 5000 ml
Waschen	3 x 5 min	Millipore-H <sub>2</sub> O
Entwickler	3-5 min	0,5 g Citronensäure, 5 ml Formaldehyd, auffüllen mit Millipore-H <sub>2</sub> O auf 5000 ml
Stopplösung	10 min	100 ml Essigsäure, 250 g Tris, auffüllen mit Millipore-H <sub>2</sub> O auf 5000 ml

### 2.2.3.10.6.2 Coomassie-Färbung

Coomassie ist ein Farbstoff, der unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten des Proteins bindet und keine Redoxreaktionen verursacht.

Dadurch ist es möglich, Proteinspots auch nach der Färbung mit Hilfe des Massenspektrometers zu identifizieren. Allerdings handelt es sich hierbei um eine weniger sensitive Färbemethode.

Die Gele wurden 24-48 h in der Coomassie-Färbelösung (2.1.4.7.2) geschwenkt und anschließend bis zum gewünschten Färbegrad mit Millipore-Wasser entfärbt.

### 2.2.3.11 Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF-MS= Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Massenspektroskopie)

Die Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF-MS-Messung) der auf dem 2-D-Gel sichtbaren Proteinspots wurde am Zellbiologischen Institut bei Prof. Dr. A. Nordheim von Dr. G. Schwarz durchgeführt.

Dabei wurden die ausgeschnittenen Gelspots mit Trypsin verdaut, wodurch jeweils charakteristische Peptidfragmente entstanden. Dieses Peptidgemisch wurde für die MALDI-TOF-MS-Messung im Flugzeitmassenspektrometer eingesetzt und dessen charakteristisches Spektrum aufgenommen. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in den Proteindatenbanken genutzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung des äußeren Membranproteinmusters von *Caulobacter crescentus* in Abhängigkeit von verschiedenen Nährstoffangeboten

Um TonB-abhängige Membranrezeptoren zu finden, die für den aktiven Transport von anderen Substraten als Eisen und Vitamin B<sub>12</sub> verantwortlich sind, sollte untersucht werden, ob das äußere Membranproteinmuster von *C. crescentus* bei Anzucht in verschiedenen Medien variiert bzw. ob es Proteine, insbesondere TonB-abhängige Rezeptorproteine gibt, deren Expression in Abhängigkeit vom jeweiligen Nährstoffangebot hoch- bzw. runterreguliert ist.

Zur Analyse des äußeren Membranproteinmusters von *C. crescentus* wurde die S-Layer-Mutante JS1003 gewählt, die das in der Zellmembran vorkommende Protein RsaA nicht mehr synthetisiert (Edwards und Smit, 1991). RsaA bildet an der Zelloberfläche eine zweidimensionale kristalline Schicht (S-Layer), die für das Bakterium eine Art Schutzschicht darstellt, jedoch für das Wachstum nicht essentiell ist. Da dieses Protein in der äußeren Membran mengenmäßig dominiert, ist es für die Identifizierung weiterer äußerer Membranproteine von Vorteil, mit einer RsaA-Mutante zu arbeiten.

##### 3.1.1 Eindimensionale SDS-PAGE der äußeren Membranproteine von *C. crescentus*

Die äußeren Membranproteine von *C. crescentus* wurden zunächst in einer eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt, um zu sehen, ob auch hier schon Unterschiede im Proteinmuster nach Kultivierung in verschiedenen Medien zu sehen waren. Nach Anzucht von JS1003 in Komplexmedium (PYE) und Minimalmedium mit Glucose als alleinige C-Quelle (M2G) wurde jeweils die äußere Membran isoliert (2.2.3.5) und in einem 13 %-igen SDS-Gel aufgetrennt (2.2.3.6).



**Abb. 1: 13 %-ige SDS-PAGE von äußeren Membranen von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium PYE und Minimalmedium M2G.** Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Die in Abbildung 1 dargestellten Proteinmuster der äußeren Membran von *C. crescentus* nach Kultivierung in Komplexmedium PYE und Minimalmedium M2G zeigen zwischen 66 und 116 kDa eine Häufung von Proteinbanden, die allerdings schlecht aufgetrennt wurden. Dagegen sind im Größenbereich der Porine (~30 kDa) weniger Proteine zu beobachten. Die Proteinmuster der in PYE und M2G kultivierten Bakterien unterscheiden sich im Bereich der TonB-abhängigen Transporter (~90 kDa) kaum.

### **3.1.2 2-D-Gelelektrophorese der äußeren Membranproteine von *C. crescentus***

Da die Auftrennung der Proteinbanden in der eindimensionalen Auflösung nicht ausreichend war, sollten die Proteinmuster mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Durchführung der 2-D-Gelelektrophorese fand am Zellbiologischen Institut von Prof. Dr. A. Nordheim unter Anleitung von Dr. W. Kammer statt.

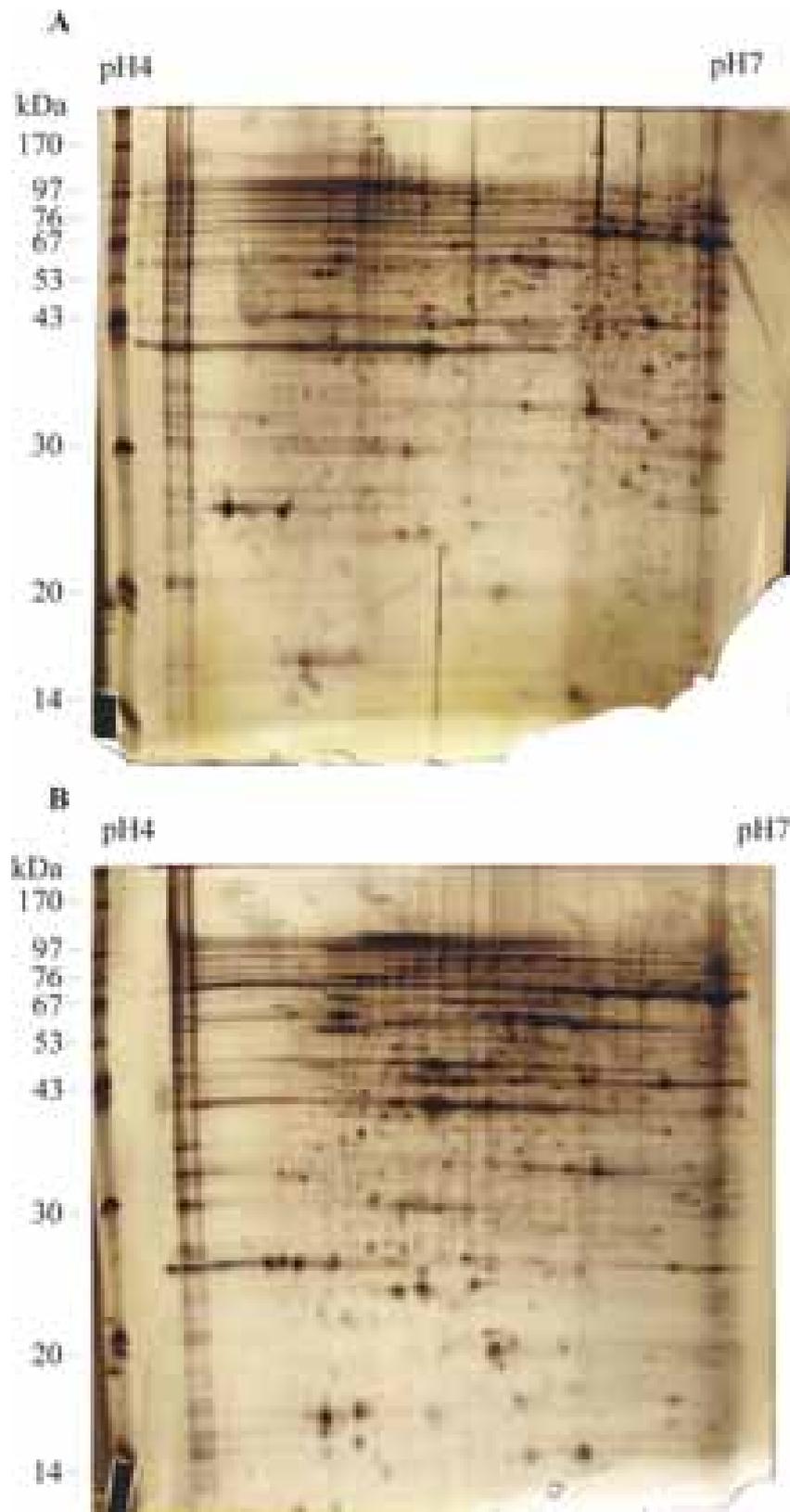
#### **3.1.2.1 Optimierung der Bedingungen für die 2-D-Gelelektrophorese**

Da Membranproteine nicht so einfach in Lösung gebracht und über zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt werden können, sollten zunächst geeignete Bedingungen für die elektrophoretische Auftrennung gefunden werden. Es wurde nach einem Puffer gesucht, der die Proteine am besten in Lösung bringt. Anschließend wurde die Proteinmenge bestimmt, die für eine Silber- bzw. Coomassie-Färbung benötigt wird.

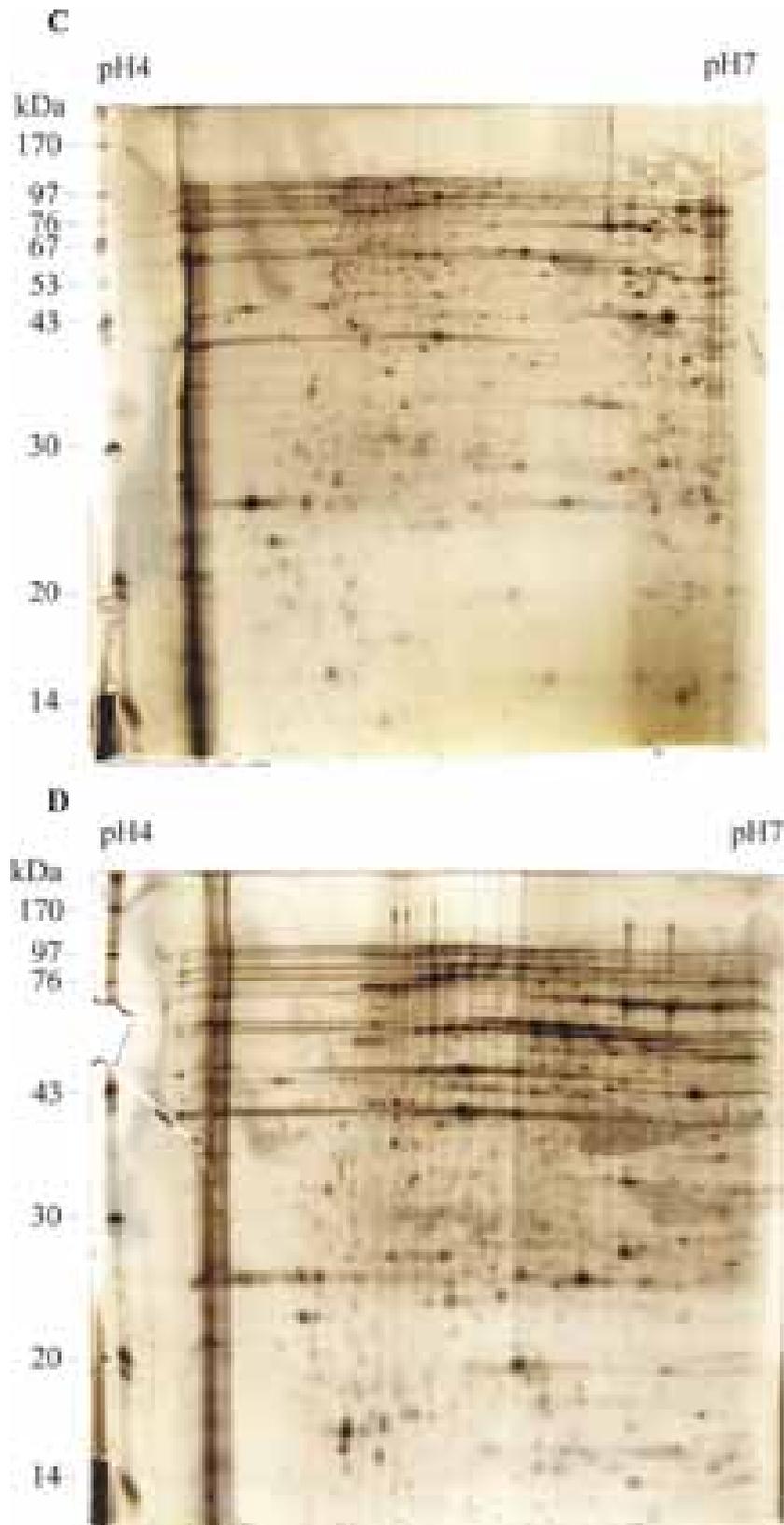
#### **Wahl des Lysepuffers**

Es wurde der in Phadke *et al.*, 2001 beschriebene (Phadke-Lysepuffer) und der am Institut für Zellbiologie bei Prof. A. Nordheim entwickelte Lysepuffer (Molbio-Lysepuffer) getestet (2.1.4.7).

Die äußere Membran von *C. crescentus* wurde nach Anzucht in Komplexmedium (PYE) und Minimalmedium (M2G) isoliert (2.2.3.1) und deren Proteinkonzentration ermittelt (2.2.3.2). Für die Bestimmung des optimalen Lysepuffers wurden jeweils 50 µg Protein eingesetzt. Nach Fällung der Membranproteine mit Aceton (2.2.3.10.2) wurden die Proteinpellets in den entsprechenden Lysepuffern (Phadke- bzw. Molbio-Lysepuffer) resuspendiert und für die Isoelektrische Fokussierung (2.2.3.10.3) eingesetzt. Im Anschluß an die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension (2.2.3.10.5) wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen (2.2.3.10.6.1), da diese Färbung sensitiver als die Coomassie-Färbung ist und somit auch geringe Proteinmengen detektiert werden können.



**Abb. 2a:** Zweidimensionale, Silber-gefärbte SDS-Gele der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Kultivierung in Komplexmedium PYE zur Bestimmung des optimalen Lysepuffers. Es wurden jeweils 50 µg Protein eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 14-170 kDa. Die Proteine wurden in Molbio-Lysepuffer (A) bzw. Phadke-Lysepuffer (B) in Lösung gebracht.

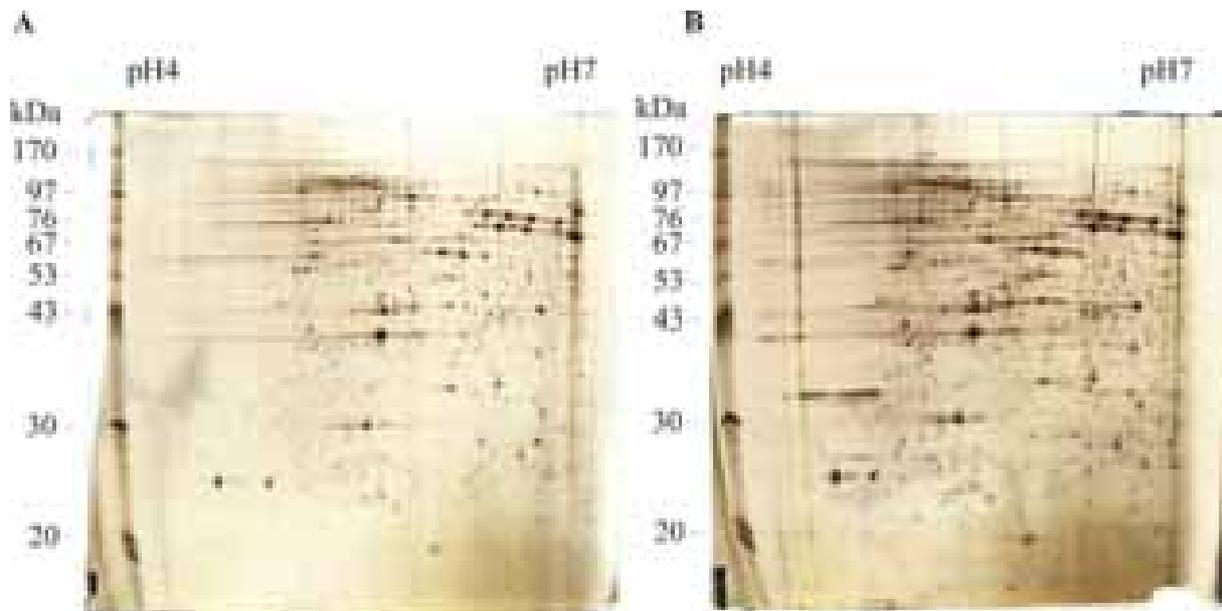


**Abb. 2b:** Zweidimensionale, Silber-gefärbte SDS-Gele der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Kultivierung in Minimalmedium M2G zur Bestimmung des optimalen Lysepuffers. Es wurde jeweils 50 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 14-170 kDa. Die Proteine wurden in Molbio-Lysepuffer (C) und Phadke-Lysepuffer (D) in Lösung gebracht.

Die Membranproteine des in Komplex- (Abb. 2 a) bzw. Minimalmedium (Abb. 2 b) angezogenen Stammes konnten sowohl im Molbio- als auch im Phadke-Lysepuffer solubilisiert und im 2-D-Gel gut aufgetrennt werden. Es fällt allerdings auf, dass bei Verwendung des Molbio-Lysepuffers mehr Proteinspots im sauren und neutralen Bereich zu sehen sind als im Bereich von pH 6. Unter Verwendung des Phadke-Lysepuffers erfolgte die Proteinauftrennung gleichmäßig über den gesamten pH-Bereich. Betrachtet man die 2-D-Gele, deren Proteine mit dem Phadke-Lysepuffer solubilisiert wurden, erkennt man, dass der niedermolekulare Bereich besser aufgetrennt wurde als der höhermolekulare und der neutrale Bereich ziemlich unscharf erscheint. Im Vergleich dazu konnte der höhermolekulare Bereich der in Molbio-Lysepuffer solubilierten Membranproteine etwas besser aufgetrennt werden. Nachteilig zeigen sich die sogenannten „Kettenspots“ der Phadke-Proben. Dabei handelt es sich um duplizierte Proteine, die eine Auftrennung weiterer Proteine in diesem Bereich einschränken. Aufgrund dessen wurden die Membranproteine für weitere 2-D-Gelelektrophoresen im Molbio-Lysepuffer solubilisiert.

### **Bestimmung der optimalen Proteinmenge für Silber-gefärbte Gele**

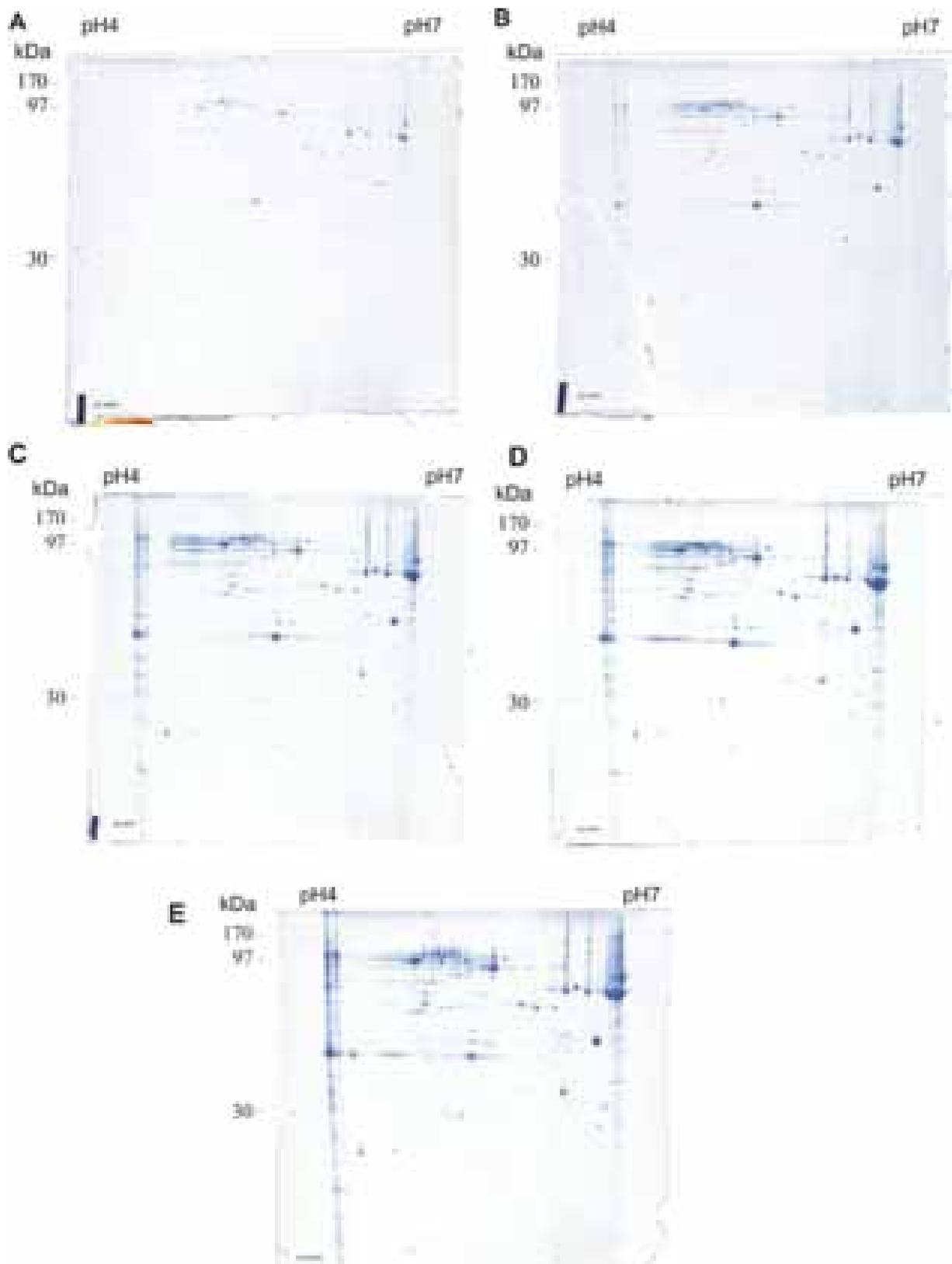
Es wurden 25 und 40 µg Protein der äußeren Membran von *C. crescentus* JS1003, angezogen in PYE-Medium, durch 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, sind bei 40 µg Protein deutlich mehr Proteine aufgetrennt worden als bei 25 µg. In den folgenden 2-D-Gelelektrophoresen wurden somit für Silber-gefärbte Gele 40 µg Protein eingesetzt.



**Abb. 3: Zweidimensionale, Silber-gefärbte SDS-Gele von äußeren Membranproteinen von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium zur Bestimmung der optimalen Proteinmenge.** Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 14-170 kDa (A) entspricht einer Proteinmenge von 25 µg und (B) einer Proteinmenge von 40 µg.

### **Bestimmung der optimalen Proteinmenge für Coomassie-Färbung**

Für die Identifizierung der Proteine durch massenspektrometrische Untersuchungen (MALDI-TOF) können keine Silber-gefärbte, sondern nur Coomassie-gefärbte Proteinspots analysiert werden. Da eine Coomassie-Färbung weniger sensitiv als eine Silberfärbung ist, war es notwendig, diejenige Proteinmenge zu bestimmen, die durch Coomassie ausreichend angefärbt wurde. Nach Anzucht von *C. crescentus* in Komplexmedium (PYE), äußerer Membranisolierung (2.2.3.1) und Proteinkonzentrationsbestimmung (2.2.3.2) wurden jeweils 50 µg, 250 µg, 500 µg, 1 mg und 1,5 mg Protein für die zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt (2.2.3.10.2-2.2.3.10.5). Die 2-D-Gele wurden mit Coomassie angefärbt (2.2.3.10.6.2). Abbildung 4 zeigt, dass beim Einsatz von 1,5 mg Protein das beste Resultat erzielt wurde. Im Folgenden wurden für Coomassie-gefärbte SDS-Gele 1,5 mg Protein eingesetzt.



**Abb. 4: Zweidimensionale, Coomassie-gefärbte SDS-Gele von äußeren Membranproteinen von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium zur Bestimmung der optimalen Proteinmenge.** Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. (A) entspricht einer Proteinmenge von 50 µg, (B) von 250 µg, (C) von 500 µg, (D) von 1 mg und (E) von 1,5 mg.

### **3.1.2.2 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von *C. crescentus* nach Anzucht in verschiedenen Medien mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese**

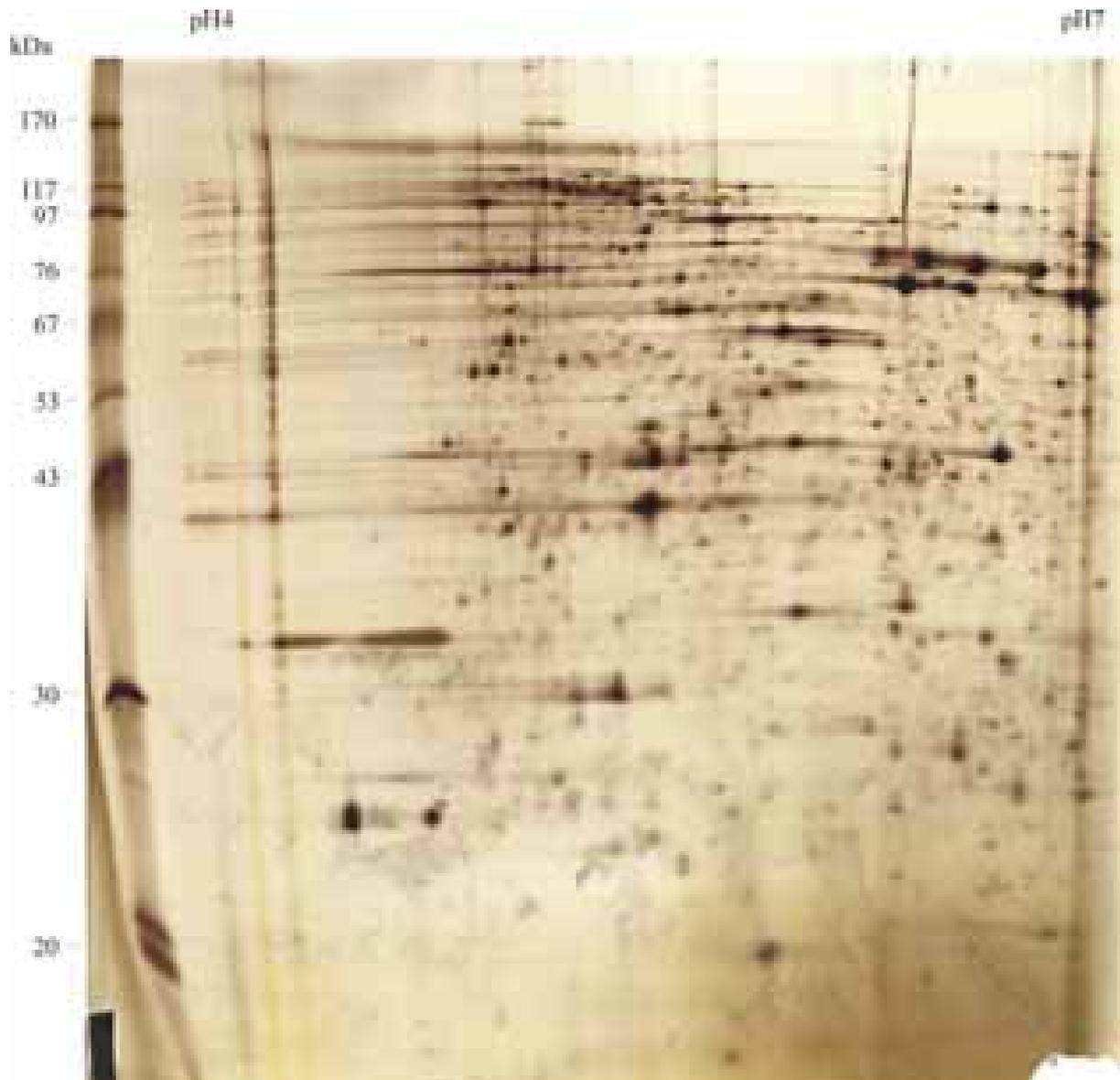
Durch vergleichende Analyse der zweidimensional aufgetrennten äußeren Membranproteine von *C. crescentus* nach Anzucht in verschiedenen Medien sollten Proteine, insbesondere TonB-abhängige Membranrezeptoren gefunden werden, deren Expression unter entsprechendem Nährstoffangebot hoch- bzw. runterreguliert ist.

*C. crescentus* wurde in dem Komplexmedium PYE und den Minimalmedien M2 mit Glucose (M2G) bzw. Maltose (M2M) kultiviert. Die Wahl von Maltose ergab sich aus der Überlegung, dass *E. coli* Maltodextrine durch erleichterte Diffusion mit Hilfe des Proteins LamB durch die äußere Membran schleußt. Aufgrund der Vorhersage von einer großen Anzahl TonB-abhängiger Proteine könnte sich die Maltodextrinaufnahme bei *C. crescentus* im Laufe der Evolution zum aktiven Transport entwickelt haben und durch TonB-abhängige Membranrezeptoren erfolgen.

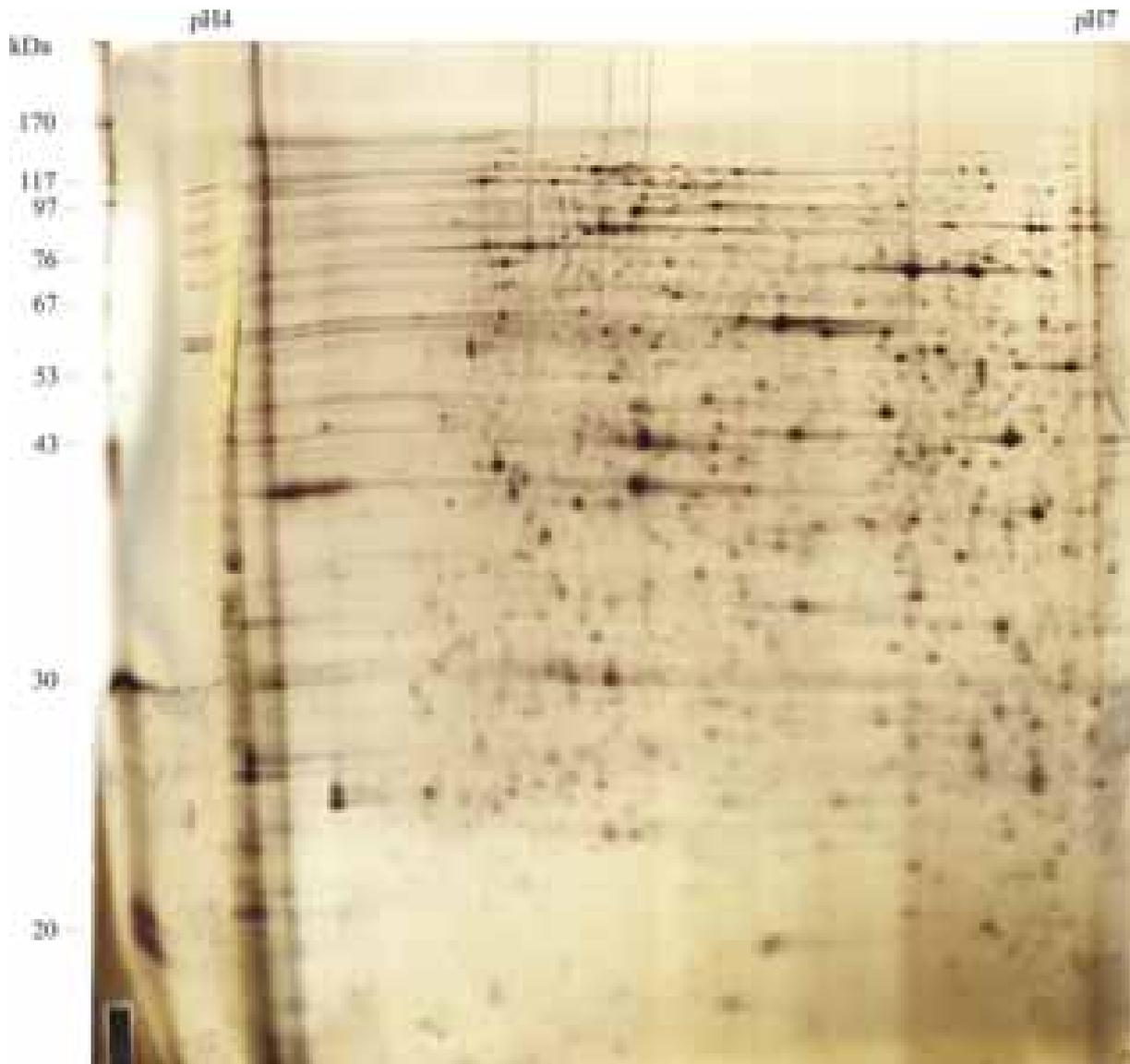
#### **3.1.2.2.1 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von *C. crescentus* anhand von Silber-gefärbten 2-D-Gelen**

Nach Anzucht von *C. crescentus* JS1003 in PYE, M2G und M2M wurden die äußeren Membranen isoliert (2.2.3.1) und für die isoelektrische Fokussierung vorbereitet (2.2.3.10.2). Es wurde jeweils eine Proteinmenge von 40 µg eingesetzt. Im Anschluß an die isoelektrische Fokussierung (2.2.3.10.3, 2.2.3.10.4) folgte die Auftrennung der Membranproteine in der 2. Dimension (2.2.3.10.5). Die 2-D-Gele wurden abschließend einer Silberfärbung unterzogen (2.2.3.10.6.1).

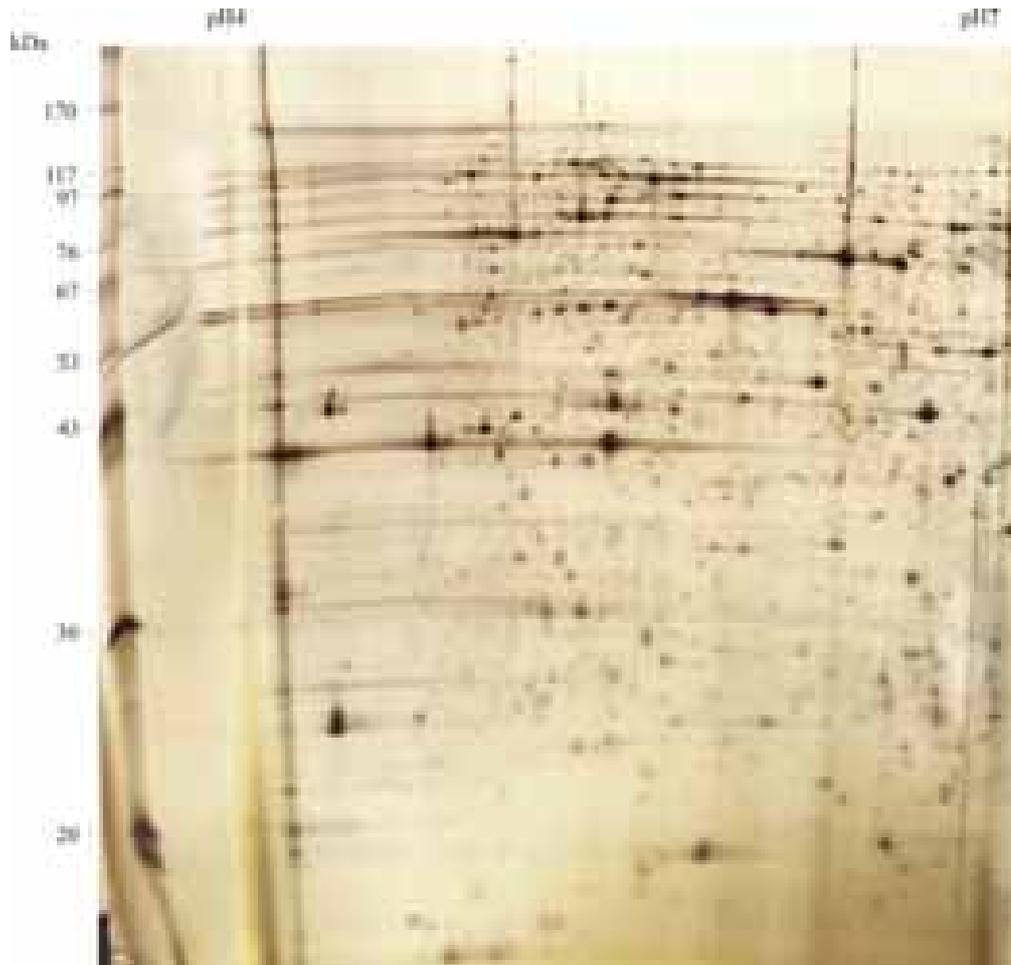
Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, erfolgte die Auftrennung der Proteine jeweils mit drei unabhängig voneinander isolierten Membranpräparationen. In den Abbildungen 5 a-c ist jeweils eines der drei 2-D-Gele dargestellt.



**Abb. 5 a:** 2-D-Gel der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium PYE. Es wurden 40 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. Das 2-D-Gel wurde Silber-gefärbt.



**Abb. 5 b:** 2-D-Gel der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Minimalmedium mit Glucose. Es wurden 40 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. Das 2-D-Gel wurde Silber-gefärbt.

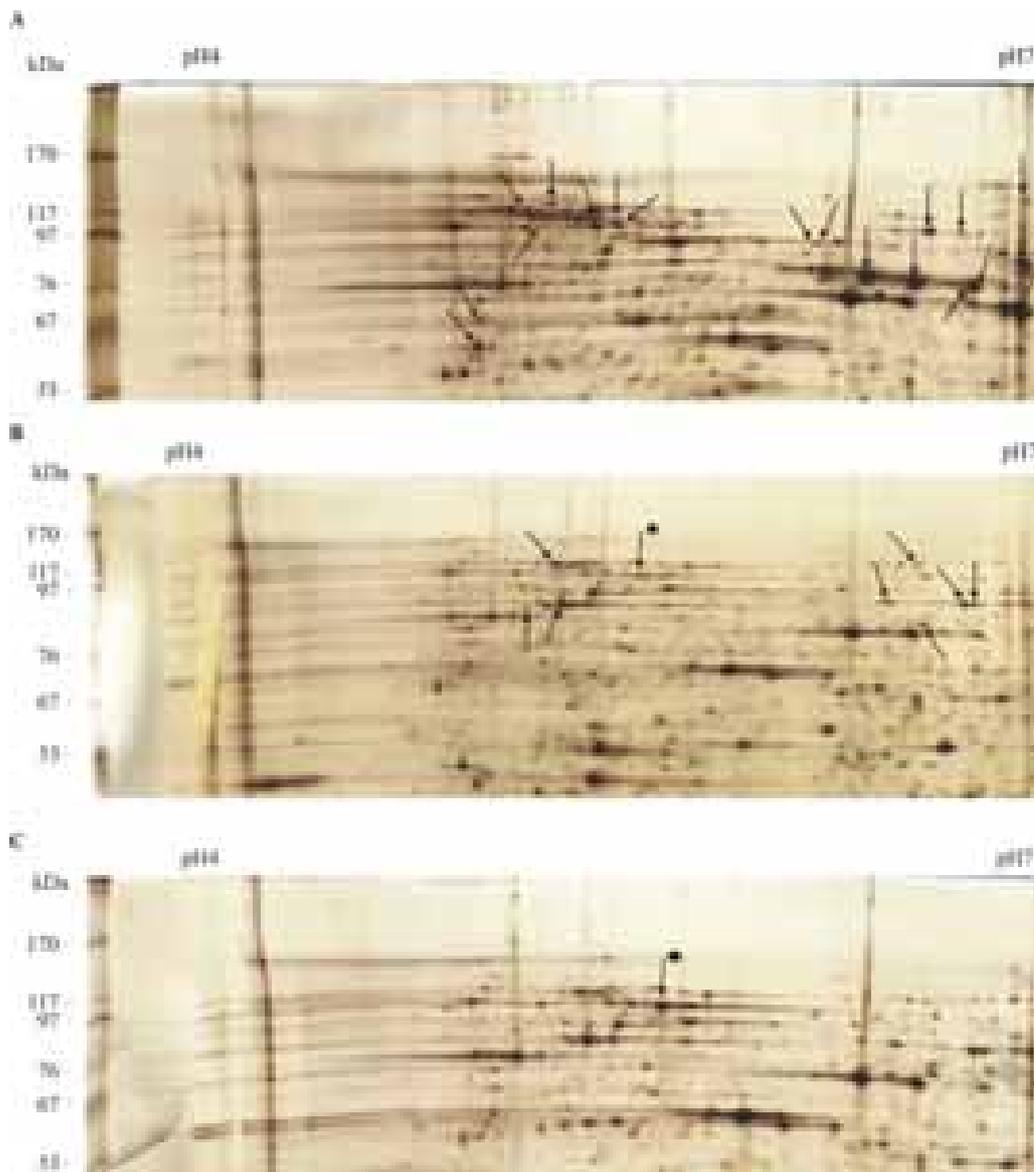


**Abb. 5 c: 2-D-Gel der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1002 nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Maltose.** Es wurden 40  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. Das 2-D-Gel wurde Silber-gefärbt.

Die äußeren Membranproteine von *C. crescentus* ließen sich durch zweidimensionale Gelelektrophorese gut auftrennen. Abbildungen 5 a-c zeigen, dass sich die äußeren Membranproteine sowohl nach Anzucht im Komplexmedium PYE als auch nach Kultivierung in den Minimalmedien M2M und M2G nahezu gleichmäßig über den pH-Bereich von 5-7 und den Größenbereich von 20-170 kDa verteilten. Im sauren Bereich waren deutlich weniger Proteine zu sehen. Bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen traten deutliche Unterschiede in der Zahl und Intensität der Proteine auf. Einige Proteine sind verstärkt exprimiert worden, was sich an intensiv gefärbten und großen Proteinspots zeigt, wohingegen andere Proteine deutlich schwächer exprimiert und weniger intensiv gefärbt wurden. Auffallend ist, dass sowohl bei Anzucht in Komplexmedium als auch Minimalmedium eine große Anzahl an Proteinen zu finden war, die ein Molekulargewicht von über 70 kDa besitzen. Dies findet Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, dass die äußere

Membran von *C. crescentus* eine Vielzahl von Proteinen besitzt, deren Molekulargewicht über 70 kDa liegt (Agabian und Unger, 1978, Phadke *et al.*, 2001). Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse konnte jeweils durch zweidimensionale Auftrennung der äußeren Membranproteine von zwei weiteren unabhängig voneinander isolierten Membranpräparationen bestätigt werden.

Da die gesuchten TonB-abhängigen Membranrezeptoren bei *C. crescentus* im Größenbereich von über 70 kDa erwartet wurden, ist aufgrund des besseren Vergleichs in Abbildung 6 der entsprechende Gelausschnitt der Gele 5 a-c vergrößert dargestellt.



**Abb. 6: Ausschnitte des höhermolekularen Bereiches zwischen 53 und 170 kDa der Silbergefärbten 2-D-Gele aus Abb. 5 a-c.** (A) zeigt die Auftrennung der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium PYE, (B) nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Glucose und (C) nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Maltose. In (A) deuten die Pfeile auf diejenigen Proteine hin, die bei Anzucht in M2G (B) und M2M (C) nicht zu sehen waren. Die Pfeile in (B) deuten auf Proteine hin, die in PYE (A) nicht vorhanden waren. Der mit einem Stern markierte Pfeil zeigt auf jenes Protein, welches nach Anzucht in M2M (C) als einziges Protein im Vergleich zu M2G (B) verstärkt exprimiert worden war.

Kultivierte man *C. crescentus* in Komplexmedium, so wurden äußere Membranproteine exprimiert, welche bei Anzucht unter Minimalbedingungen nicht exprimiert wurden. Die in Abbildung 6 A mit Pfeilen markierten Proteine entsprechen denjenigen Proteinen, die bei Anzucht unter Minimalbedingungen im Größenbereich zwischen 50 und 170 kDa nicht zu sehen waren. Dabei handelte es sich um Proteine, die ihren isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 besitzen und ein Molekulargewicht von 60-120 kDa aufweisen.

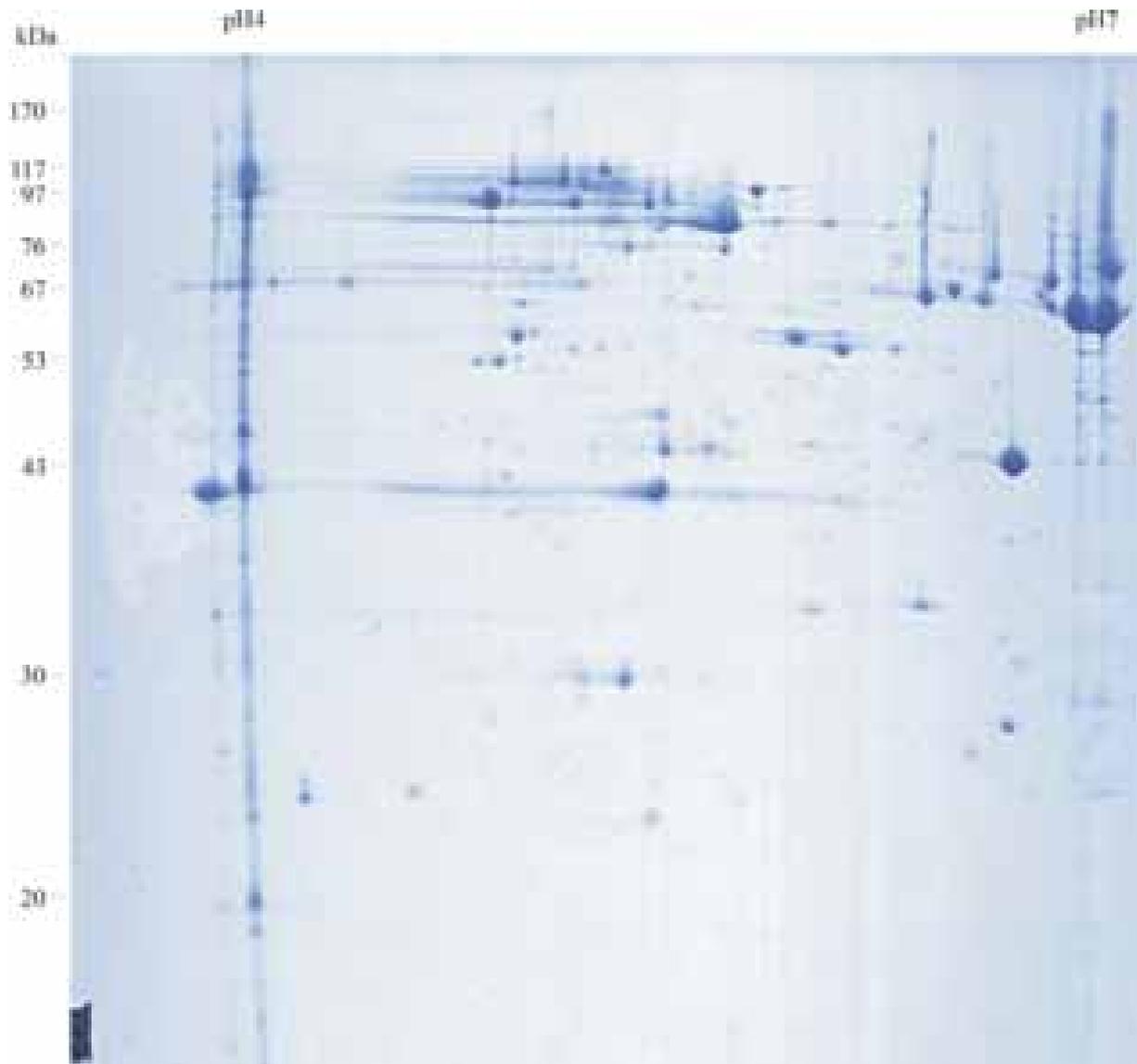
Betrachtet man das äußere Membranproteinmuster der unter Minimalmedium angezogenen Zellen (Abb. 6 B), so waren auch hier Proteine sichtbar, die unter reichen Nährstoffbedingungen in diesem Größenbereich nicht zu sehen waren bzw. schwächer exprimiert worden waren. Dabei handelte es sich um Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 90 und 120 kDa und einem isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7.

Vergleicht man die Proteinmuster der unter Minimalmedium angezogenen Zellen (Abb. 6 B und 6 C), so konnte eine nahezu identische Auftrennung der Proteine beobachtet werden. Allerdings wurde bei Anzucht in Minimalmedium mit Maltose ein Proteinspot um die 100 kDa detektiert, dessen Expression deutlich stärker war als bei Anzucht in Minimalmedium mit Glucose. Dieses Protein ist in Abbildung 6 B bzw. 6 C mit einem durch einen Stern markierten Pfeil gekennzeichnet.

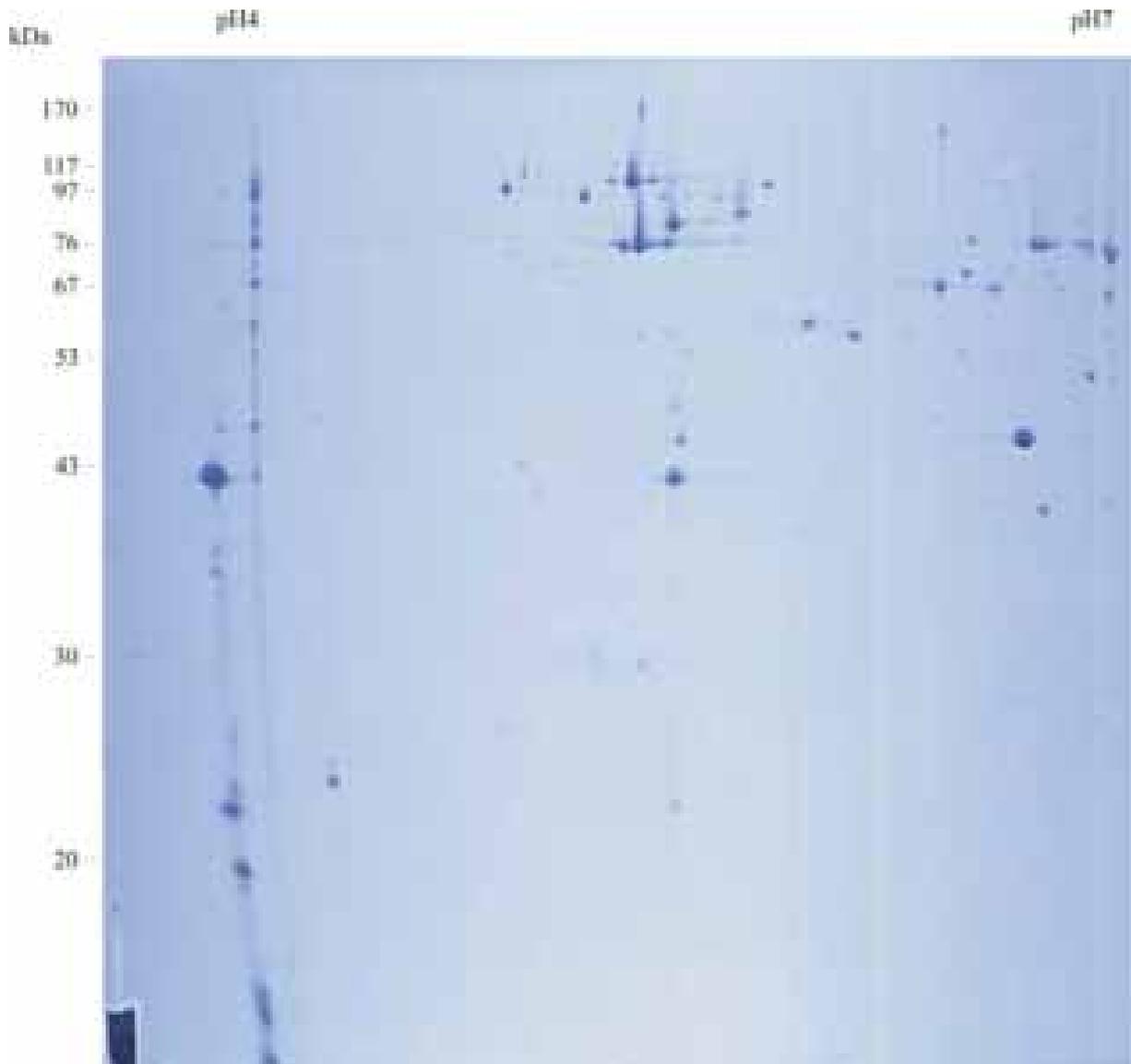
#### **3.1.2.2.2 Vergleich des äußeren Membranproteinmusters von *C. crescentus* anhand von Coomassie-gefärbten 2-D-Gelen**

Um eine Identifizierung der Proteinspots durch massenspektrometrische Analysen (MALDI-TOF) zu ermöglichen, mussten die Proteine mit Coomassie angefärbt werden. Da es sich hierbei jedoch um eine weniger sensitive Färbemethode handelt, war es von Interesse, dieselben interessanten Proteinspots der Silber-gefärbten 2-D-Gele auch auf den weniger sensitiv gefärbten Coomassie-2-D-Gelen wiederzufinden. Die äußeren Membranproteine von *C. crescentus* wurden nach Anzucht in PYE, M2G und M2M isoliert (2.2.3.1), zweidimensional aufgetrennt (2.2.3.10.2-2.2.3.10.5) und mit Coomassie angefärbt (2.2.3.10.6.2). Es wurde jeweils eine Menge von 1,5 mg Protein eingesetzt, wie in Kapitel 3.1.2 bestimmt wurde.

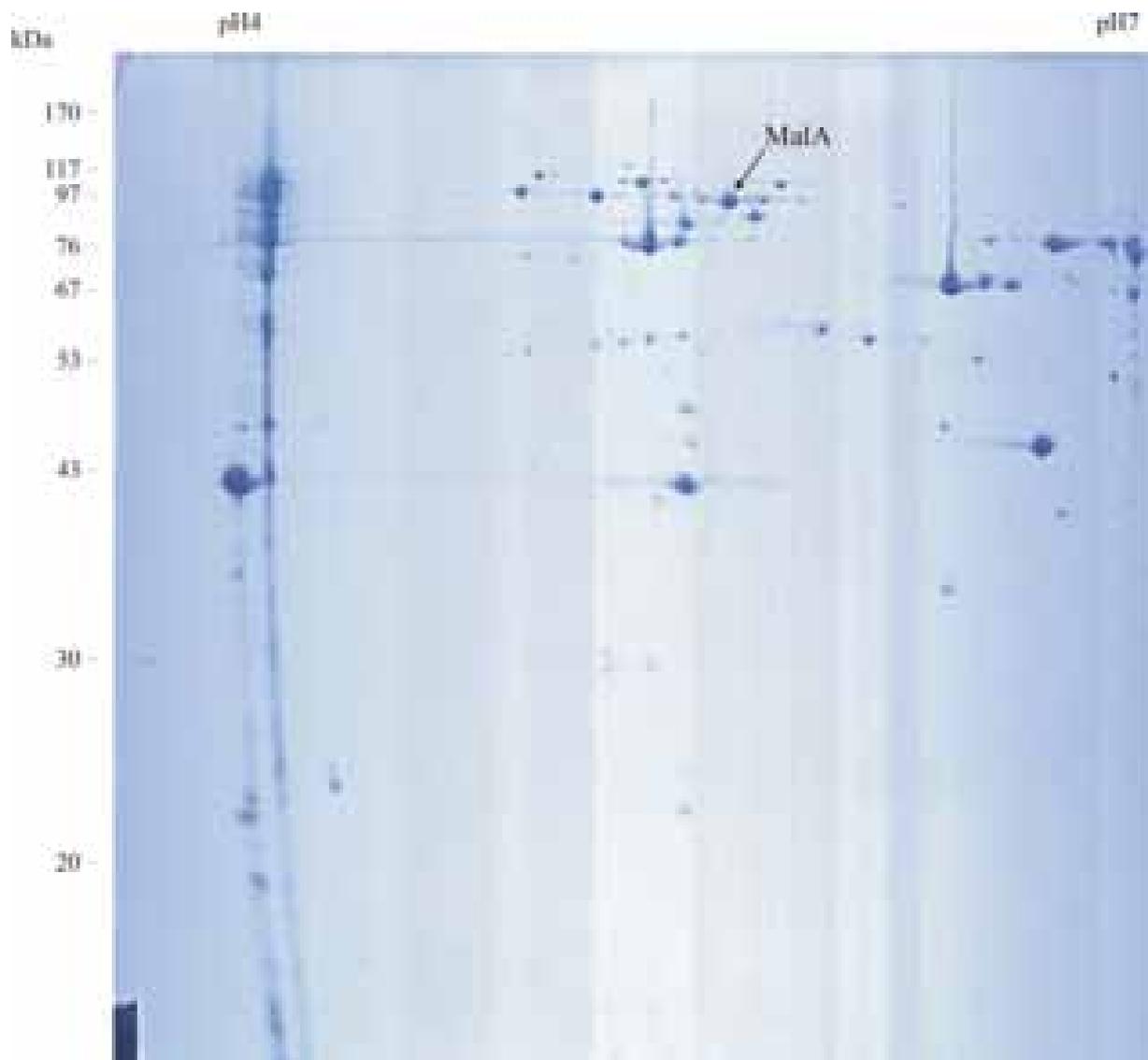
Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, erfolgte die Auftrennung der Proteine jeweils mit drei unabhängig voneinander isolierten Membranpräparationen. In den Abbildungen 7 a-c ist jeweils eines der drei 2-D-Gele dargestellt.



**Abb. 7 a:** 2-D-Gel der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium PYE. Es wurden 1,5 mg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. Das 2-D-Gel wurde Coomassie-gefärbt.



**Abb. 7 b:** 2-D-Gel der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Glucose. Es wurden 1,5 mg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. Das 2-D-Gel wurde Coomassie-gefärbt.



**Abb. 7 c: 2-D-Gel der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Maltose.** Es wurden 1,5 mg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der 1. Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der 2. Dimension im Bereich von 20-170 kDa. Das 2-D-Gel wurde Coomassie-gefärbt. Der Pfeil deutet auf das Protein MalA hin, welches bei Anzucht in M2M-Medium verstärkt exprimiert worden war

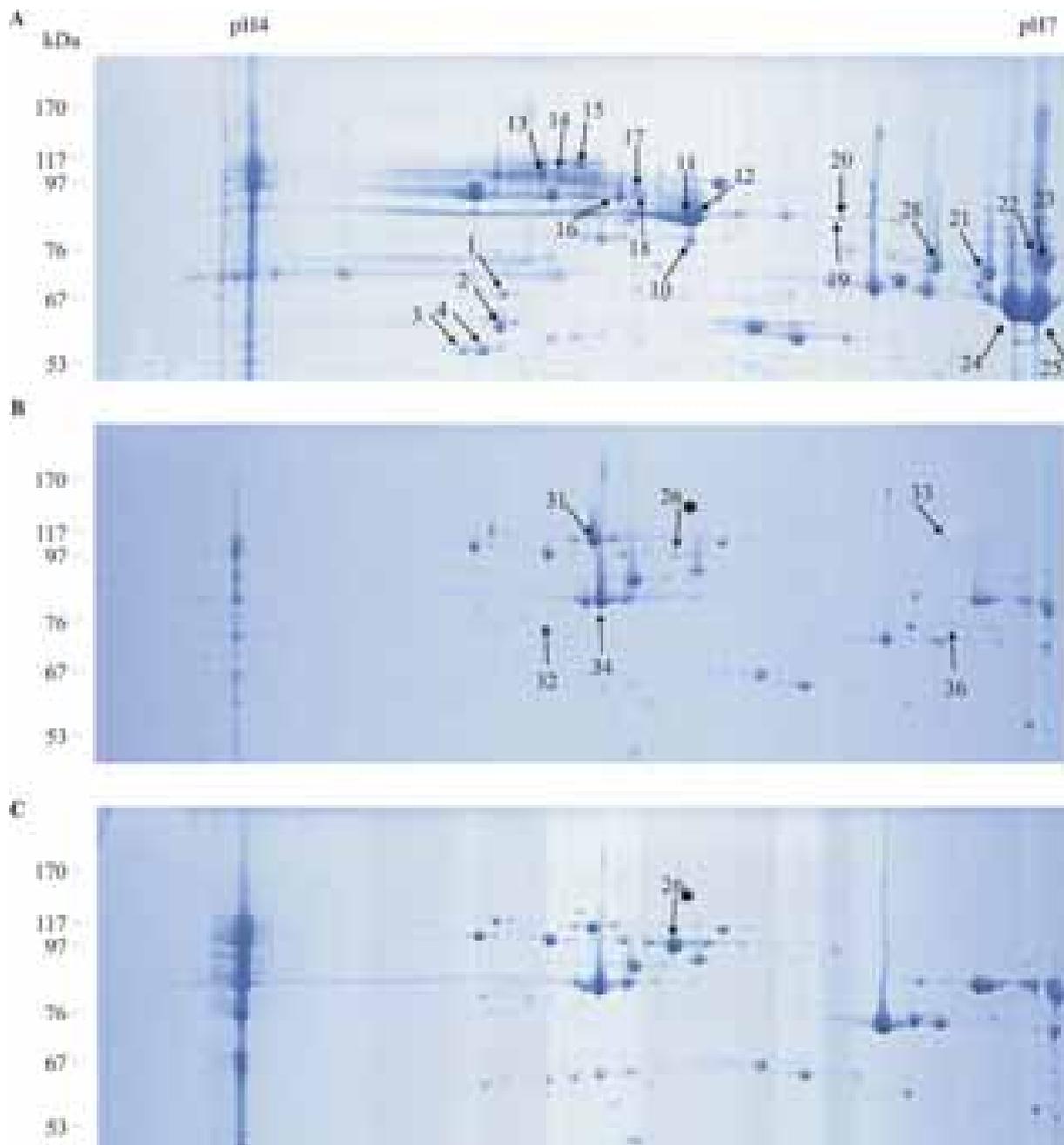
Die in den Abbildungen 7 a-c dargestellten SDS-Gele zeigten ebenfalls eine gute zweidimensionale Auftrennung der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* nach Anzucht in verschiedenen Medien. Auch hier konnten Unterschiede in der Anzahl und Intensität der Proteine bei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen beobachtet werden. Allerdings ist sehr deutlich zu erkennen, dass im Vergleich zu den Silbergefärbten 2-D-Gele (Abb 5 a-c) viel weniger Proteine durch Coomassie angefärbt wurden. Durch Coomassie wurden hauptsächlich diejenigen Proteine angefärbt, die bei der Silberfärbung stark gefärbte Spots zeigten.

Nach Kultivierung in Komplexmedium wurden die meisten Proteine im molekularen Größenbereich zwischen 60 und 120 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5-7 detektiert. Im Vergleich zu den Proteinmustern der in Minimalmedium angezogenen Zellen konnten bei Anzucht in Komplexmedium auch einige Protein im niedermolekularen Bereich zwischen 20 und 50 kDa durch Coomassie angefärbt werden.

Es zeigte sich auch hier, dass sowohl bei Anzucht in Komplexmedium als auch Minimalmedium eine große Anzahl an Proteinen zu finden war, die ein Molekulargewicht von über 70 kDa besaßen.

Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse konnte jeweils durch zweidimensionale Auftrennung der äußeren Membranproteine von zwei weiteren unabhängig voneinander isolierten Membranpräparationen bestätigt werden.

Da die gesuchten TonB-abhängigen Membranrezeptoren bei *C. crescentus* im Größenbereich von über 70 kDa erwartet wurden ist auch hier aufgrund des besseren Vergleichs in Abbildung 8 der entsprechende Gelausschnitt der Gele 7 a-c vergrößert dargestellt.



**Abb. 8:** Ausschnitte des höhermolekularen Bereiches zwischen 53 und 170 kDa der Coomassie-gefärbten 2-D-Gele aus Abb. 7 a-c. (A) zeigt den Ausschnitt der aufgetrennten äußeren Membranproteine von *C. crescentus* JS1003 nach Anzucht in Komplexmedium PYE, (B) nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Glucose und (C) nach Anzucht in Minimalmedium M2 mit Maltose. In (A) deuten die Pfeile auf diejenigen Proteine hin, die bei Anzucht in M2G (B) und M2M (C) nicht zu sehen waren. Die Pfeile in (B) deuten auf Proteine hin, die bei Kultivierung in PYE (A) nicht sichtbar waren. Der mit einem Stern markierte Pfeil zeigt auf jenes Protein, welches nach Anzucht in M2M (C) als einziges Protein im Vergleich zu M2G (B) verstärkt exprimiert worden war und in den folgenden Kapiteln mit MalA bezeichnet ist. Die nummerierten Spots entsprechen denjenigen Proteinen, die im Folgenden mit MALDI-TOF analysiert wurden.

Vergleicht man die in Abbildung 8 dargestellten zweidimensionalen Auftrennungen der äußeren Membranproteine von *C. crescentus* nach Anzucht unter verschiedenen Nährstoffbedingungen, konnte man auch bei den Coomassie-gefärbten 2-D-Gelen Proteine erkennen, die nur nach Kultivierung in Komplex- bzw. Minimalmedien zu sehen waren. Die meisten der in Abbildung 6 interessanten mit Pfeilen markierten Proteinspots konnten auch durch Coomassie angefärbt werden. Die in Abbildung 8 A mit Pfeilen markierten Proteine entsprechen denjenigen Proteinen, die bei Anzucht unter Minimalbedingungen nicht zu sehen waren. Dabei handelt es sich um 21 Proteine, die ihren isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 besitzen und ein Molekulargewicht von 60-120 kDa aufweisen.

Betrachtet man das äußere Membranproteinmuster der unter Minimalmedium angezogenen Zellen (Abb. 8 B), so waren auch hier fünf Proteine sichtbar, die unter reichen Nährstoffbedingungen nicht zu sehen waren bzw. schwächer exprimiert worden waren. Diese Proteine sind auch hier mit Pfeilen markiert und weisen ein Molekulargewicht zwischen 90 und 120 kDa und einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 auf.

Vergleicht man die Proteinmuster der unter Minimalmedium angezogenen Zellen (Abb. 8 B und 8 C), so konnten auch hier nahezu identische Proteine angefärbt werden. Der einzige sichtbare Unterschied stellt der ~100 kDa große Proteinspot Nr. 26 dar, der auch auf den Silber-gefärbten 2-D-Gelen (Abb. 6 B, C) zu sehen war. Dieses Protein ist bei Anzucht in Maltose verstärkt exprimiert worden.

Die mit Coomassie gefärbten 2-D-Gele konnten das Ergebnis der Silber-gefärbten 2-D-Gele bestätigen. Durch Coomassie konnten zwar nicht alle vorhandenen Proteine der äußeren Membran angefärbt werden, jedoch waren die auf den Silber-gefärbten Gelen sichtbaren Proteine, deren Expression unter verschiedenen Nährstoffbedingungen variierte, durch Coomassie ebenfalls angefärbt worden.

In der Erwartung unter diesen gefundenen Proteinen TonB-abhängige Membranrezeptoren zu finden, die Hinweise auf die Aufnahme eines Nährstoffs liefern, sollten die in Abbildung 8 mit Pfeilen markierten Proteine durch massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) identifiziert werden. Von großem Interesse erschien dabei das bei Anzucht in Minimalmedium mit Maltose verstärkt exprimierte Protein Nr. 26, welches bei Anzucht in Minimalmedium mit Glucose deutlich schwächer exprimiert worden war. Da sich die Minimalmedien nur in der C-Quelle unterschieden, konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass es sich hierbei um ein Protein handelt, dessen Expression durch Maltose induziert wird und welches eventuell für die Maltoseaufnahme verantwortlich ist.

### 3.1.3 Identifizierung der Proteinspots durch Massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF)

Die Proteine, die verstärkt bei Anzucht in Komplexmedium bzw. Minimalmedium mit Glucose oder Maltose exprimiert worden waren und in Abbildung 8 mit nummerierten Pfeilen markiert sind, wurden aus dem Gel geschnitten und mit MALDI-TOF analysiert, um Hinweise auf eventuell TonB-abhängige Rezeptoren zu bekommen. Die MALDI-TOF-Analyse wurde am Zellbiologischen Institut von Prof. Dr. A. Nordheim von Dr. G. Schwarz durchgeführt. In Tabelle 8 ist die Auswertung der MALDI-TOF-Analyse zusammengefasst.

**Tab. 8: Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse**

Proteinspot-Nr.	Verstärkte Expression in	MALDI-TOF Datenbankbezeichnung	Gen	Masse [Da]
1	PYE	Ribosomal Protein S1	<i>cc3587</i>	61669
2	PYE	Chaperonin, 60 kDa	<i>cc0685</i>	57396
3	PYE	ATP Synthase F1 beta subunit	<i>cc3447</i>	56865
4	PYE	siehe 3	siehe 3	siehe 3
10	PYE	Outer membrane protein	<i>cc1915</i>	85938
11	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc0210</i>	89687
12	PYE	siehe 11	siehe 11	siehe 11
13	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc3013</i>	121153
14	PYE	siehe 13	siehe 13	siehe 13
15	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc0983</i>	122929
16	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc1099</i>	108856
17	PYE	siehe 13	siehe 13	siehe 13
18	PYE	konnte nicht identifiziert werden	-	-
19	PYE	siehe 11	siehe 11	siehe 11
20	PYE	siehe 11	siehe 11	siehe 11
21	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc2928</i>	76571
22	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc3146</i>	88772
23	PYE	siehe 22	siehe 22	siehe 22
24	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc3500</i>	77641
25	PYE	siehe 24	siehe 24	siehe 24
26	M2M	TonB-dependent receptor	<i>cc2287</i>	99441

Proteinspot-Nr.	Verstärkte Expression in	MALDI-TOF Datenbankaussage	Gen	Masse [Da]
28	PYE	TonB-dependent receptor	<i>cc2194</i>	77507
31	M2G/M2M	TonB-dependent receptor	<i>cc0999</i>	111438
32	M2G/M2M	TonB-dependent receptor	<i>cc1666</i>	80843
33	M2G/M2M	TonB-dependent receptor	<i>cc2804</i>	114514
34	M2G/M2M	TonB-dependent receptor	<i>cc0185</i>	85815
36	M2G/M2M	Hypothetical protein	<i>cc0224</i>	74993

Die Genbezeichnung entspricht der Annotierung in der GenBank-Datenbank, accession no. AE005673 (Nierman *et al.*, 2001).

Mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse konnten bis auf das Protein Nr. 18 alle Proteine identifiziert werden. Bei den meisten Proteinen handelte es sich dabei um TonB-abhängige Membranrezeptoren. Ausnahmen sind die Proteine Nr. 1-3, 10 und 36. Bei den Proteinen Nr. 1-3 handelt es sich erstaunlicherweise nicht um äußere Membranproteine. Das ribosomale Protein S1, das 60 kDa Chaperonin und die ATP-Synthase F1-Beta-Untereinheit, die im Cytoplasma bzw. der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, müssen somit Verunreinigungen der äußeren Membranpräparation darstellen. Das Protein Nr. 10 wurde als äußeres Membranprotein identifiziert und Nr. 36 als hypothetisches Protein, die keine näheren Charakterisierungen in der Datenbank zeigten.

Die Proteine 11-13, 15, 16, 21, 22, 24 und 28, die verstärkt in reichem Medium exprimiert worden waren wurden mit Hilfe der Datenbank als TonB-abhängige Rezeptoren identifiziert sowie die Proteine 31-34, die verstärkt in Minimalmedium mit Glucose und Maltose exprimiert worden waren. Das Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse führte einerseits zur Identifizierung der Proteine als TonB-abhängige Rezeptoren, jedoch lieferten die Datenbankergebnisse keine weiteren Hinweise auf einen potentiellen transportierten Nährstoff.

Das Protein Nr. 26, welches verstärkt bei Anzucht in Minimalmedium mit Maltose im Vergleich zu Glucose gebildet worden war, wurde ebenfalls als TonB-abhängiges Protein identifiziert. Dies unterstützte die Vermutung, dass es sich bei Protein Nr. 26 eventuell um einen TonB-abhängigen Membranrezeptor handelte, welcher für die Aufnahme von Maltose verantwortlich sein könnte.

Deshalb wurde im Folgenden versucht, das Protein Nr. 26, welches in der Datenbank mit CC2287 bezeichnet wird, näher zu charakterisieren.

### 3.1.4 Datenbankinformationen über CC2287

Das Protein CC2287, dessen Expression durch Maltose induziert wurde, wird in der Datenbank als TonB-abhängiger Rezeptor bezeichnet und stellt einen der 65 äußeren TonB-abhängigen Membranrezeptoren von *C. crescentus* dar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/COG/palox?COG1629>). Dies stützt sich auf Homologievergleiche und Computerberechnungen (persönliche Mitteilung Andrei Lupas), die einen Aufbau aus 22 antiparallelen  $\eta$ -Faltblättern vorhersagen, welcher neben dem Vorhandensein einer TonB-Box ein charakteristisches Merkmal TonB-abhängiger Rezeptoren ist. 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>).

Die größte Homologie hat CC2287 zu CC1754 mit 56,7 % (46,5 % Identität), einem weiteren mutmaßlichen TonB-Rezeptor aus *C. crescentus*, welcher in der Datenbank nicht näher charakterisiert ist. Homologievergleiche zeigten, dass CC2287 außerdem am meisten Ähnlichkeit zu Proteinen aus der Gattung *Xanthomonas* besitzt (*Gene vs. All Alignment* unter <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePage.spl?locus=CC2287>). Zu XAC2600 aus *Xanthomonas axonopodis*, welches Homologie zum Vitamin B<sub>12</sub>-Rezeptor aus *E. coli* zeigt, weist CC2287 eine Homologie und Identität von 56,3 % bzw. 37,8 % auf. Ähnlichkeiten zu Eisenkomplextransportern wie FecA aus *X. axonopodis* (47,6 % Homologie; 30,4 % Identität), CirA aus *Xylella fastidiosa* (46,5 % Homologie; 31,1 % Identität), FiuA aus *X. axonopodis* (45,3 % Homologie; 28,1 % Identität) und FhuA aus *Xanthomonas campestris* (45 % Homologie; 32,8 % Identität) sind ebenfalls vorhanden. CC2287 zeigt jedoch keine Sequenzhomologie zu dem für die erleichterte Diffusion von Maltodextrinen benötigten äußeren Membranprotein LamB aus *E. coli*.

Benachbarte Gene von *cc2287* codieren für vorhergesagte Proteine des Zuckerstoffwechsels (*Region view display* unter <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePage.spl?locus=CC2287>). Dabei handelt es sich um drei  $\zeta$ -Amylasen, ein Transportprotein und einen Regulator der *lacI*-Familie. In Anhang 8 ist die schematische Anordnung der benachbarten Gene von *cc2287* dargestellt.

### 3.2 Untersuchungen zur Funktion des äußeren Membranrezeptors CC2287 (MalA)

Der in der Datenbank vorhergesagte TonB-abhängige Rezeptor CC2287 von *C. crescentus* wird im Folgenden mit MalA bezeichnet.

Da MalA bei Anzucht in Minimalmedium mit Maltose im Vergleich zur Anzucht in Minimalmedium mit Glucose verstärkt exprimiert wurde und die Expression vermutlich durch Maltose induziert wurde (4.1.3.2), soll untersucht werden, ob MalA für die Aufnahme von Maltose bzw. größeren Maltodextrinen verantwortlich ist.

#### 3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der *malA::T*- Mutante HB2003 bzgl. Maltodextrinaufnahme

Zunächst sollte *malA* in *C. crescentus* JS1003 deletiert werden und geprüft werden, ob die erhaltene Deletionsmutante noch auf Maltodextrinen als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen kann. Die Konstruktion von HB2003 erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben. Dabei wurde das chromosomal codierte *malA* durch eine Spec/Strep-Resistenzkassette ersetzt. Diese Mutante wurde bezüglich ihres Wachstumsverhaltens auf Maltodextrinen als alleinige C-Quelle untersucht. Dazu wurde eine Minimalagarplatte ohne Kohlenstoffquelle mit HB2003 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 JS1003 und die mit *malA* komplementierte Mutante HB2003 pMR2287. Nach Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen.

**Tab. 9: Wachstumstest von HB2003 *malA* mit Maltodextrinen auf M2-Minimalmedium**

	MG [Da]	Stamm		
		JS1003 (WT)	HB2003 ( <i>malA</i> )	HB2003 pMR2287
Maltose	360	3	3	3
Maltotriose	504	3	2,2	3
Maltotetraose	667	3	0,9	3
Maltopentaose	829	3	-	3
Maltohexaose	991	3	-	2,8

Auf die entsprechenden Molmassen der Maltodextrine ist hingewiesen. Das Wachstumsverhalten wurde durch Wachstumshöfe um Filterplättchen gemessen, die das jeweilige Maltodextrin enthielten und auf M2-Minimalagarplatten ohne C-Quelle gelegt wurden, die zuvor mit dem zu testenden Stamm mit Hilfe von M2-Minimal-Topagar ohne C-Quelle überschichtet worden waren. Die Wachstumszonen um die Filterplättchen entsprechen dem Durchmesser in cm inkl. der Filterplättchen (0,6 cm) und stellen den Mittelwert von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumstests dar. Kein Wachstum ist durch '-' gekennzeichnet. Das Plasmid pMR2287 codiert für *malA*.

Die in Tabelle 9 angegebenen Wachstumshöfe zeigen, dass der Wildtyp alle getesteten Maltodextrine aufnehmen und als Kohlenstoffquelle verwerten konnte. Bei Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose sowie Maltohexaose waren Wachstumshöfe von jeweils 3 cm sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigte die *malA*-Mutante HB2003 ein verändertes Wachstumsverhalten. Um das Filterplättchen mit Maltose war ein Wachstumshof von 3 cm zu sehen, wohingegen die Wachstumshöfe um Maltotriose mit 2,2 cm und Maltotetraose mit 0,9 cm deutlich geringer ausfielen als beim Wildtyp. Mit den größeren Maltodextrinen Maltopentaose und -hexaose konnte bei der Mutante HB2003 kein Wachstum mehr beobachtet werden. Komplementierte man die Mutante HB2003 mit *malA* auf pMR2287, so konnte das Wildtypverhalten bezüglich des Wachstums mit Maltodextrinen wiederhergestellt werden.

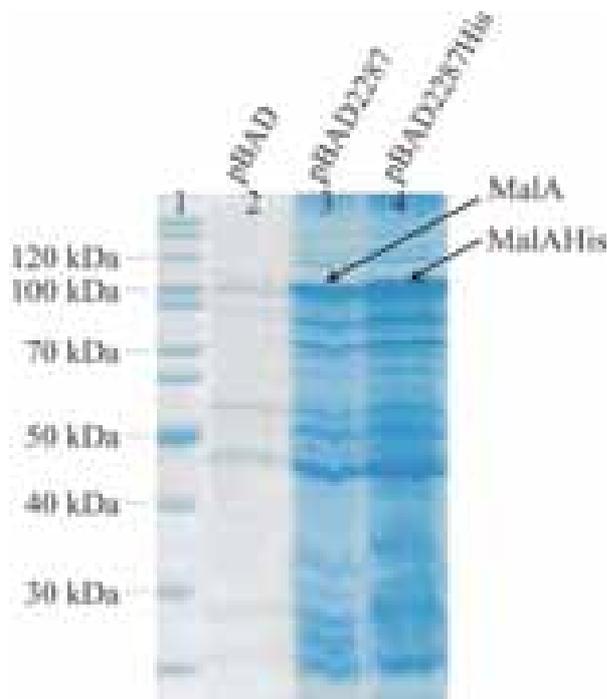
### 3.2.2 Kann MalA die Funktion von LamB in *E. coli* ersetzen?

LamB ist das Maltoporin in *E. coli*, durch welches Maltodextrine über die äußere Membran ins Periplasma diffundieren (Benz, 1994). Im Falle einer *lamB*-Mutante können Maltodextrine, die größer als Maltotriose sind, nicht mehr in die Zelle gelangen. Eine *lamB*-Mutante ist allerdings noch in der Lage auf kleineren Maltodextrinen wie Maltose und Maltotriose zu wachsen, da diesen Zuckern aufgrund ihrer Größe noch die reine Diffusion durch andere unspezifische Porine ermöglicht wird.

Da die Wachstumstests der *malA*-Mutante HB2003 (3.2.1) darauf hindeuteten, dass MalA eventuell für die Aufnahme von Maltodextrinen bei *C. crescentus* verantwortlich ist, sollte untersucht werden, ob MalA die Funktion von LamB in *E. coli* übernehmen kann. Die zu testende *E. coli lamB*-Mutante war *E. coli* KB419 (Krieger-Brauer, 1979), welche keine polaren Effekte auf die Transportgene zeigt, die für den Maltodextrintransport über die Cytoplasmamembran benötigt werden. Diese Mutante sollte mit *malA* aus *C. crescentus* transformiert werden und auf das Wachstum mit Maltodextrinen als alleinige C-Quelle untersucht werden.

### 3.2.2.1 Klonierung und Expression von *malA* in *E. coli*

Die Klonierung des Gens *malA* aus *C. crescentus* JS1003 in den Expressionsvektor pT7-7, um es mit Hilfe der T7-RNA Polymerase spezifisch zu transkribieren und durch die ideale Ribosomenbindestelle des Vektors überzuexprimieren, schlug fehl. Es wurden nur nonsense Mutanten gewonnen, die darauf hinwiesen, dass MalA in größeren Mengen für *E. coli* toxisch sein muß. Erst die Klonierung von *malA* in den unter strikter Arabinosekontrolle stehenden high-copy Vektor pBAD/Myc-HisB zeigte Erfolg. *malA* wurde sowohl ohne als auch mit C-terminalem His-Tag (6x His) kloniert, um MalA für weitere Versuche über seinen His-Tag aufzureinigen zu können. Zur Überprüfung der Expression wurden die resultierenden Plasmide pBAD2287Stop bzw. pBAD2287His jeweils in den *E. coli*-Stamm BL21 omp8 transformiert, welcher in der äußeren Membran kaum Porine besitzt und somit eine Proteinexpression von MalA in einem gefärbten SDS-Gel besser sichtbar macht. Die Überexpression von MalA in *E. coli* und die Isolierung der äußeren Membran erfolgte wie unter 2.2.3.3 und 2.2.3.4 beschrieben ist. Die Proteine der äußeren Membran wurden in einem 13 %-igen SDS-Gel aufgetrennt.



**Abb. 9:** 13 %-ige SDS-PAGE der äußeren Membran von BL21 omp8 transformiert mit pBAD/Myc-HisB, pBAD2287 und pBAD2287His. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die Pfeile deuten auf die exprimierte MalA- bzw. MalAHis-Bande hin.

In Abbildung 9 ist die SDS-PAGE der äußeren Membranproteine zu sehen, die das in *E. coli* BL21 omp8 exprimierte MalA zeigt. Im Vergleich zur Vektorkontrolle pBAD konnten in Spur 3 und 4 deutlich sichtbare Proteinbanden im Bereich von 100 kDa beobachtet werden. Dabei sollte es sich um MalA bzw. MalA mit C-terminalem His-Tag handeln. Es konnte somit bestätigt werden, dass das *Caulobacter*-Gen *malA* in *E. coli* exprimiert wurde.

### 3.2.2.2 Klonierung von *cc2327 (cctonb)* und *cc2335-cc2336 (ccexbBD1)* in *E. coli*

Wenn man vermutet, dass es sich bei MalA aus *C. crescentus* um einen TonB-abhängigen Rezeptor für die Maltodextrinaufnahme handelt, so muß MalA für den Transport eine Energetisierung durch TonB erfahren. Wird MalA nun jedoch in *E. coli* exprimiert, könnte es sein, dass eine Wechselwirkung mit *E. coli*-TonB nicht möglich ist. Damit Komplementationsversuche der *E. coli lamB*-Mutante KB419 mit MalA nicht aufgrund mangelnder Energetisierung fehlschlagen, wurden die potentiellen Energetisierungsproteine TonB (CC2237) und ExbBD1 (CC2335-CC2336) aus *C. crescentus* in den unter T7-Kontrolle stehenden Expressionsvektor pET-27b(+) kloniert. Die Expression der drei Gene wurde durch Einfügen einer zweiten optimalen ribosomalen Bindestelle durch den Primer CcexbBP1EcoRI gewährleistet. Das daraus resultierende Plasmid pETextonB (2.1.8) wurde durch Sequenzierung überprüft.

### 3.2.2.3 Komplementationsversuch der *E. coli lamB*-Mutante KB419

Die *E. coli lamB*-Mutante KB419 ist nicht mehr fähig auf Minimalmedium mit größeren Maltodextrinen als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen, da ihr das für die Maltodextrinaufnahme verantwortliche LamB fehlt. Um zu untersuchen, ob das *C. crescentus* Protein MalA die Funktion von LamB ersetzen kann, sollte *malA* in *E. coli* KB419 exprimiert und das Wachstum auf Maltodextrinen untersucht werden. Dazu wurde KB419 mit *malA* auf pBAD2287 und mit *ccton*, *ccexbBD1* auf pETextonB transformiert, mittels Minimal-Topagar ohne C-Quelle auf eine Minimalagarplatte ohne C-Quelle überschichtet und Filterplättchen aufgelegt, die zuvor mit 10 µl einer jeweiligen 20 %-igen Maltodextrinlösung getränkt wurden (2.2.1.3). Nach Inkubation der Platten über Nacht wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen. Als Kontrolle diente der *E. coli*-Stamm DH5ζ, welcher uneingeschränkt Maltodextrine aufnehmen kann. Glucose diente ebenfalls als Kontrolle, da dieser Zucker unabhängig von LamB aufgenommen wird.

**Tab. 10: Test auf Komplementation von *E. coli* KB419 *lamB* mit MalA von *C. crescentus***

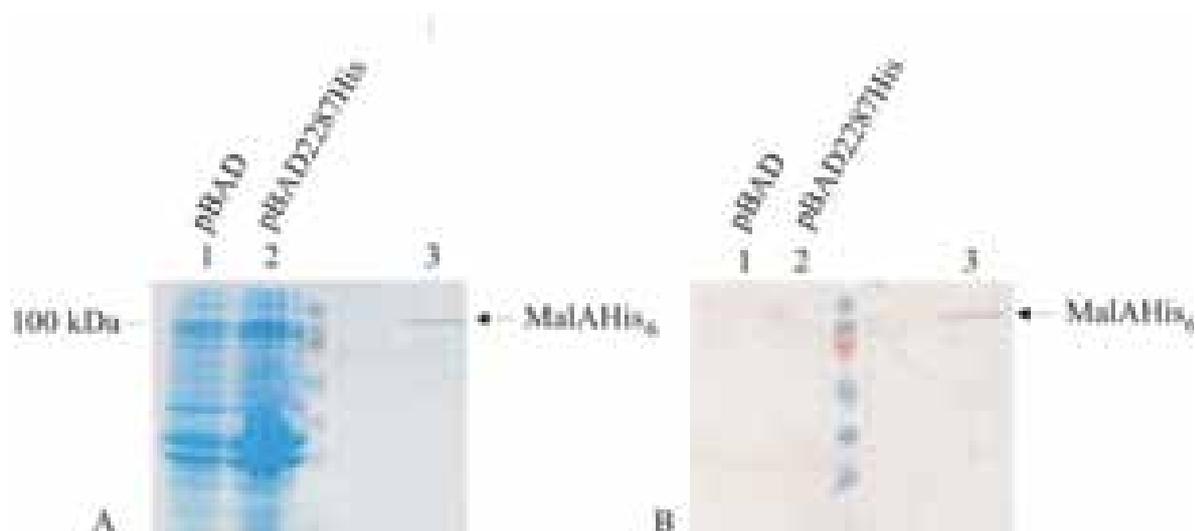
Stamm	transformiert mit	Wachstum um Filterplättchen mit			
		Glucose 196 Da	Maltose 360 Da	Maltotriose 504 Da	Maltotetraose 667 Da
DH5 $\zeta$	pBADMyc-HisB, pET-27b(+)	3	3	3	3
KB419	pBADMyc-HisB, pET-27b(+)	3	2,5	1,3	-
KB419	pBAD2287His, pETextonB	3	2,5	1,3	-

Der Wachstumstest erfolgte auf M9-Minimal-Agarplatten ohne C-Quelle, die zuvor mit dem zu testenden Stamm mit Hilfe von M9-Minimal-Topagar ohne C-Quelle überschichtet worden waren. Die Wachstumszonen um die aufgelegten Filterplättchen entsprechen dem Durchmesser in cm inkl. der Filterplättchen (0,6 cm). Kein Wachstum ist durch '-' gekennzeichnet. pBAD2287 codiert für *malA-his<sub>6</sub>* und pETextonB codiert für *cctonB* und *ccexbBD1*.

Wie in Tabelle 10 erkennbar ist, konnte der Kontrollstamm DH5 $\zeta$  sowohl mit Glucose als auch mit den Maltodextrinen Maltose, Maltotriose und Maltotetraose wachsen. Es konnten Wachstumshöfe von jeweils 3 cm gemessen werden. Wie erwartet zeigte im Gegensatz dazu die *lamB*-Mutante KB419, die mit den Vektorkontrollen pBADMyc-HisB und pET-27b(+) transformiert worden war ein verändertes Wachstumsverhalten mit Maltodextrinen. Mit Glucose war ein Wachstumshof von 3 cm sichtbar, wohingegen mit Maltose und Maltotriose jeweils kleinere Wachstumshöfe von 2,5 cm bzw. 1,3 cm beobachtet werden konnten. Ein Wachstum mit Maltotetraose war bei KB419 aufgrund des fehlenden LamBs nicht mehr möglich. Wurde die *lamB*-Mutante KB419 mit *malA* auf pBAD2287 und *cctonB* und *ccexbBD* auf pETextonB transformiert, so konnte allerdings kein verbessertes Wachstumsverhalten bezüglich der Maltodextrinaufnahme beobachtet werden. Die Wachstumszonen um die Maltodextrine entsprachen den Wachstumszonen von KB419 welcher nur mit den Vektorkontrollen transformiert wurde. Ein Wachstum mit Maltotetraose war auch nicht möglich. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass vermutlich MalA aus *C. crescentus* die Funktion von LamB in *E. coli* nicht ersetzen kann. Voraussetzung dafür war jedoch die vollständige Expression von *malA*, *cctonB* und *ccexbBD*, was anhand dieses Versuches nicht gezeigt werden konnte. Um dies zu überprüfen, sollte zunächst die MalA-Expression in KB419 überprüft werden.

### 3.2.2.3.1 Überprüfung der MalA-Expression in der *E. coli lamB*-Mutante KB419

Zur Überprüfung der MalA-Expression in der *E. coli lamB*-Mutante KB419 wurde der Stamm mit dem Plasmid pBAD2287His transformiert, welches für MalA mit C-terminalem His-Tag codiert. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, die Proteinexpression mittels antiHis<sub>6</sub>-Antikörper nachzuweisen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit 0,002 % L-Arabinose (2.2.3.3) in M9-Minimalmedium mit Glucose. Im Anschluß an die Isolierung der äußeren Membran (2.2.3.4) wurden die Membranproteine in einer 13 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.3.6) und daraufhin auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (2.2.3.7). Mittels Western Blot und antiHis<sub>6</sub>-Antikörper wurde die MalAHis<sub>6</sub>-Expression überprüft (2.2.3.8). Als Kontrolle diente das aus BL21 omp8 und TY-Anzucht gereinigte MalA-His<sub>6</sub>, welches in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben ist.



**Abb. 10:** (A) 13 %-ige SDS-PAGE und (B) Western Blot der SDS-PAGE zur Überprüfung der MalAHis<sub>6</sub>-Expression in *E. coli* KB419. In den Spuren 1 und 2 wurde jeweils die äußere Membran des Stammes KB419 aufgetragen, welcher zuvor mit dem Vektor pBAD bzw. mit *malA* auf pBAD2287His transformiert worden war und dessen Proteinexpression in M9-Minimalmedium mit 0,002 % L-Arabinose induziert worden war. In Spur 3 wurde zur Kontrolle das aufgereinigte MalAHis<sub>6</sub> aufgetragen. MalAHis<sub>6</sub> wurde im Western Blot (B) mit anti-His<sub>6</sub>-Antikörpern detektiert.

Der Western Blot in Abbildung 10 zeigt, dass das zur Kontrolle dienende aufgereinigte MalAHis<sub>6</sub> (3.2.4.4) mittels antiHis<sub>6</sub>-Antikörper detektiert werden konnte. In Spur 2, in der die äußere Membran von KB419 pBAD2287His aufgetragen wurde, konnte in der SDS-PAGE im Vergleich zur Vektorkontrolle pBAD jedoch keine überexprimierte MalA-Bande im Bereich von 100 kDa gesehen werden, was durch das Ergebnis des Western Blots bestätigt werden

konnte. Mittels antiHis<sub>6</sub>-Antikörper konnte in KB419 pBAD2287His keine MalAHis<sub>6</sub>-Bande detektiert werden.

Das bedeutet, dass das Ergebnis des Wachstumstests von KB419 mit MalA in 3.2.2.3 nicht aussagekräftig ist und so gedeutet werden könnte, dass *mala* unter Minimalbedingungen in KB419 nicht exprimiert worden ist und dadurch kein funktionsfähiger Komplex aus MalA, CCTonB und CCExbBD entstanden war, der eine potentielle Maltodextrinaufnahme gewährleistet hätte.

Da die Expression von MalA in *E. coli* KB419 nicht erfolgte, wurden zwei weitere Stämme getestet, welche ebenfalls kein funktionsfähiges LamB besitzen. BL21 omp8 und SIP575 wurden mit *mala* auf pBAD2287His transformiert und ebenfalls wie KB419 auf MalA-Expression untersucht. SDS-PAGE-Analysen sowie Western Blots mit antiHis<sub>6</sub>-Antikörpern zeigten allerdings das gleiche Ergebnis wie der Stamm KB419 (Daten nicht gezeigt). In beiden Stämmen konnte unter M9-Minimalbedingungen kein MalA detektiert werden.

### 3.2.3 Kann MalA Acarbose binden?

Acarbose ist ein  $\zeta$ -Glucosidase-Inhibitor, welcher als Sekundärmetabolit von *Actinoplanes* produziert und ausgeschieden wird (Truscheit *et al.*, 1981). Als Inhibitor von maltolytischen Enzymen und Maltodextrin-Aufnahmesystemen werden dadurch Enzyme potentieller Nahrungskonkurrenten gehemmt. Dieser Sekundärmetabolit wird erfolgreich in der Diabetestherapie eingesetzt, da er im Vergleich zu Saccharose eine rund 15000-fach höhere Affinität zu Saccharasen aufweist (Bischoff *et al.*, 1994) und somit die Resorption von Monosacchariden verringert wird.

In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass die *mala*-Mutante HB2003 nicht mehr fähig war auf größeren Maltodextrinen als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Deshalb wurde vermutet, dass MalA für die Aufnahme von Maltodextrinen verantwortlich ist. Da es sich bei Acarbose um einen Inhibitor von Maltodextrin-Aufnahmesystemen handelt, sollte untersucht werden, ob Acarbose eventuell auch eine Affinität zu MalA besitzt. Falls dies zutrifft, würde die Hypothese unterstützt werden, dass MalA die Funktion eines Maltodextrinrezeptors hat.

Die Bindung von Acarbose an MalA wurde anhand von Wachstumstests von *C. crescentus* auf Minimalagarplatten mit 0,3 % Maltodextrinen als C-Quelle überprüft (2.2.1.3). Vortests, bei denen *C. crescentus* Arabinose als einzige C-Quelle angeboten wurde, zeigten, dass *C. crescentus* Acarbose als C-Quelle nicht nutzen konnte. Die zu untersuchenden *C. crescentus*-Stämme JS1003 (WT) und HB2003 (*mala*) wurden mittels Minimal-Topagar auf M2-Minimalagarplatten mit verschiedenen Maltodextrinen als alleinige C-Quelle überschichtet. In

die Mitte der Platte wurde jeweils ein Filterplättchen mit 10 µl einer 20 %-igen Acarboselösung aufgelegt. Das Ergebnis des Wachstumstests zeigt Tabelle 11.

**Tab. 11: Hemmung der Maltodextrinaufnahme von *C. crescentus* durch Acarbose**

Stamm	Acarbose-Filterplättchen auf M2-Medium mit				
	Glucose	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose	Maltopentaose
JS1003 (WT)	0	0	6	6	6
HB2003 ( <i>malA</i> )	0	0	5,5	6	-

Der Wachstumstest erfolgte auf M2-Minimal-Agarplatten mit den C-Quellen Glucose, Maltose, Maltotriose, -tetraose und -pentaose, die mit dem zu testenden Stamm mit Hilfe von M2-Minimal-Topagar überschichtet worden waren. Die Angaben entsprechen dem Hemmhofdurchmesser um das aufgelegte Acarbose enthaltene Filterplättchen inkl. der Filterplättchen (0,6 cm) und dem Mittelwert aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumstests. Kein Wachstum auf den Platten ist durch '-' gekennzeichnet.

Acarbose führte zu einer Inhibierung des Wachstums von *C. crescentus* JS1003 auf den getesteten Maltodextrinen Maltotriose, -tetraose und -pentaose (Tab. 11). Im Gegensatz zum Wachstum auf Glucose und Maltose, wo keine Hemmhöfe um die Filterplättchen mit Acarbose zu sehen waren, zeigten sich Hemmhöfe um die Filterplättchen, die auf M2-Platten mit größeren Maltodextrinen inkubiert worden waren. Auf den Platten mit Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose waren Hemmhöfe von jeweils 6 cm zu erkennen. Im Vergleich zum Wildtyp JS1003 konnte die *malA*-Mutante HB2003 wie erwartet, nur noch auf den Platten mit Glucose, Maltose, Maltotriose und -tetraose wachsen. Ein Wachstum mit Maltopentaose war nicht mehr möglich. Das Wachstum der *malA*-Mutante auf M2-Glucose- und M2-Maltose-Platten konnte durch Acarbose ebenfalls nicht beeinträchtigt werden. Es waren keine Hemmhöfe um die Filterplättchen sichtbar. Die Hemmhöfe um Acarbose auf den Platten mit Maltotriose, -tetraose von 5,5 bzw. 6 cm zeigten jedoch bei HB2003 ebenfalls eine Hemmung der Maltodextrinaufnahme durch Acarbose.

### 3.2.4 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme über MalA Energie-abhängig?

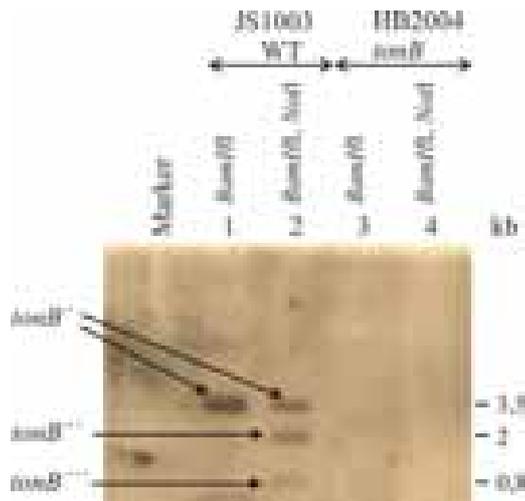
In Kapitel 3.2.1 wurde angenommen, dass MalA für die Aufnahme von Maltodextrinen verantwortlich ist. Maltopentaose und Maltohexaose stellen mit einem Molekulargewicht von 892 bzw. 991 Da große Moleküle dar, die durch reine Diffusion vermutlich nicht durch die äußere Membran von *C. crescentus* gelangen können. Da über die Durchlässigkeit der äußeren Membran von *C. crescentus* nichts bekannt ist, kann aufgrunddessen vermutet werden, dass die äußere Membran Porine besitzt, die dem Porintyp von *E. coli* entsprechen und keine größeren Maltodextrine diffundieren lassen.

Da die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse (3.1.4) vermuten lassen, dass es sich bei MalA um einen TonB-abhängigen Rezeptor handelt, sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, ob MalA eine Energie-abhängige Transportfunktion zugeteilt werden kann.

Zunächst sollte überprüft werden, ob *C. crescentus* ohne das Energie-transduzierende TonB noch in der Lage ist, Maltodextrine aufzunehmen. Dazu sollte eine *tonB*-Deletionsmutante in *C. crescentus* hergestellt werden und diese auf Wachstum mit Maltodextrinen als alleinige C-Quelle untersucht werden.

#### 3.2.4.1 Herstellung der *tonB::T*-Mutante HB2004

In der Datenbank wird für *C. crescentus* ein mutmaßliches TonB-Protein vorhergesagt, welches die Bezeichnung CC2327 trägt. Zur Herstellung der *tonB*-Mutante HB2004 wurde das entsprechende Gen *cc2327* deletiert, wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben wurde. Dabei wurde das chromosomal codierte *tonB* durch eine Spec/Strep-Resistenzkassette ersetzt. Die TonB-Deletion wurde anhand eines Southern Blots (2.2.2.6) überprüft. Dafür wurde die chromosomale DNA des Stammes HB2004 und des Kontrollstamms JS1003 isoliert (2.2.2.1), mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI bzw. *Bam*HI und *Not*I verdaut, in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetragen und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *tonB*-Sonde, die mit Hilfe der Primern cctonBP1Nde und cctonBP2EcoRI und dem Template pETextonB durch PCR gewonnen wurde. Durch Restriktion der chromosomalen DNA des Wildtyps mit *Bam*HI sollte durch die *tonB*-Sonde ein 3,5 kb großes DNA-Fragment (*tonB'*) detektiert werden wohingegen durch Restriktion mit *Bam*HI und *Not*I sowohl ein 2 kb (*tonB''*) als auch ein 0,8 kb (*tonB'''*) großes *tonB*-Fragment detektiert werden sollte. Im Falle einer *tonB*-Mutante sollte keine *tonB*-Bande nachgewiesen werden können.



**Abb. 11: Southern Blot zur Überprüfung der *tonB*-Deletion in HB2004.** Die mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaute chromosomale DNA des Wildtyps JS1003 und der *tonB*-Mutante HB2004 wurde in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung und Detektion fand mit einer Digoxigeninmarkierten *tonB*-Sonde statt. Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen *tonB*-Fragmente nach Restriktionsverdau hin.

Der Southern Blot in Abbildung 11 konnte die erfolgreiche *tonB*-Deletion in HB2004 bestätigen. In Spur 3 und 4 wurde im Gegensatz zum Wildtyp in Spur 1 und 2 keine *tonB*-Bande detektiert.

### 3.2.4.2 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme TonB-abhängig?

Die *tonB*-Mutante HB2004 wurde bezüglich ihres Wachstumsverhaltens mit Maltodextrinen als alleinige C-Quelle untersucht. Dazu wurde eine Minimalagarplatte ohne Kohlenstoffquelle mit HB2004 mittels Minimal-Topagar überschichtet und Filterplättchen mit den entsprechenden Maltodextrinen (10  $\mu$ l einer 20 %-igen Lösung) aufgelegt (2.2.1.3). Als Kontrollen dienten der Wildtypstamm JS1003 und die *malA*-Mutante HB2003. Nach Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen.

**Tab. 12: Wachstumstest von HB2004 *tonB* mit Maltodextrinen auf Minimalmedium**

	MG [Da]	Stamm		
		JS1003 (WT)	HB2003 ( <i>malA</i> )	HB2004 ( <i>tonB</i> )
Maltose	360	3	3	3
Maltotriose	504	3	2,2	3
Maltotetraose	667	3	0,9	3
Maltopentaose	829	3	-	3
Maltohexaose	991	3	-	3

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

Die Wachstumstests in Tabelle 12 zeigen, dass der Wildtyp JS1003 alle getesteten Maltodextrine aufnehmen und als Kohlenstoffquelle nutzen konnte. Um die Maltodextrine waren Wachstumshöfe von jeweils 3 cm sichtbar. Im Gegensatz dazu konnte die *malA*-Mutante HB2003, wie auch in Kapitel 3.2.1 untersucht wurde, die Maltodextrine Pentaose und Hexaose nicht mehr aufnehmen. Betrachtet man die *tonB*-Mutante HB2004, so konnte man keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Um jedes Filterplättchen waren Wachstumshöfe von 3 cm sichtbar. Somit konnten sowohl die kleineren als auch die größeren Maltodextrine unabhängig von TonB aufgenommen und als Kohlenstoffquelle genutzt werden.

### 3.2.4.3 Erfolgt die Maltodextrinaufnahme ExbBD-abhängig?

Wie in Kapitel 3.2.4.2 gezeigt wurde, erfolgte die Maltodextrinaufnahme auch in Abwesenheit des mutmaßlichen TonB-Proteins CC2327.

Da jedoch in der Datenbank bei *C. crescentus* ein mutmaßliches TonB und zwei mutmaßliche ExbB- bzw. ExbD-Proteine vorhergesagt werden, könnte es eventuell ein zweites Energie-transduzierendes Protein geben, welches die für den Transport benötigte Energie bereitstellt. Da dieses Protein allerdings nicht bekannt ist, sollten die vorhandenen ExbB- und ExbD-Proteine Aufschluß über einen möglichen energieabhängigen Transport geben, da sie zusammen mit TonB bzw. einem weiteren „TonB“-Protein einen funktionellen Energietransduktionskomplex bilden könnten.

Dazu sollten die in der Datenbank mit *cc2335* (genannt *exbD1*) und *cc2336* (genannt *exbB1*) bzw. *cc3232* (genannt *tolR*, siehe Kapitel 3.3.5) und *cc3233* (genannt *tolQ*, siehe Kapitel 3.3.5) bezeichneten Gene jeweils deletiert und die resultierenden Mutanten auf Maltodextrinaufnahme getestet werden.

Im Falle der *exbBD1*-Doppelmutante HB2007 wurde *exbBD1* durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (2.2.2.5.4). Zugleich wurde in der *tonB*-Mutante *exbBD1* durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt (2.2.2.5.3), wodurch die Dreifachmutante HB2006 entstand.

Der Versuch, die Gene *tolQR* zu deletieren (2.2.2.5.5) scheiterte. Nach Konjugation des Donorstammes *C. crescentus* JS1003 mit *E. coli* S17 pHB141 bzw. pHB142 konnten keine Klone selektiert werden, die die Gene *tolQ* und *R* gegen die Resistenzkassette ausgetauscht hatten.

Die erhaltenen *exbBD1*-Mutanten wurden bezüglich ihres Wachstums auf Maltodextrinen als alleinige Kohlenstoffquelle untersucht. Dazu wurde eine Minimalagarplatte ohne C-Quelle mit den zu untersuchenden Stämmen mittels Minimal-Topagar überschichtet und Filterplättchen mit den entsprechenden Maltodextrinen aufgelegt (2.2.1.3). Als Kontrolle diente der Wildtypstamm JS1003, die *malA*-Mutante HB2003 und die *tonB*-Mutante HB2004. Nach Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Filterplättchen gemessen.

**Tab. 13: Wachstumstest der *exbBD1*-Mutanten mit Maltodextrinen auf Minimalmedium**

	MG [Da]	Stamm					
		JS1003 (WT)	HB2003 ( <i>malA</i> )	HB2004 ( <i>tonB</i> )	HB2007 ( <i>exbBD1</i> )	HB2007 ( <i>exbBD1</i> ) pMR <b>exb1</b>	HB2006 ( <i>tonB,exbBD1</i> )
Maltose	360	3	3	3	3	2,5	3
Maltotriose	504	3	2,2	3	2,5	2,5	2,4
Maltotetraose	667	3	0,9	3	1,3	2,5	1,4
Maltopentaose	829	3	-	3	-	2,5	-
Maltohexaose	991	3	-	3	-	2,5	-

Das Wachstumsverhalten wurde durch Wachstumshöfe um Filterplättchen gemessen, die das jeweilige Maltodextrin enthielten und auf M2-Minimalagarplatten ohne C-Quelle gelegt wurden, die zuvor mit dem zu testenden Stamm mit Hilfe von M2-Minimal-Topagar ohne C-Quelle überschichtet worden waren. Die Wachstumszonen um die Filterplättchen entsprechen dem Durchmesser in cm inkl. des Filterplättchens (0,6 cm) und stellen den Mittelwert von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumstests dar. Kein Wachstum ist durch '-' gekennzeichnet. pMR**exb1** codiert für *ccexbBD1*.

In Tabelle 13 ist erkennbar, dass der Wildtyp JS1003 und die *tonB*-Mutante HB2004 wie erwartet alle Maltodextrine aufnehmen und als Kohlenstoffquelle nutzen konnte. Es waren jeweils Wachstumshöfe von 3 cm sichtbar.

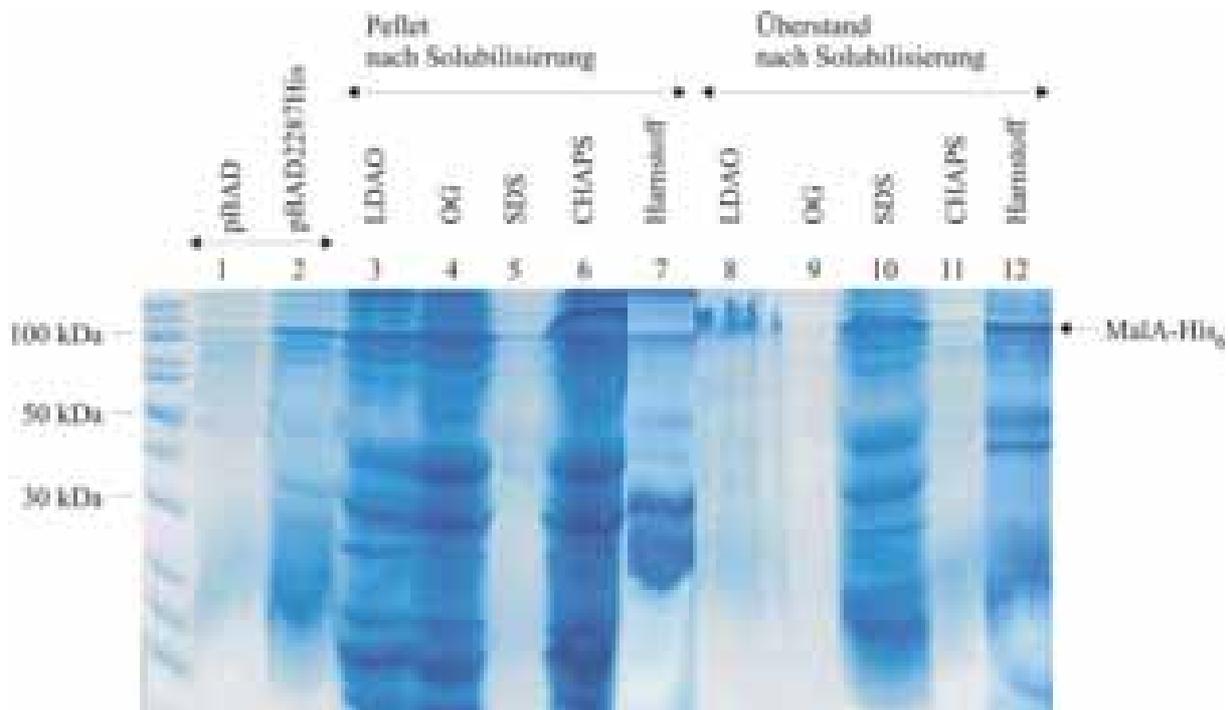
Im Gegensatz dazu zeigten die *exbBD1*-Mutanten HB2006 und HB2007 ein verändertes Wachstumsverhalten. Waren die Gene *exbB1* und *D1* deletiert, so konnte ein Wachstum nur noch mit den Maltodextrinen Maltose, Maltotriose und –tetraose beobachtet werden, was an den Wachstumshöfen um die jeweiligen Filterplättchen der Doppelmutante HB2007 und der Dreifachmutante HB2006 zu erkennen war. Die beiden Mutanten zeigten einen gleichen Phänotyp bezüglich des Wachstums mit Maltodextrinen. Um das Filterplättchen mit Maltose war ein Wachstumshof von 3 cm, um Triose ein Wachstumshof von 2,5 bzw. 2,4 cm und um Tetraose ein Wachstumshof von 1,3 bzw. 1,4 cm sichtbar. Maltopentaose und –hexaose wurden dagegen nicht mehr aufgenommen. Dieser Phänotyp glich dem der *mala*-Mutante HB2003, die ebenfalls keine größeren Maltodextrine mehr aufnehmen konnte. Komplementierte man die Mutante HB2007 mit *exbBD1* auf pMR**exb1**, so konnte das Wildtypverhalten bezüglich des Wachstums mit Maltodextrinen wiederhergestellt werden. Die komplementierte Mutante konnte alle Maltodextrine aufnehmen und als Kohlenstoffquelle nutzen, was anhand von Wachstumshöfen von 2,5 cm um jedes Filterplättchen zu erkennen war.

#### 3.2.4.4 Aufreinigung von MalA-His<sub>6</sub>

Für anstehende Einzelkanalmessungen, die MalA näher charakterisieren sollten, war es notwendig MalA aufzureinigen.

MalA-His<sub>6</sub> wurde in *E. coli* BL21 omp8 pBAD2287His durch Induktion mit 0,002 % L-Arabinose überexprimiert (2.2.3.3). Nach Isolierung der äußeren Membran (2.2.3.8) sollte zunächst getestet werden, mit Hilfe welcher Detergenzien MalA-His<sub>6</sub> aus der Membran gelöst werden konnte. Die getesteten Detergenzien waren 1,5 % LDAO, 1,5 % Octylglycosid (OG), 1 % SDS, 1,5 % CHAPS und 8 M Harnstoff.

Dazu 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.

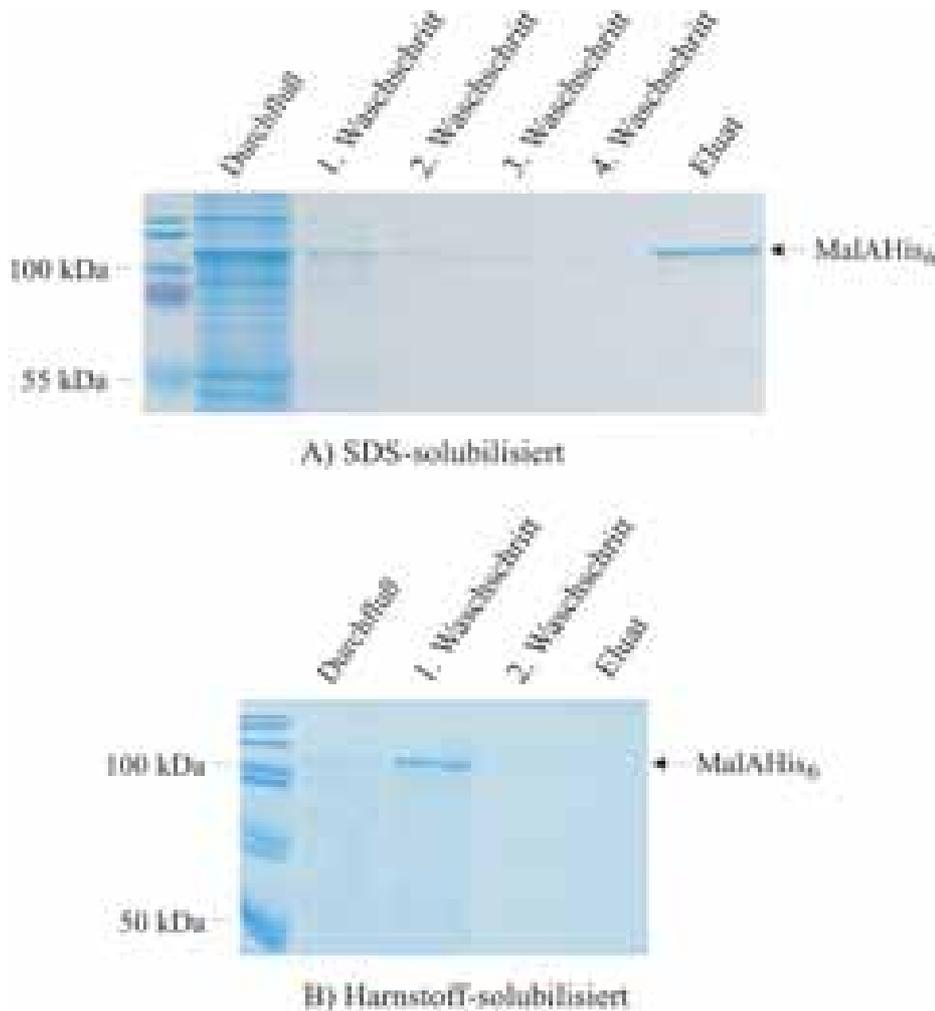


**Abb. 12: Solubilisierung der äußeren Membranproteine von BL21 omp8 pBAD2287His mit verschiedenen Detergenzien.** Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 13 %-igen SDS-Gel. Zur Kontrolle wurden in Spur 1 und 2 jeweils die nicht mit Detergenz behandelten äußeren Membranen von BL21 omp8 pBAD bzw. pBAD2287His aufgetragen. In den Spuren 3-7 wurden jeweils 10 µl der in 50 µl H<sub>2</sub>O gelösten Pellets nach der Solubilisierung aufgetragen. Die Spuren 8-12 zeigen 10 µl des Überstands nach der Solubilisierung.

Wie in Abbildung 12 in Spur 2 zu sehen ist, wurde das ~ 100 kDa große MalA-His<sub>6</sub> in BL21 omp8 exprimiert. Der Versuch, MalA-His<sub>6</sub> mit verschiedenen Detergenzien aus der Membran zu lösen, zeigte mit 1 % SDS und 8 M Harnstoff Erfolg. Dies ist in den Spuren 10 und 12 anhand der Proteinbanden um die 100 kDa zu sehen, die sich im Überstand nach der Solubilisierung befanden. Die Detergenzien LDAO, Octylglycosid (OG) und CHAPS konnten MalA-His<sub>6</sub> nicht aus der Membran lösen, was daran zu erkennen ist, dass sich MalA-His<sub>6</sub> nach der Solubilisierung fast komplett im Pellet befunden hat (Spur 3, 4 und 6).

Das jeweils in SDS und Harnstoff solubilierte MalA-His<sub>6</sub> sollte über Ni-NTA beladene Spinsäulen aufgereinigt werden. Vor dem Auftragen auf die Spinsäulen wurde MalA-His<sub>6</sub> jeweils mit Hilfe von PD-10-Säulen umgepuffert. Im Falle von SDS lag MalA-His<sub>6</sub> nach der Umpufferung in Lysepuffer pH 8 mit 10 mM Imidazol und 0,2 % SDS vor, im Falle von Harnstoff in Lysepuffer pH 8 mit 8 M Harnstoff. Die umgepufferten Proteine wurden über Ni-NTA-Spinsäulen aufgereinigt (2.2.3.5). MalA-His<sub>6</sub> wurde im Falle von SDS unter nativen Bedingungen viermal mit 20 mM Imidazol im Waschpuffer gewaschen und mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer von der Nickelchelatsäule eluiert. Im Falle von Harnstoff wurde unter denaturierenden Bedingungen im 1. Waschschriff mit Waschpuffer pH 6,3, im 2.

Waschschritt mit Waschpuffer pH 5,9 gewaschen und im Anschluß mit Elutionspuffer pH 4,5 eluiert.



**Abb. 13: Aufreinigung von MalA-His<sub>6</sub> mit Ni-NTA-Spin-Säulen.** Die Auftrennung der Proteine aus den Fraktionen Durchlauf, Waschschritte und Eluat erfolgte im 13 %-igen SDS-Gel. In A) wurde MalA-His<sub>6</sub> vor der Chromatographie in 1 % SDS und in B) mit 8 M Harnstoff solubilisiert.

Das in 1 % SDS solubilisierte MalA-His<sub>6</sub> konnte über Ni-NTA-Spin-Säulen aufgereinigt werden (Abb.13 A). Nach vier Waschschritten wurde eine saubere 100 kDa Proteinbande von der Säule eluiert, bei der es sich um MalA-His<sub>6</sub> handeln musste.

Im Gegensatz dazu konnte das in Harnstoff solubilisierte MalA-His<sub>6</sub> nicht im Eluat gefunden werden (Abb.13 B). Auffallend ist, dass im Durchfluß keine Proteinbanden vorhanden waren. Dagegen war eine sichtbar saubere 100 kDa Proteinbande im 1. Waschschritt zu sehen, die mit großer Wahrscheinlichkeit MalA-His<sub>6</sub> darstellte. Da sich die Wasch- bzw. Elutionspuffer

nur im pH-Wert unterschieden, reichte vermutlich der im 1. Waschschrift vorhandene pH-Wert von 6,3 schon aus, um die Bindung von MalA-His<sub>6</sub> an Nickel-NTA zu lösen.

### 3.2.4.5 Einzelkanalmessungen mit MalA 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 einen offenen Kanal, durch den hydrophile Moleküle kleiner als 600 Da in die Zelle diffundieren. Anhand von Einzelkanalmessungen (Leitfähigkeitsmessungen) äußerer Membranproteine an künstlichen Lipid-Doppelmembranen ist es möglich zu bestimmen, ob das untersuchte Protein einen offenen oder geschlossenen Kanal bildet. Im letzteren Fall könnte dies auf ein TonB-abhängiges Protein hindeuten, was z. B. bei dem Membranrezeptor FhuA gezeigt werden konnte (Killmann *et al.*, 1993).

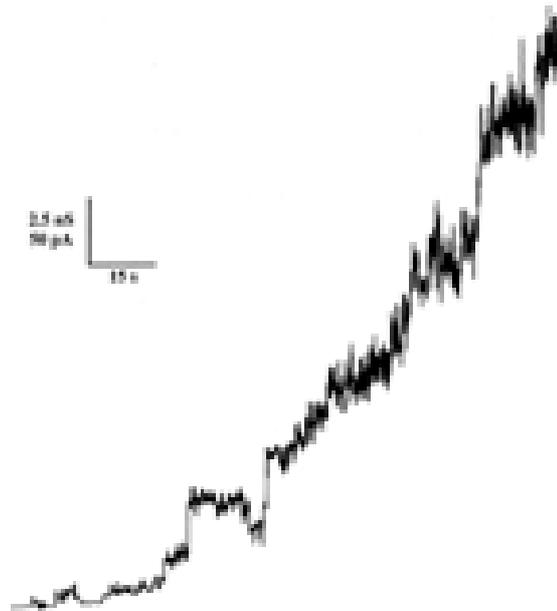
Einzelkanalmessungen mit MalA-His<sub>6</sub> sollten Aufschluß über einen eventuell TonB-abhängigen Rezeptor geben.

#### 3.2.4.5.1 Einzelkanalmessungen mit MalA-His<sub>6</sub> nach SDS-Solubilisierung

##### Einzelkanal-Leitfähigkeit

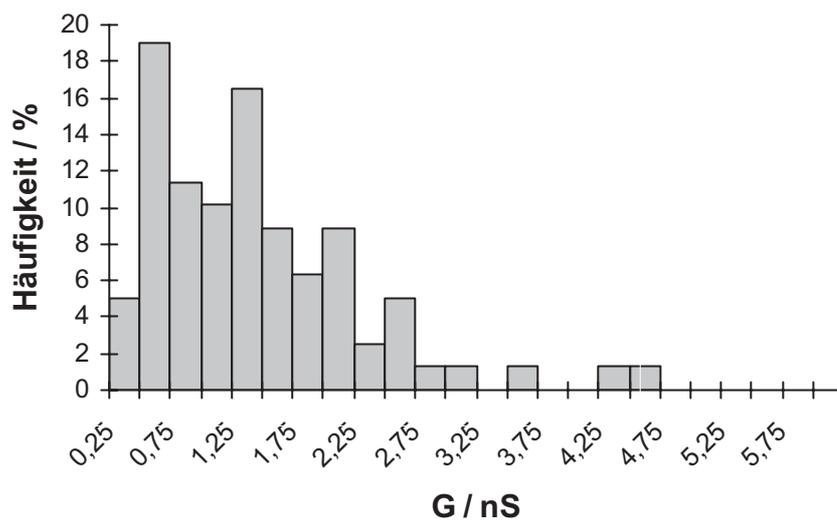
Mit dem in Kapitel 3.2.4.4 in 1 % SDS solubilisierten und über Ni-NTA-Spin-Säulen gereinigten MalA-His<sub>6</sub> wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. R. Benz in Würzburg an künstlichen Lipid-Doppelmembranen Einzelkanalmessungen durchgeführt (2.2.3.9). Dazu wurde nach Ausbildung der Lipid-Doppelmembran („black lipid“-Membran) in jedes Kompartiment der Teflonzelle wenige µl der gereinigten MalA-His<sub>6</sub>-Probe (Endkonzentration 5-10 ng/ml) nach 1:10-Verdünnung gegeben. Als Kontrollprobe diente der Stamm BL21 omp8 pBADMyc-HisB, der analog zu dem MalA-His<sub>6</sub> tragenden Stamm behandelt wurde.

Nach Zugabe von MalA-His<sub>6</sub> 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. 14). Es zeigte sich jedoch keine ausgeprägte stufenartige Zunahme der Leitfähigkeit, wie sie bei Porinen Gram-negativer Bakterien gefunden werden konnte (Benz *et al.*, 1985).



**Abb. 14: Einzelkanalmessung von MalA-His<sub>6</sub> (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  $10^9$  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. 15).



**Abb. 15: Histogramm der Wahrscheinlichkeit bestimmter Leitfähigkeitserhöhungen in Membranen aus DiphPC von MalA-His<sub>6</sub>.** 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.

In Abbildung 15 beträgt die häufigste Porenleitfähigkeit 0,5 nS. In drei weiteren Leitfähigkeitsmessungen von MalA-His<sub>6</sub> wurde die häufigste Porenleitfähigkeit bei 1,25 nS, 0,75 nS und 1,75 nS ermittelt (Daten nicht gezeigt). Im Durchschnitt betrug die häufigste Porenleitfähigkeit somit 1,06 nS. Somit bildete MalA in diesem Versuch einen Ionen-permeablen Kanal.

### Ionen-Selektivität

Zum Nachweis, ob MalA einen Kationen- oder Anionen-selektiven Kanal bildet, wurden außer den Einzelkanalmessungen mit KCl weitere Messungen mit den Elektrolyten LiCl und Kaliumacetat durchgeführt. Die Ionen dieser drei Salze unterscheiden sich in ihrer Beweglichkeit in wässriger Lösung. Die Beweglichkeit der Ionen ist abhängig von ihrer Ladung und ihrer Größe. Kalium und Chlorid haben etwa die gleiche Beweglichkeit in wässriger Lösung. Bei LiCl besitzt das Lithium-Kation aufgrund seiner höheren Ladungsdichte eine größere Hydrathülle, wodurch seine Beweglichkeit gegenüber Chlorid verlangsamt wird. Bei Kaliumacetat ist das Acetat-Anion aufgrund seiner Größe gegenüber dem Kalium-Kation weniger beweglich (Benz *et al.*, 1985). Da Lithium und Acetat die gleiche geringe Beweglichkeit in wässriger Lösung besitzen, ist ein Kanal dann Kationen-selektiv, wenn der Durchfluß von K<sup>+</sup> (aus Kaliumacetat) größer ist als Cl<sup>-</sup> (von LiCl), d.h. wenn die Erhöhungen der Leitfähigkeit mit Kaliumacetat größer sind als die mit LiCl. Anionenselektivität besteht dann, wenn umgekehrte Verhältnisse vorliegen. In Tabelle 14 sind die Leitfähigkeitserhöhungen von MalA-His<sub>6</sub>, gemessen in verschiedenen Salzlösungen, dargestellt.

**Tab. 14: Leitfähigkeitserhöhung in verschiedenen Salzlösungen**

	1 M KCl	1 M LiCl	1 M KAc
MalA-His <sub>6</sub>	1,27 nS	0,74 nS	2,08 nS

Angegeben ist die durchschnittliche Leitfähigkeitserhöhung von MalA-His<sub>6</sub> in verschiedenen Salzlösungen. Die künstliche Lipid-Doppelmembran bestand aus 1 % DiphPC gelöst in n-Decan.

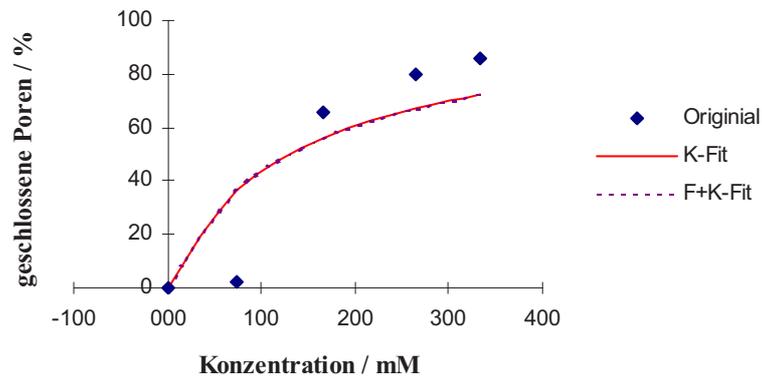
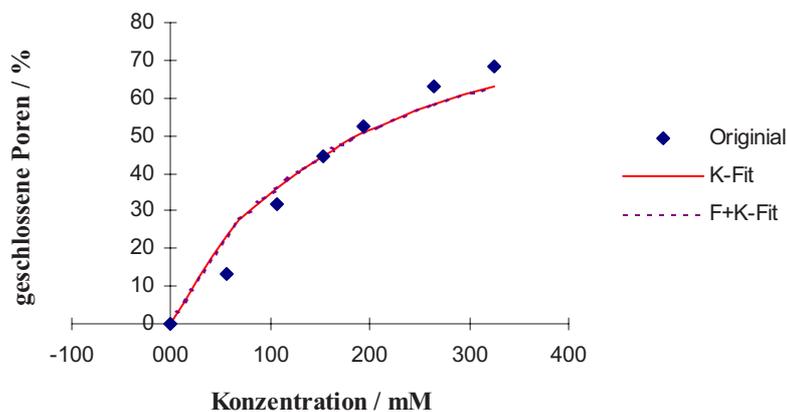
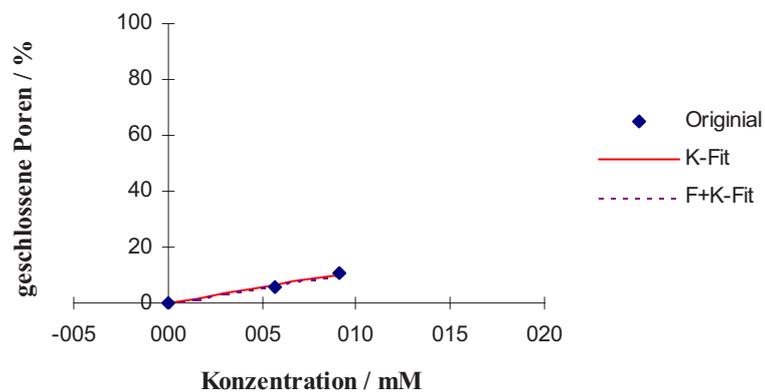
Mit LiCl konnte eine Leitfähigkeitserhöhung von 0,74 nS bestimmt werden, wohingegen mit Kaliumacetat eine Leitfähigkeitserhöhung von 2,08 ermittelt werden konnte. Daraus geht hervor, dass MalA selektiver für Kationen ist.

### **Titrationmessungen**

Porenformende Porine können eine Bindestelle im Kanal besitzen, um Substrate besser aufnehmen zu können. Durch Titrationmessungen kann ermittelt werden, ob bestimmte Substratmoleküle eine Bindestelle besitzen. Bei der Titrationmessung macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass der Ionenfluss durch die Pore unterbrochen ist, so lange ein Substratmolekül an die Bindestelle gebunden hat.

Im Falle von MalA sollte getestet werden, ob die vermuteten transportierten Substrate wie Maltose und Maltopentaose sowie der Maltodextrinrezeptorinhibitor Acarbose eine Bindung an MalA zeigen.

Nach Herstellung der Membran aus 1 % DiphPC in 1 M KCl wurde MalA zugegeben und der Leitfähigkeitsanstieg beobachtet. Nachdem sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte und die Leitfähigkeit nicht weiter anstieg wurde mit dem jeweiligen Substrat titriert. Dazu wurden steigende Mengen der entsprechenden Substratlösung in beide Kompartimente der Kammer gegeben. Als Folge der Substratzugabe kam es, wenn das Substrat an die Bindestelle gebunden hatte, zu einer stufenartigen Abnahme der Leitfähigkeit. Aus der Leitfähigkeit der Membran konnte in Abhängigkeit von der Substratkonzentration die Prozentzahl der besetzten Poren ermittelt werden. Die Titrationsergebnisse mit den jeweiligen Substraten sind in Abbildung 16 zusammengefaßt. Zur Kontrolle wurde mit den Zuckern Glucose und Fructose titriert.

**A) Titration von MalA mit Glucose****B) Titration von MalA mit Maltose****C) Titration von Mal A mit Maltopentaose****Abb. 16: Titration von MalA mit Glucose (A), Maltose (B) und Maltopentaose (C).**

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. Es wurde mit einer Stammlösung von 1 M Glucose, 1 M Maltose und 0,1 M Maltopentaose titriert.

Die Titration mit Maltose zeigte eine Zunahme der geschlossenen Poren mit steigender Maltosekonzentration (Abb. 16). Bei 350 mM Maltosezugabe waren in etwa 70 % der MalA-Poren geschlossen, d.h. es konnte eine Bindung von Maltose an MalA beobachtet werden. Maltopentaose zeigte ebenfalls eine leichte Bindung. Bei Zugabe von 10 mM Maltopentaose waren 10 % der MalA-Poren verschlossen. Widererwartend zeigte Glucose auch eine Bindung an MalA, wohingegen der nicht-Glucose-verwandte Zucker Fructose allerdings keinen Einfluß auf die Porenleitfähigkeit hatte (Daten nicht gezeigt).

Die Titration mit Acarbose erfolgte ebenfalls in 5 ml einer 1 M KCl-Lösung bei einer angelegten Spannung von 20 mV. Es wurde mit einer Endkonzentration von jeweils 1,5 mM, 18,5 mM und 33 mM Acarbose titriert. Dabei zeigte sich erst bei einer Konzentration von 33 mM Acarbose ein leichter Bindungseffekt (Daten nicht gezeigt).

#### **3.2.4.5.2 Einzelkanalmessungen mit MalA-His<sub>6</sub> nach Harnstoff-Solubilisierung**

Das in Kapitel 3.2.5.1 mit Harnstoff solubiliertes MalA-His<sub>6</sub>, welches im 1. Waschschrift der Ni-NTA-Säulenchromatographie eluiert wurde, wurde ebenfalls auf seine Leitfähigkeit in künstlichen Lipid-Doppelmembranen untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, ob das Ergebnis des in SDS-solubilierten MalA-His<sub>6</sub> (4.2.4.1) bestätigt werden konnte bzw. die Messergebnisse eine deutlichere Aussage über den Kanal machen würden.

Nach Zugabe von MalA-His<sub>6</sub> in die Messapparatur bei einer angelegten Spannung von 20 mV in einer 1 M KCl-Lösung zeigten sich stufenartige Leitfähigkeitserhöhungen, die sich allerdings auch in der Vektorkontrolle zeigten (Daten nicht gezeigt). Dabei handelte es sich somit um typische Porine des Expressionsstammes BL21 omp8. Das mit Harnstoff behandelte MalA schien aufgrund mangelnder Rückfaltung nicht mehr in seiner nativen, aktiven Form vorzuliegen.

#### **3.2.4.5.3 Versuch der MalA-Isolierung aus *Caulobacter crescentus***

Eine weitere Möglichkeit, MalA für die Kanalmessung aufzureinigen und somit das Ergebnis aus 3.2.4.4.1 zu überprüfen, war die Isolierung von MalA aus seinem natürlichen Organismus *C. crescentus*. Dadurch, dass vermutlich die Membranzusammensetzung von *C. crescentus* im Vergleich zu *E. coli* variiert, könnten eventuell mildere Detergenzien als SDS und Harnstoff zur Solubilisierung von MalA aus der Membran eingesetzt werden, die die Proteinstruktur

weniger angreifen würden. Eine anschließende Kanalmessung würde somit eventuell unter nativeren Bedingungen durchgeführt werden können.

Da MalA in seiner natürlichen Kopienzahl jedoch nicht im SDS-Gel sichtbar ist, musste *malA* in einen für *Caulobacter* replizierbaren Vektor kloniert werden. Dazu wurde *malA-his<sub>6</sub>* mit Hilfe der Primer cc2287ClaIforHisC und cc2287AseIrevHisC über PCR von pBAD2287His amplifiziert und in den Broad Host Range Vektor pBHR1 ligiert. Da MalA in großen Mengen für *E. coli* toxisch ist mußte direkt in *C. crescentus* JS1003 kloniert werden. Da die Klonierungseffizienz in *Caulobacter* allerdings sehr niedrig ist, gestaltete sich diese Klonierung sehr schwierig. Es war nicht möglich korrekt ligierte Klone zu bekommen. Auf eine Einzelkanalmessung des MalA-Proteins aus *C. crescentus* musste somit verzichtet werden.

### **3.3 Untersuchungen zur Funktion der Proteine TonB und ExbBD aus *C. crescentus***

In Kapitel 3.2.4.2 und 3.2.4.3 wurde gezeigt, dass die Maltodextrinaufnahme unabhängig von CC2328 (TonB) erfolgte, wohingegen die Proteine ExbBD1 für die Maltodextrinaufnahme essentiell waren. Im Folgenden sollten nun die Funktionen von TonB (CC2327) und ExbBD1 (CC2335-2336) aus *C. crescentus* näher untersucht werden. Im Anhang 2-4 sind die Homologievergleiche zwischen den TonB- und ExbBD-Proteinen von *C. crescentus* und *E. coli* dargestellt.

#### **3.3.1 Komplementationsversuch einer *E. coli tonB*-Mutante mit TonB und ExbBD aus *C. crescentus***

Die zellschädigenden Substanzen Colicin D, Colicin M, das Sideromycin Albomycin sowie der Phage A 80 gelangen bei *E. coli* TonB-abhängig über den äußeren Membranrezeptor FhuA in die Zelle (Hartmann *et al.*, 1997; Braun und Wolff, 1973; Ferguson *et al.*, 2001B). Nach Aufnahme der Liganden kommt es zum Zelltod. Die *E. coli* Mutante H2300, die kein TonB mehr besitzt, ist vor einer A 80-Phagen-Infektion geschützt und kann die Colicine D, M und Albomycin nicht mehr in die Zelle transportieren und überlebt.

Durch Komplementationsversuche sollte untersucht werden, ob TonB (CC2337) aus *C. crescentus* die Funktion von TonB in *E. coli* übernehmen kann. Dadurch könnte überprüft werden, ob es sich bei dem mutmaßlichen TonB aus *C. crescentus* um ein Energie-transduzierendes Protein handelt. Um auszuschließen, dass die Komplementation durch

fehlende Wechselwirkung zwischen *Caulobacter* TonB und *E. coli* ExbBD fehlschlägt, sollten die Gene *exbBD1* aus *C. crescentus* mitexprimiert werden.

Für den Versuch wurde *E. coli* H2300 mit *tonB* und *exbBD1* von *C. crescentus* auf dem Plasmid pETextonB (3.2.2.2) transformiert und die Proteinexpression durch IPTG induziert. Die Sensitivität der transformierten Mutante gegenüber den Liganden Colicin D, Colicin M, A 80 und Albomycin wurde anhand von Wachstumstests untersucht. Dazu wurde eine TY-Platte mittels TY-Topagar mit dem zu testenden Stamm überschichtet und jeweils Verdünnungen der entsprechenden Liganden aufgetropft (2.2.1.3). Als Kontrolle diente der *tonB*-tragenden *E. coli*-Stamm AB2847. Nach Inkubation wurden die Lysehöfe um die aufgetropften Liganden beurteilt.

**Tab. 15: Sensitivität der mit *cctonB* und *ccexbBD1* transformierten *E. coli*-Mutante H2300 gegenüber den angegebenen Liganden**

<i>E. coli</i> Stamm	Liganden			
	Colicin D	Colicin M	A 80	Albomycin
AB2847	4 (5)	2	3	1 (2,3)
H2300 pET-27b(+)	-	-	-	-
H2300 pETextonB	-	-	-	-

Die Sensitivität wurde im Doppelansatz durch Auftropfen von je 4 µl von 10<sup>-</sup> (ColicinD, M; A80) oder 3-fach-(Albomycin) Verdünnungen auf TY-Agarplatten getestet, die zuvor mit TY-Topagar und dem zu testenden Stamm überschichtet worden waren. Die Ergebnisse entsprechen den letzten Verdünnungsschritten, die eine klare Lysezone erscheinen ließen; z.B. bedeutet 2, dass eine zweifach Verdünnung der Stammlösung zur Lyse führte. Die in Klammern dargestellten Ergebnisse weisen auf trübe Lysezonen hin. Kein Lysehof ist durch '-' gekennzeichnet. pETextonB codiert für *cctonB* und *ccexbBD1*.

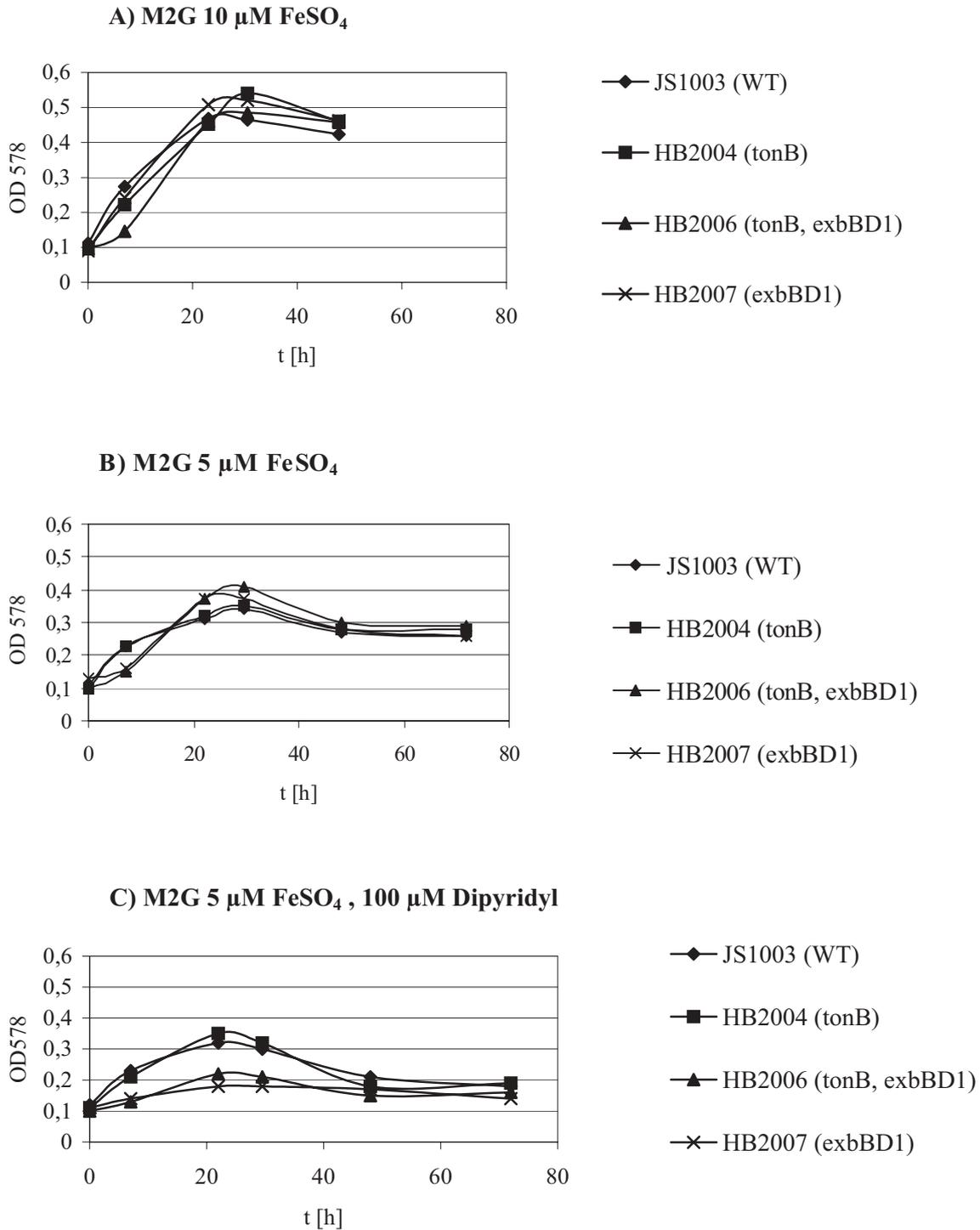
Die Sensitivitätstests in Tabelle 15 lassen erkennen, dass der *E. coli*-Kontrollstamm wie erwartet sensitiv gegenüber den Liganden Colicin D, M, dem Phagen A80 und Albomycin ist. Um die aufgetropften Lösungen waren deutliche Lysehöfe zu erkennen. Colicin D zeigte einen klaren Lysehof bei einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup>, Colicin M bei 10<sup>-2</sup>, A80 bei 10<sup>-3</sup> und Albomycin bei einer Verdünnung von 3<sup>-1</sup>. Im Gegensatz dazu zeigte die *E. coli tonB*-Mutante H2300, welche mit dem Vektor pET-27b(+) transformiert worden war, wie erwartet, keine Sensitivität gegenüber den Liganden. Wurde *tonB* und *exbBD1* aus *C. crescentus* auf dem Plasmid pETextonB in der *E. coli tonB*-Mutante H2300 exprimiert, so konnte allerdings auch hier keine Sensitivität gegenüber den Liganden beobachtet werden. Es waren keine Lysehöfe zu sehen.

### 3.3.2 Kann *C. crescentus* ohne TonB (CC2327) und ExbBD1 (CC2335-2336) unter Eisenmangel wachsen?

Außer den Lactobacillen benötigen alle Organismen ausreichende Konzentrationen an Eisenionen, da sie häufig als Kofaktoren von Enzymen bei zahlreichen Redoxreaktionen benötigt werden (Braun, 1985). Unter aeroben Bedingungen liegt Eisen jedoch in seiner unlöslichen Form von Eisen(III)-hydroxid vor, welches für die Mikroorganismen nicht frei verfügbar ist. Aufgrund dessen wird Eisen über sogenannte Siderophore, d.h. niedermolekulare eisenspezifische Komplexbildner, in die Zelle aufgenommen. Die Eisensiderophorkomplexe binden an spezifische Rezeptoren der äußeren Membran und werden TonB-abhängig in die Zelle transportiert (Braun, 1995).

In *C. crescentus* sollte untersucht werden, ob TonB und ExbBD1 ebenfalls an der Eisenaufnahme beteiligt sind. Dazu wurde das Wachstumsverhalten der TonB- und ExbBD1-Deletionsmutanten unter Eisenmangelbedingungen (M2G-Minimalmedium mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  und 100  $\mu\text{M}$  Dipyriddy) beobachtet. Als Kontrolle diente das Wachstumsverhalten in M2G-Minimalmedium mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  ohne den Eisenkomplexbildner Dipyriddy.

Die den Mittelwerten zweier unabhängig voneinander durchgeführten Messungengemessenen  $\text{OD}_{578}$ -Werten wurden Wachstumskurven erstellt, die in Abbildung 17 dargestellt sind.



**Abb. 17: Wachstumskurven verschiedener *C. crescentus*-Stämme bei Anzucht in M2G-Minimalmedium mit verschiedenen Eisenkonzentrationen.** 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 17 A dargestellten Wachstumsverläufe der untersuchten Stämme in M2G-Minimalmedium mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  zeigten einen einheitlichen Verlauf. Sowohl der Wildtyp JS1003 als auch die *tonB*-Mutante HB2004, die *exbBD1*-Doppelmutante HB2006 und die *tonB*, *exbBD1*-Dreifachmutante HB2007 stiegen innerhalb von 30 Stunden von  $\text{OD}_{578} = 0,1$  auf  $\text{OD}_{578} \approx 0,5$  an, erreichten dort ihre stationäre Phase und gingen dann in die Absterbephase über.

Reduzierte man die Eisenkonzentration auf 5  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (Abb. 17 B), so wurde im Allgemeinen nach 30 Stunden nur noch eine maximale  $\text{OD}_{578}$  von 0,4 erreicht. Betrachtet man die *tonB*-Mutante HB2004, so ist kein verändertes Wachstumsverhalten zum Wildtyp festzustellen. Die *exbBD1*-Mutanten HB2006 und HB2007 benötigten hingegen eine etwas längere Anlaufphase als der Wildtyp und die *tonB*-Mutante. Nach 7 Stunden betrug die  $\text{OD}_{578}$  von HB2006 und HB2007 0,15 bzw. 0,16, wohingegen der Wildtyp JS1003 eine  $\text{OD}_{578}$  von 0,23 aufwies. Nach der Anlaufphase stieg die  $\text{OD}_{578}$  allerdings auf ein Maximum von 0,37 bzw. 0,41 an wohingegen der Wildtyp nach 22 Stunden ein Maximum von 0,34 erreichte. Die weiteren Verläufe der Wachstumskurven von HB2006 und HB2007 zeigten schließlich ein vergleichbares Wachstumsverhalten zum Wildtyp JS1003.

Wurden die Stämme unter stärkerem Eisenmangel angezogen (Abb. 17 C), so erreichte der Wildtyp JS1003 die maximale  $\text{OD}_{578}$  von 0,32 schon nach 22 Stunden und ging schneller in die Absterbephase über als bei Anzucht in M2G mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ . Die *tonB*-Mutante HB2004 zeigte ein vergleichbares Wachstumsverhalten zum Wildtyp. Die Mutante HB2006 und HB2007 benötigten unter diesen Eisenmangelbedingungen auch hier eine etwas längere Anlaufphase als der Wildtyp und erreichten nur eine maximale  $\text{OD}_{578}$  nach 22 Stunden von 0,22 bzw. 0,18 bevor sie in die Absterbephase übergingen.

Bei Anzucht von *C. crescentus* JS1003 in Minimalmedium M2G ohne  $\text{FeSO}_4$  konnte kein Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.3 Erfolgt die Siderophoraufnahme bei *C. crescentus* TonB- bzw. ExbBD1-abhängig?**

Siderophore sind niedermolekulare Substanzen, die von Bakterien und Pilzen gebildet und ausgeschieden werden und der spezifischen hochaffinen Komplexierung von Eisen dienen. Erst nach Bildung des Eisen-Siderophorkomplexes ist das Bakterium fähig, das sonst unlösliche aber für das Wachstum essentielle Eisen über TonB-abhängige Rezeptoren über die äußere Membran in die Zelle zu transportieren. Dabei sind Bakterien in der Lage sowohl

die von ihnen selbst synthetisierten Eisenkomplexbildner als auch die Siderophore von Pilzen und Eisenquellen tierischer Wirte aufzunehmen (Hantke und Braun, 2000). Bei *C. crescentus* wurden bisher keine selbst synthetisierten Siderophore beschrieben.

Zunächst sollte getestet werden, ob bzw. welche Siderophore von *C. crescentus* zur Eisenaufnahme genutzt werden können. Dies sollte durch Wachstumstests auf Minimal-Agarplatten (M2-CAS) unter Eisenmangelbedingungen mit verschiedenen Siderophoren untersucht werden. M2-CAS entspricht dem M2G-Minimalmedium ohne FeSO<sub>4</sub> mit 0,2 % Casaminosäuren, in welchem die in Spuren vorhandenen Eisenionen für das Wachstum von *C. crescentus* JS1003 ausreichen. Durch Zugabe von Eisenkomplexbildner sollte Eisenmangel hervorgerufen werden. Zuerst mussten Eisenmangelbedingungen bestimmt werden, bei denen ein Wachstum ohne Siderophor nicht mehr möglich war. *C. crescentus* wurde dazu mittels Minimal-Topagar (M2-CAS) auf Minimal-Agarplatten (M2-CAS), die verschiedene Konzentrationen der Eisenkomplexbildner Dipyridyl bzw. EDDA enthielten, ausgesät. Nach 17 Stunden Inkubation der Platten wurde das Wachstum ausgewertet.

**Tab. 16: Wachstum von *C. crescentus* auf Minimal-Agarplatten (M2-CAS) mit verschiedenen Konzentrationen an Eisenkomplexbildner.**

	0 µM	50 µM	100 µM	10 µM	50 µM	50 µM Dip
	Dip	Dip	Dip	EDDA	EDDA	10 µM EDDA
Wachstum	+++	+++	++	+	-	-

Die Ergebnisse entsprechen dem Wachstum von JS1003, welcher mittels Minimal-Topagar auf M2-CAS-Platten mit den jeweiligen Eisenkomplexbildner ausgesät wurde. Dip steht für Dipyridyl. +++ entspricht starkem Wachstum, ++ entspricht Wachstum, + entspricht schwachem Wachstum, - steht für kein Wachstum.

Wie in Tabelle 16 erkennbar ist, konnte durch Zugabe von 50 µM EDDA bzw. 50 µM Dipyridyl + 10 µM EDDA Eisenmangel hergestellt werden, der ein Wachstum von JS1003 nicht mehr ermöglichte. Wurden dem Medium 10 µM EDDA zugesetzt, konnte ebenfalls schon ein Einfluß des Eisenkomplexbildners festgestellt werden. Das Wachstum war hier deutlich schwächer als ohne Komplexbildner.

Im Folgenden wurden die Siderophoraufnahmetests mit 10 µM EDDA bzw. 50 µM Dipyridyl + 10 µM EDDA durchgeführt.

Um zu testen, welche Siderophore von *C. crescentus* genutzt werden konnte, wurden M2-CAS-Agarplatten mit JS1003 mittels M2-CAS-Topagar überschichtet und Filterplättchen aufgelegt, die zuvor mit 10 µl einer 1 mM Siderophorlösung versetzt wurden. Nach 17

stündiger Inkubation der Platten wurden die Wachstumshöfe um die Siderophorplättchen ausgewertet. Das breite Spektrum der Siderophore bestand aus Citrat, Fusigen, Arthrobactin, Aerobactin, Schizokinen, Rhodotorulasäure, Ferrichrom, Ferrichrom A, Desferal, Coprogen, Dihydroxybenzoesäure, Ferricrocin, Rhizoferrin und Staphyloferrin.

**Tab. 17: Siderophortest von *C. crescentus* JS1003**

Siderophor	Wachstum auf M2-CAS-Agarplatten mit	
	10 $\mu$ M EDDA	50 $\mu$ M Dipyridyl, 10 $\mu$ M EDDA
Citrat	-	-
Fusigen	-	-
Arthrobactin	-	-
Schizokinen	-	-
Rhodotorulasäure	-	-
Ferrichrom	-	-
Ferrichrom A	-	-
Rhodotorulasäure	15	9
Desferal	18	16
Coprogen	-	-
Dihydroxybenzoesäure	-	-
Ferricrocin	-	-
Rhizoferrin	-	-
Staphyloferrin	-	-

Die Ergebnisse entsprechen den Wachstumshöfen um die Filterplättchen, die das jeweilige Siderophor (1 mM) enthielten und auf M2-CAS-Minimalagarplatten mit 10  $\mu$ M EDDA bzw. 50  $\mu$ M Dipyridyl + 10  $\mu$ M EDDA gelegt wurden, die zuvor mit *C. crescentus* JS1003 mit Hilfe von M2-CAS-Topagar überschichtet worden waren. Die Wachstumszonen entsprechen dem Durchmesser in mm inkl. des Filterplättchens (6 mm). Kein Wachstum ist durch '-' gekennzeichnet.

Die Siderophoraufnahmetests von *C. crescentus*, welche in Tabelle 17 dargestellt sind, belegen, dass nur die getesteten Siderophore Rhodotorularsäure und Desferal ein Wachstum ermöglichten. Mit Rhodotorulasäure waren Wachstumshöfe von 15 bzw. 9 mm zu sehen, mit Desferal wurden Wachstumshöfe von 18 bzw. 16 mm erzielt. Dagegen führten die anderen getesteten Siderophore zu keinem Wachstum von *C. crescentus*.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Siderophore Rhodotorulasäure und Desferal TonB- und ExbBD1-abhängig von *C. crescentus* aufgenommen werden. Die

Aufnahmetests wurden ebenfalls auf M2-CAS-Agarplatten mit Eisenkomplexbildner durchgeführt, die mit dem zu testenden Stamm mittels M2-CAS-Topagar überschichtet wurden. Es wurden Filterplättchen aufgelegt, die zuvor mit je 10 µl der zu testenden 1 mM Siderophorlösung versetzt wurden. In diesem Versuch wurden sowohl eisenfreie Siderophore als auch mit 1 mM FeCl<sub>3</sub> beladene Siderophore getestet, um zu gewährleisten, dass auf jeden Fall Eisenkomplexe vorhanden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgelistet.

**Tab. 18: Siderophoraufnahme von *C. crescentus*-Stämmen**

Stamm	Wachstum auf M2-CAS-Platten					
	ohne Eisenkomplexbildner		10 µM EDDA		50 µM Dip, 10 µM EDDA	
	Siderophor	Wh	Siderophor	Wh	Siderophor	Wh
JS1003	Rh	Rasen	Rh	15	Rh	9
(WT)	Rh+Fe	Rasen	Rh+Fe	25	Rh+Fe	20
	Des	Rasen	Des	18	Des	25
	Des+Fe	Rasen	Des+Fe	32	Des+Fe	25
HB2004	Rh	Rasen	Rh	15	Rh	12
( <i>tonB</i> )	Rh+Fe	Rasen	Rh+Fe	25	Rh+Fe	20
	Des	Rasen	Des	23	Des	20
	Des+Fe	Rasen	Des+ Fe	35	Des+Fe	30
HB2006	Rh	20	Rh	14	Rh	0
( <i>tonB</i> ,	Rh+Fe	30	Rh+Fe	20	Rh+Fe	20
<i>exbBD1</i> )	Des	30	Des	30	Des	15
	Des+Fe	35	Des+Fe	30	Des+ Fe	25
HB2007	Rh	14	Rh	0	Rh	0
( <i>exbBD1</i> )	Rh+Fe	20	Rh+Fe	15	Rh+Fe	13
	Des	20	Des	16	Des	15
	Des+Fe	25	Des+Fe	30	Des+Fe	25

Die Ergebnisse entsprechen den Wachstumshöfen um die Filterplättchen, die das jeweilige Siderophor (1 mM) enthielten und auf M2-CAS-Minimalagarplatten mit 10 µM EDDA bzw. 50 µM Dipyrindyl + 10 µM EDDA gelegt wurden, die zuvor mit dem entsprechenden Stamm mit Hilfe von M2-CAS-Topagar überschichtet worden waren. Rh steht für Rhodotorulasäure, Fe für FeCl<sub>3</sub>, Des für Desferal, Wh für Wachstumshof. Die Wachstumshöfe entsprechen dem Durchmesser in mm inkl. des Filterplättchens (6mm). Rasen bedeutet, dass die ganze Platte bewachsen war. Die Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumstests.

Wie in Tabelle 18 ersichtlich ist, konnte der Wildtypstamm *C. crescentus* JS1003 auf M2-CAS-Platten ohne Eisenkomplexbildner auch außerhalb der Siderophorplättchen wachsen. Es war ein Bakterienrasen zu sehen. Wurde Eisenmangel durch 10  $\mu\text{M}$  EDDA hervorgerufen, konnte ein Wachstum von JS1003 nur noch um die Siderophore beobachtet werden. Um Rhodotorulasäure war ein Wachstumshof von 15 mm sichtbar, wohingegen die mit  $\text{FeCl}_3$  beladene Rhodotorulasäure zu einem Wachstumshof von 25 mm führte. Mit Desferal und eisenbeladenem Desferal konnten Wachstumshöfe von JS1003 bei 10  $\mu\text{M}$  EDDA von 18 bzw. 32 mm erzielt werden. Erhöhte man den Eisenmangel durch die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Dipyridyl und 10  $\mu\text{M}$  EDDA, so waren etwas kleinere Wachstumshöfe bei JS1003 zu sehen. Der Durchmesser betrug um Rhodotorulasäure 9 mm, um die eisenbeladene Rhodotorulasäure 20 mm und um Desferal und eisenbeladenes Desferal je 25 mm.

Betrachtet man die *tonB*-Mutante HB2004, so konnte im Vergleich zum Wildtyp JS1003 kein verändertes Wachstumsverhalten festgestellt werden. Ohne Eisenmangel waren jeweils Bakterienrasen zu sehen, wohingegen unter Eisenmangelbedingungen Wachstum nur um die Siderophorplättchen sichtbar war. Wurde Eisenmangel durch 10  $\mu\text{M}$  EDDA hervorgerufen, konnten Wachstumshöfe um Rhodotorulasäure, eisenbeladener Rhodotorulasäure, Desferal und eisenbeladenem Desferal von je 15, 25, 23 und 35 mm beobachtet werden. Unter stärkerem Eisenmangel, hervorgerufen durch 50  $\mu\text{M}$  Dipyridyl und 10  $\mu\text{M}$  EDDA, waren etwas kleinere Höfe sichtbar von je 12, 20, 20 und 30 mm.

Im Gegensatz dazu zeigte die *tonB*, *exbBD1*-Dreifachmutante HB2006 und die *exbBD1*-Doppelmutante HB2007 ein etwas verändertes Wachstumsverhalten. Auf M2-CAS-Platten ohne Eisenkomplexbildner konnten diese Mutanten nur um die Siderophor-beladenen Filterplättchen wachsen, was sich an den gemessenen Wachstumshöfen bei HB2006 von 20 bzw. 30 mm um Rhodotorulasäure bzw. eisenbeladener Rhodotorulasäure und bei HB2007 von 14 bzw. 20 mm zeigte. Um Desferal und eisenbeladenem Desferal waren bei HB2006 Wachstumshöfe von 20 bzw. 25 mm und bei HB2007 von 15 bzw. 30 mm sichtbar. Außerhalb der Filterplättchen konnte im Gegensatz zum Wildtyp und der *tonB*-Mutante HB2004 kein Wachstum beobachtet werden. Wurde für die Mutante HB2006 durch 10  $\mu\text{M}$  EDDA noch stärkerer Eisenmangel erzeugt, konnten um Rhodotorulasäure und eisenbeladener Rhodotorulasäure Wachstumshöfe von 14 bzw. 20 mm ermittelt werden. Mit Desferal und eisenkomplexiertem Desferal waren jeweils 30 mm breite Höfe sichtbar. Erhöhte man den Eisenmangel durch die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Dipyridyl und 10  $\mu\text{M}$  EDDA, war um Rhodotorulasäure kein Wachstum mehr sichtbar. Allerdings konnten mit

eisenkomplexierter Rhodotorulasäure, Desferal und eisenbeladenem Desferal Wachstumshöfe von 20, 15 und 25 mm beobachtet werden.

Die Dreifach-Mutante HB2007 konnte unter den vorhandenen Eisenmangelbedingungen durch 10  $\mu$ M EDDA bzw. 50  $\mu$ M Dipyridyl und 10  $\mu$ M EDDA um Rhodotorulasäure ebenfalls nicht mehr wachsen. Ein Wachstum mit eisenkomplexierter Rhodotorulasäure, Desferal und FeCl<sub>3</sub> beladenem Desferal war jedoch möglich. Es erschienen bei 10  $\mu$ M EDDA Wachstumshöfe von 15, 16 und 30 mm und bei 50  $\mu$ M Dipyridyl und 10  $\mu$ M EDDA Wachstumshöfe von 13, 15 und 25 mm.

Somit zeigte sich, dass die Siderophoraufnahme bei *C. crescentus* unabhängig von TonB (CC2327), jedoch abhängig von ExbBD1 (CC2335-2336) erfolgt.

### 3.3.4 Sequenzanalyse zur Identifizierung TonB-homologer Proteine in *C. crescentus*

Da die TonB-Mutante HB2004 im Vergleich zum Wildtyp JS1003 keinen veränderten Phänotyp bezüglich Wachstum mit Maltodextrinen, Wachstum unter Eisenmangel und Siderophoraufnahme zeigte, sollte nach homologen TonB-Sequenzen im Genom von *C. crescentus* gesucht werden, welche eventuell für Proteine codieren, die den vermuteten energieabhängigen Transport von Eisensiderophorkomplexen bzw. größeren Maltodextrinen ermöglichen. Dazu wurde die Genomsequenz von *C. crescentus* mit der mutmaßlichen TonB-Sequenz (CC2327) geblastet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/proteomes.html>).

Es ergab sich eine Reihe von homologen Proteinen, die in der Datenbank meist nur mit 'hypothetical protein' bezeichnet und bisher nicht näher beschrieben wurden. Das Protein, welches den besten BLAST score zeigte, war das Protein CC3508. Es zeigte eine Identität von 41 % und Homologie von 58 % zu TonB aus *C. crescentus* (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePage.spl?locus=CC2327>), besteht aus 401 Aminosäuren und ist in der Datenbank nicht näher charakterisiert.

### 3.3.5 Identifizierung des Tol-PAL-Clusters in *C. crescentus* durch Sequenzvergleiche

In *E. coli* ist das in der Cytoplasmamembran verankerte TolA neben TonB für die Bereitstellung der Energie für Transportprozesse an der äußeren Membran zuständig (Cascales *et al.*, 2001). Da die *tonB*-Mutante HB2004 im Vergleich zum Wildtyp keinen veränderten Phänotyp zeigte und Sequenzanalysen kein zweites TonB identifizierten, sollte der Frage nachgegangen werden, ob es in *C. crescentus* TolA bzw. ein TolA-ähnliches

Protein gibt, welches eventuell die Energie für den Substrattransport von der Cytoplasmamembran auf den äußeren Membranrezeptor überträgt.

In der Datenbank wird im Genom von *C. crescentus* kein TolA-Protein vorhergesagt. Sequenzhomologien von TolA aus *E. coli* mit dem *Caulobacter*-Genom waren ebenfalls nicht vorhanden. Blastet man das mutmaßliche TonB-Protein CC2327 gegen das Genom von *C. crescentus* (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/proteomes.html>), so erhält man einen Treffer mit 28 % Identität und 50 % Homologie, bei dem es sich um das in der Datenbank mit `OmpA family protein` benannten Protein CC3231 handelt. Blastet man dieses Protein gegen die Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/blast2>), zeigt sich eine Homologie von 43 % zu dem mutmaßlichen TolA-Protein aus *Agrobacterium tumefaciens*. Es konnten ebenfalls geringe Homologien zu den TolA-Proteinen aus *Brucella melitensis* und *Xanthomonas axonopodis* berechnet werden. Die zu CC3231 benachbarten Gene *cc3232* und *cc3233* werden in der Datenbank mit `ExbD/TolR family protein` bzw. `MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein` und in Kapitel 2.2.2.5.5 mit *exbBD2* bezeichnet. Wenn man annimmt, dass es sich bei CC3231 um TolA handelt, könnte es sich somit bei CC3232 und CC3233 um TolR bzw. TolQ handeln. Das Gen *cc3230* codiert laut Datenbankeintrag für TolB. Zur Identifizierung des PAL-Proteins, welches in *E. coli* Teil des energietransduzierenden Tol-PAL-Systems ist, wurde das Genom von *C. crescentus* mit der PAL-Sequenz aus *E. coli* geblastet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/proteomes.html>). Mit 49 % Identität ergab sich der Treffer CC3229, dessen codierende Gensequenz an *tolB* (*cc3230*) grenzt. In Tabelle 19 sind die den Genen durch Sequenzvergleiche zugeordneten Proteine zusammengestellt. In Anhang 5-7 sind die Homologievergleiche der Proteine aus *C. crescentus* und *E. coli* abgebildet.

**Tab. 19: Hypothetisches Tol-PAL-Cluster in *C. crescentus***

Gen	Datenbankbezeichnung	durch Sequenzvergleiche hypothetisches Protein
cc3229	OmpA family protein	PAL
cc3230	TolB	TolB
cc3231	hypothetical protein	TolA
cc3232	ExbD/TolR	TolR
cc3233	MotA/TolQ/ExbB proton channel protein	TolQ

Die Genbezeichnung entspricht der Annotierung in der GenBank-Datenbank, accession no. AE005673. Die Ableserichtung der Gene entspricht der Ableserichtung der homologen Gene von *E. coli*.

## 4. Diskussion

TonB-abhängige Membranrezeptoren sind bei Gram-negativen Bakterien für den aktiven Transport von Substraten mit Hilfe des TonB/ExbBD-Komplexes verantwortlich. Bislang wurden TonB-abhängige Energie-gekoppelte Transportsysteme nur für die Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-Aufnahme beschrieben.

Die Genomsequenz von *Caulobacter crescentus* sagt 65 TonB-abhängige Membranrezeptoren voraus (Nierman *et al.*, 2001), was im Vergleich zu anderen sequenzierten Genomen die bisher größte Anzahl an vorhergesagten TonB-abhängigen Proteinen darstellt. In *P. aeruginosa* wurden 34 TonB-abhängige Transporter identifiziert (Stover *et al.*, 2000), wohingegen in allen anderen sequenzierten Genomen der Proteobakterien nicht mehr als jeweils 13 TonB-abhängige Rezeptoren vorhergesagt werden. Für das in nährstoffarmen Gewässern vorkommende Bakterium *C. crescentus* werden außerdem keine Porine des OmpF-Typs vorhergesagt, welche z. B. bei *E. coli* die passive Diffusion von hydrophilen Molekülen über die äußere Membran erlauben. Außerdem konnten im Vergleich zu *E. coli* oder *V. cholerae* (Paulsen *et al.*, 2000) wesentlich weniger cytoplasmatische Membrantransporter identifiziert werden (Nierman *et al.*, 2001). Das Vorhandensein vieler Energie-gekoppelter äußerer Membranproteine für spezifische Substrate und weniger spezifischen cytoplasmatischen Transporter könnte die Adaptierung von *C. crescentus* an nährstoffarme Habitate erklären.

Da die vorhergesagten 65 TonB-abhängigen Rezeptoren von *C. crescentus* vermutlich nicht alle für die Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-Versorgung notwendig sind, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob einem der äußeren Membranproteinen eine Transportfunktion für andere Substrate als Eisen und Vitamin B<sub>12</sub> zugeordnet werden kann. Insbesondere sollte getestet werden, ob Maltose bzw. Maltodextrine, die bei *E. coli* durch erleichterte Diffusion über LamB aufgenommen werden, von *C. crescentus* TonB-abhängig in die Zelle transportiert werden.

### 4.1 Vergleich des Membranproteinmusters von *C. crescentus* nach Anzucht in verschiedenen Medien

Eine Auftrennung und Identifizierung äußerer Membranproteine von *C. crescentus* durch 2-D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Analyse wurde bereits in Phadke *et al.*, 2001 beschrieben. Nach Anzucht in Komplexmedium PYE wurden 54 Membranproteine mit

MALDI-TOF analysiert, von denen 41 Proteine als mutmaßliche äußere Membranproteine identifiziert wurden. Darunter befanden sich wiederum 16 Proteine, die als mutmaßliche TonB-abhängige Rezeptoren definiert werden konnten. Eine genaue Untersuchung einer spezifischen Transportfunktion wurde jedoch nicht durchgeführt.

Eine vergleichende Analyse der äußeren Membranproteine der in Komplexmedium PYE und Minimalmedium M2G angezogenen *C. crescentus*-Zellen ergab ein annähernd gleiches Grundmuster an exprimierten Proteinen, wobei in Minimalmedium eine Zunahme an höhermolekularen Proteinen beobachtet werden konnte. Von zwölf in Minimalmedium exprimierten Proteinen wurden mit MALDI-TOF vier Proteine als mutmaßliche TonB-abhängige Rezeptoren identifiziert, denen jedoch auch keine spezifische Transportfunktion nachgewiesen wurde. Da diese Proteine allerdings im Vergleich zum Komplexmedium PYE unter Minimalmediumbedingungen verstärkt exprimiert worden waren, kann dies als Hinweis gesehen werden, dass die identifizierten mutmaßlichen TonB-abhängigen Rezeptoren eine Rolle bei der Nährstoffaufnahme spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls das Proteinmuster der äußeren Membran von *C. crescentus* nach Anzucht in verschiedenen Medien analysiert, um Proteine zu finden, hauptsächlich TonB-abhängige Rezeptoren, deren Expression in Abhängigkeit des jeweiligen Nährstoffangebotes hoch- bzw. runterreguliert ist. Insbesondere sollte die Expression der Membranproteine bei Anzucht in Minimalmedium mit Maltose im Vergleich zu Minimalmedium mit Glucose untersucht werden und ein Protein gefunden werden, dem eine Transportfunktion für Maltose bzw. Maltodextrine zugeordnet werden kann.

Eine eindimensionale Auftrennung der äußeren Membranproteine durch eine SDS-PAGE reichte jedoch nicht aus, um Unterschiede in der Proteinzusammensetzung aufzuzeigen (Abb. 1). Die Auftrennung der äußeren Membranproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese erzielte dagegen Erfolg. Bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen traten deutliche Unterschiede in der Zahl und Intensität der Proteine auf. Es konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass bei Anzucht in Komplexmedium PYE vor allem im höhermolekularen Bereich Proteine stärker exprimiert worden waren als bei Anzucht in Minimalmedium (Abb. 5 a-c). Das ist darauf zurückzuführen, dass PYE im Vergleich zum Minimalmedium wesentlich mehr Nährstoffe enthält, die vom Bakterium aufgenommen werden können. Dies hat zur Folge, dass es unter anderem zur Induktion der Expression von Membranproteinen kommt, die für die Aufnahme von Substraten dienen. Wenn man berücksichtigt, dass *C. crescentus* in seiner natürlichen Umgebung in nährstoffarmen Habitaten vorkommt, könnte man sich vorstellen, dass die erhöhte Membranproteinsynthese

dazu dient, so viele Nährstoffe wie möglich aufzunehmen und sie in der Zelle zu speichern, um ein späteres Überleben unter nährstoffarmen Bedingungen zu erleichtern.

Bei den nach PYE-Kultivierung verstärkt exprimierten Membranproteinen handelte es sich nach MALDI-TOF-Aussage überwiegend um TonB-abhängige Rezeptoren, die in der Datenbank nicht näher charakterisiert sind (Tab. 8) und deren TonB-Abhängigkeit bisher nicht überprüft wurde. Sequenzvergleiche zeigten Homologien zu eisentransportierenden Rezeptoren, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich darunter eventuell auch Rezeptoren befinden, die für den Transport von anderen Substraten als Eisen verantwortlich sind. Da das Komplexmedium PYE aus Hefeextrakt und Pepton besteht und somit eine Vielzahl an aufnehmbaren Substraten enthält, war es nicht möglich, einem durch MALDI-TOF identifizierten TonB-abhängigen Rezeptor, der bei Anzucht in Komplexmedium verstärkt synthetisiert wurde, eine Transportfunktion für ein bestimmtes Substrat zuzuordnen.

Aufgrund dessen fokussierte sich die folgende Arbeit auf das Protein MalA (CC2287), welches als einziges sichtbares Protein bei Anzucht in Minimalmedium mit Maltose stärker exprimiert worden war als bei Kultivierung in Minimalmedium mit Glucose (Abb. 8). Da sich die Minimalmedien nur in der Kohlenstoffquelle unterscheiden und die Expression von MalA durch Maltose induziert wurde, ergab sich der Hinweis, dass es sich bei MalA vermutlich um ein für die Maltose- bzw. Maltodextrinaufnahme verantwortliches Protein handeln könnte. Nach Aussage der MALDI-TOF-Analyse sollte auch MalA (CC2287) die Eigenschaft eines TonB-abhängigen Rezeptors besitzen (Tab. 8). Möglicherweise werden Maltodextrine mittels MalA TonB-abhängig transportiert.

Die Identifizierung von MalA mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigte, dass es anhand dieser Methode möglich ist, Proteine zu identifizieren, die in Abhängigkeit jeweiliger Nährstoffangebote eine unterschiedliche Genexpression aufweisen. Wenn man die genaue Nährstoffzusammensetzung der Medien kennt, kann im Falle von Membranrezeptoren ein potentielles transportiertes Substrat definiert werden. Um Proteine zu identifizieren, die z.B. Aminosäuren oder Phosphate transportieren, könnte man *C. crescentus* in weiteren unterschiedlich zusammengesetzten Minimalmedien kultivieren, dessen Membranproteinmuster vergleichen und mit MALDI-TOF analysieren. Handelt es sich dabei um TonB-abhängige Rezeptoren müsste die Transportfunktion nachgewiesen werden, so wie es in der vorliegenden Arbeit bei MalA durchgeführt wurde.

## 4.2 MalA hat die Funktion eines Maltodextrinrezeptors

Die durch Maltose induzierte Expression von MalA ließ vermuten, dass es sich bei diesem durch MALDI-TOF identifizierten TonB-abhängigen Membranrezeptor um einen Maltodextrintransporter handelt.

Sequenzvergleiche zeigten, dass MalA Ähnlichkeiten zu Eisenkomplextransportern aufweist (3.1.5). Allerdings ist MalA mit 921 Aminosäuren viel größer als die meisten bisher identifizierten Eisentransporter. Da die MalA-Expression durch Maltose induziert wurde, ist vermutlich auszuschließen, dass es sich bei MalA um einen Eisenkomplextransporter handelt. Sequenzhomologien von MalA zu dem für die erleichterte Diffusion von Maltodextrinen verantwortlichen äußeren Membranprotein LamB aus *E. coli* sind nicht vorhanden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass MalA aus *C. crescentus* für die Maltodextrinaufnahme zuständig ist, da *C. crescentus* und *E. coli* phylogenetisch nicht sehr nah miteinander verwandt sind. Die Tatsache, dass benachbarte Gene von *malA* für vorhergesagte Proteine des Zuckerstoffwechsels codieren (3.1.5) unterstützt die Annahme, dass MalA eine Rolle bei der Aufnahme der Zucker Maltodextrine spielen könnte.

### Maltodextrine werden MalA-abhängig aufgenommen

Wachstumstests der *malA*-Mutante HB2003 mit verschiedenen Maltodextrinen auf Minimalagarplatten ohne C-Quelle zeigten im Vergleich zum Wildtyp kleinere Wachstumshöfe um die Filterplättchen mit Maltotriose und –tetraose, wohingegen um Maltopentaose und –hexaose keine Wachstumshöfe mehr sichtbar waren (3.2.1). Dieses Ergebnis bestätigte die Hypothese, dass MalA für die Aufnahme der Maltodextrine verantwortlich sein musste. Die Aufnahme der größeren Maltodextrine war an MalA gebunden. Der dem Wildtyp entsprechende Wachstumshof von HB2003 um Maltose und die im Vergleich zum Wildtyp kleineren Wachstumshöfe um Maltotriose und –tetraose belegten, dass die kleineren Maltodextrine jedoch auch unabhängig von MalA in die Zelle aufgenommen werden konnten. Dies ist vermutlich auf die relativ kleinen Größen von Maltose mit 360 Da, Maltotriose mit 504 Da und –tetraose mit 667 Da zurückzuführen, welche es erlauben über reine Diffusion mittels Porine durch die äußere Membran in die Zelle zu gelangen (Nikaido, 1994). Dies setzt allerdings voraus, dass *C. crescentus* die für den passiven Transport notwendigen Porine in der äußeren Membran besitzen muss, welche in der

Genomsequenz jedoch nicht vorhergesagt werden. Deswegen können die Wachstumstests außerdem belegen, dass *C. crescentus* Porine für die reine Diffusion besitzen muss.

Im Falle von LamB, durch welches bei *E. coli* Maltodextrine mittels erleichterter Diffusion in die Zelle aufgenommen werden (Benz 1994) kann ebenfalls beobachtet werden, dass die kleineren Maltodextrine wie Maltose, Maltotriose und Maltotetraose unabhängig von LamB durch reine Diffusion über andere Porine in die Zelle gelangen können. Die Aufnahme der größeren Maltodextrine wie Maltopentaose und -hexaose ist bei *E. coli* an das Maltoporin LamB gebunden. Dies stellt eine Gemeinsamkeit zwischen MalA aus *C. crescentus* und dem Maltoporin LamB aus *E. coli* dar, wodurch die Annahme der Maltodextrinrezeptorfunktion von MalA unterstützt wird.

Der Test auf Komplementation einer *E. coli lamB*-Mutante mit MalA aus *C. crescentus* sollte auf eine weitere Weise die Funktion von MalA als Maltodextrinrezeptor überprüfen (3.2.2). Dazu war es notwendig, *malA* aus *C. crescentus* in *E. coli* exprimieren zu können. Die Klonierung in Expressionsvektoren gestaltete sich jedoch schwierig. Ohne vollständige Promotorregulation war es nicht möglich, *malA* in *E. coli* zu klonieren. Es entstanden nur „nonsense“-Mutanten. Eine erfolgreiche Klonierung erfolgte erst in den unter strenger Arabinosekontrolle stehenden Expressionsvektor pBADMyc-HisB. Wurde *malA* in *E. coli* exprimiert, konnte man während der Induktionsphase im Vergleich zu einem nicht-transformierten Stamm ein langsames Absterben der Bakterien beobachten. Dies zeigte, dass es sich bei MalA um ein für *E. coli* toxisches Protein handeln muss. Da MalA mit 921 Aminosäuren ein relativ großes äußeres Membranprotein darstellt, ist es denkbar, dass ein eventuell gebildeter Kanal so große Ausmaße annimmt, dass toxische Stoffe in die Bakterienzelle eindringen können und zum Absterben der Bakterienzelle führen.

Die Komplementationsversuche von LamB mit MalA (3.2.2) zeigten keinen Erfolg. Im Gegensatz zur Expression in TY-Medium erfolgte unter den gewählten M9-Minimalmedium Bedingungen aus unerklärlichen Gründen keine MalA-Expression. Obwohl der Versuch mit drei unterschiedlichen *E. coli lamB*-Mutanten durchgeführt wurde, konnte bei keinem der transformierten Stämme die Expression von MalA mittels Westernblot nachgewiesen werden. Vielleicht führte die Anzucht von *E. coli* in Minimalmedium zu einer Membranzusammensetzung, welche den Einbau von MalA in die äußere Membran erschwert bzw. unmöglich macht. Aufgrund dessen konnte dadurch nicht überprüft werden, ob MalA die Funktion von LamB in *E. coli* übernehmen kann.

### **Acarbose hemmt die Maltodextrinaufnahme**

Ein weiterer Test, der einen Hinweis auf die Funktion von MalA liefert, war die Untersuchung der Bindung von Acarbose an MalA. Da es sich bei Acarbose um einen Inhibitor von Maltodextrin-Aufnahmesystemen handelt (Bischoff *et al.*, 1994) war die Möglichkeiten gegeben, durch Wettbewerbsversuche zu bestätigen, dass MalA einen Maltodextrinrezeptor darstellt.

Die Bindung von Acarbose an MalA wurde indirekt über Wachstumstests überprüft. Der zu untersuchende Stamm *C. crescentus* JS1003 wurde auf Minimalmedium mit verschiedenen Maltodextrinen als C-Quelle ausgesät und in die Mitte der Platte wurde ein Acarbose-enhaltendes Filterplättchen aufgelegt. Die Hemmung der Maltodextrinaufnahme durch Acarbose wurde durch Hemmhöfe bestimmt (3.2.3). Falls ein Hemmhof beobachtet werden konnte, sollte MalA eine Bindestelle für Maltodextrine besitzen.

Es zeigte sich, dass die Maltoseaufnahme des Wildtyps JS1003 durch Acarbose nicht beeinträchtigt wurde, wohingegen die Aufnahme von Maltotriose, -tetraose und -pentaose durch Acarbose verhindert wurde. Auch die *malA*-Mutante HB2003 konnte in Anwesenheit von Acarbose noch Maltose aufnehmen, jedoch mit Maltotriose und -tetraose nicht mehr wachsen. Ein Wachstum mit Maltopentaose war, wie erwartet, nicht mehr möglich, da Maltopentaose MalA-abhängig in die Zelle gelangt.

Dies bedeutete zum einen, dass Maltose vermutlich auch durch andere Nicht-Acarbose-bindende Membranproteine in die Zelle gelangen konnte, wodurch wiederum ein Hinweis gegeben war, dass *C. crescentus* Porine, die die reine Diffusion erlauben, besitzen muss. Außerdem könnte die Möglichkeit bestehen, dass Acarbose eventuell vorhandene Maltoserezeptoren nicht vollständig verschlossen hatte, so dass die verhältnismäßig kleinen Maltosemoleküle noch durch den Kanal gelangten.

Da gezeigt wurde, dass die Aufnahme von Maltopentaose von *C. crescentus* MalA-abhängig erfolgt und die Aufnahme der Maltopentaose durch Acarbose gehemmt wurde, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es sich bei MalA um einen Rezeptor handelt, der eine Affinität für Acarbose besitzt. Da außerdem bekannt ist, dass Acarbose an Maltodextrinrezeptoren bindet, handelt es sich bei MalA aus *C. crescentus* mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Membranrezeptor, der Maltodextrine spezifisch bindet und für deren Aufnahme verantwortlich ist.

Die Aufnahme von Maltotriose und -tetraose durch die *malA*-Mutante HB2003 wurde ebenfalls durch Acarbose gehemmt. Da diese Mutante allerdings kein MalA mehr besitzt, die

Aufnahme von Triose und Tetraose jedoch gehemmt werden kann, bedeutet dies, dass es neben MalA noch weitere Rezeptoren für Acarbose bzw. Maltodextrine bei *C. crescentus* geben muss, durch die kleinere Maltodextrine in die Zelle gelangen können. Dabei könnte es sich um Porine (reine Diffusionskanäle) handeln, die unspezifisch Acarbose binden und unbestimmte Substrate bis zur Ausschlussgröße des vorhandenen Kanals durchlassen oder aber um Porine, die eine spezifische Substratbindestelle aufweisen, wie in diesem Fall für Acarbose und kleinere Maltodextrine bis Maltotetraose, wodurch es sich dabei um ein Porine des LamB-Typs handeln könnte.

### **Titrationmessungen mit MalA**

Zur weiteren Überprüfung, ob MalA eine vermutete Bindestelle für Maltodextrine besitzt, wurden Titrationmessungen mit MalA in künstlichen Membranen durchgeführt. Dabei machte man sich die Eigenschaft zu nutze, dass der Ionenfluss durch die Pore unterbrochen ist, so lange ein Substratmolekül an die Bindestelle gebunden hat. Die Abnahme der Porenleitfähigkeit nach Zugabe von Maltose und Maltopentaose ergab, dass die untersuchten Maltodextrine eine Affinität zu MalA besitzen. Bei einer Endkonzentration von 300 mM Maltose waren nahezu 80 % der Poren geschlossen, wohingegen 10 mM Maltopentaose zu 10 % geschlossenen Poren führte (Abb. 16).

Maltose zeigte eine stärkere Reduktion der Porenleitfähigkeit als Maltopentaose. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Falle der Maltosetitration mit einer 1 M Stammlösung titriert wurde, wohingegen bei Maltopentaose eine 0,1 M Stammlösung eingesetzt wurde und somit die Maltosekonzentration während der Messung der Porenleitfähigkeit in einer höheren Konzentration vorlag als die der Maltopentaose.

Im Vergleich dazu zeigten Titrationversuche von LamB aus *E. coli* mit Maltotriose, dass es schon bei einer Konzentration von 50 mM Maltotriose zu einem vollständigen Verschluss der Poren kommt (Benz *et al.*, 1986). Bei MalA ergaben sich bei 50 mM Maltose 12 % geschlossene Poren. Insofern würde MalA aus *C. crescentus* eine geringere Affinität zu Maltodextrinen besitzen als LamB aus *E. coli*.

Wieder erwarten reduzierte auch Glucose bei einer Maltose vergleichbaren Konzentration die Porenleitfähigkeit. Dies könnte möglicherweise durch den ähnlich strukturellen Aufbau von Glucose und Maltose verstanden werden. Da Maltose ein Disaccharid aus zwei Glucoseeinheiten darstellt, wäre es denkbar, dass Glucose an MalA bindet. Der Nicht-Glucose verwandte Zucker Fructose zeigte dagegen keine Affinität zu MalA.

Durch Titrationsmessungen von MalA mit Acarbose, einem Inhibitor von Maltodextrin-aufnahmesystemen, sollten ebenfalls Hinweise auf die Maltodextrinrezeptorfunktion von MalA bekommen werden. Bei einer Zugabe von 33 mM reduzierte Acarbose die Porenleitfähigkeit. Da 33 mM eine für einen Inhibitor relativ hohe Konzentration darstellt, könnte abgeleitet werden, dass Acarbose keine hohe Affinität zu MalA besitzt. Entweder handelte es sich um eine eher unspezifische Bindung, die die Abnahme der Porenleitfähigkeit zur Folge hatte oder aber tatsächlich um eine spezifische Bindung, die allerdings erst mit höheren Konzentrationen von Acarbose messbar war. Letzteres würde auch durch das Ergebnis der Acarbose-Plättchentests bestätigt werden (Tab. 11), bei der eine hohe Acarbosekonzentration von 310 mM auf Filterplättchen eingesetzt wurde. Dabei konnten allerdings große Hemmhöfe von sechs cm beobachtet werden. Eventuell müsste man die Acarbosekonzentration beim Plättchentest erniedrigen und feststellen, bis zu welcher Konzentration die Maltodextrinaufnahme gehemmt werden kann. Da allerdings die Konzentration an Acarbose nur auf den Filterplättchen messbar ist, und die Acarbose nach Auflegen der Filterplättchen auf die Platte gleichmäßig in etwa 20 ml Agar diffundiert, ist es schwer, eine wirksame Konzentration an Acarbose festzustellen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit weshalb Acarbose oder auch Maltose erst in höheren Konzentrationen einen Bindungseffekt zeigten, ergibt sich vermutlich aus der bei den Titrationsmessungen vorliegenden Konformation von MalA. Durch die SDS-Behandlung liegt MalA wahrscheinlich nicht mehr vollständig in seiner natürlichen Konformation vor, wodurch eine Bindung der Substrate erschwert wurde und das Messergebnis somit keine eindeutige Aussage liefert.

Die Ergebnisse der Ionen-Selektivitätsmessungen ergaben, dass MalA einen Kationenselektiven Kanal bildet. Dieses Ergebnis konnte bei dem Maltoporin LamB ebenfalls beobachtet werden (Benz *et al.* 1987). Die Kationen-Selektivität deutet auf die Existenz von negativ geladenen Gruppen innerhalb des Kanals hin. Eventuell könnten Carbonylgruppen vorliegen, die an der Maltodextrinbindung durch Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind.

#### **4.3 Werden Maltodextrine über MalA Energie-abhängig aufgenommen?**

Cheng *et al.* (1995) und Reeves *et al.* (1996) identifizierten bei dem Gram-negativen anaeroben Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* zwei äußere Membranproteine, die für die Aufnahme der Mucopolysaccharide Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure bzw. für die Maltooligosaccharid- und Stärkeaufnahme verantwortlich sind. Dabei handelt es sich um das

nichtenzymatische Protein SusC, das für das Wachstum mit höheren Maltodextrinen und Amylose als einzige C-Quelle essentiell ist bzw. um das nichtenzymatische CsuF-Protein, welches das Wachstum mit Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure als einzige C-Quelle ermöglicht. Wie auch bei MalA, ist die Expression von SusC substratabhängig reguliert. 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 gelangen kann, kann vermutlich ausgeschlossen werden, dass es sich bei SusC um ein Porin handelt. Bei CsuF wird nur vermutet, dass es eine Substratbindestelle für Chondroitinsulfat besitzt. Obwohl *B. thetaiotaomicron* mit *E. coli* sehr weitläufig verwandt ist zeigte jeweils ein 60 Aminosäure umfassender Bereich von SusC bzw. CsuF erstaunlicherweise große Homologie zu TonB-abhängigen Eisenkomplex- bzw. Vitamin B<sub>12</sub>-Rezeptoren (49-66 %-ige Identität zu FepA, BtuB, CirA, IutA und FhuA aus *E. coli*). Somit könnten SusC und CsuF Membranproteine darstellen, die eventuell für eine TonB-abhängige Substrataufnahme verantwortlich sind.

Allerdings wurde bisher weder für SusC noch für CsuF eine TonB-Abhängigkeit nachgewiesen. Im Gegensatz zu MalA wurden die Proteine bislang nicht mit MALDI-TOF analysiert und dadurch als TonB-abhängige Rezeptoren definiert. Außerdem wurde im Vergleich zu MalA keine ExbBD-Abhängigkeit beschrieben.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei MalA um einen Membranrezeptor handelt, der für die Aufnahme von Maltodextrinen verantwortlich ist. Laut Datenbankvorhersage sollte es sich außerdem bei MalA um einen TonB-abhängigen Rezeptor handeln.

Von Interesse war nun, ob die Maltodextrinaufnahme tatsächlich Energie-abhängig erfolgt bzw. ob es sich bei MalA um einen TonB-abhängigen Rezeptor handelt. Hierzu wurde eine chromosomale Deletionsmutante in *C. crescentus* hergestellt, die das in der Datenbank als einziges mit „*tonB*“ bezeichnete Gen *cc2327* nicht mehr besaß. Da für *C. crescentus* viele TonB-abhängige Rezeptoren vorhergesagt werden, besteht durchaus die Möglichkeit, dass solch ein *tonB*-Deletionsmutante nicht lebensfähig ist. Es zeigte sich jedoch, dass die Abwesenheit von TonB keinen negativen Einfluß auf das Wachstumsverhalten hatte.

Zur Überprüfung der TonB-abhängigen Aufnahme der Maltodextrine wurden Wachstumstests mit Maltodextrinen auf Minimalmedium ohne C-Quelle durchgeführt. Falls das mutmaßliche TonB für die Maltodextrinaufnahme essentiell wäre, sollte im Vergleich zum Wildtyp die

*tonB*-Mutante HB2004 zumindest mit den größeren Maltodextrinen als alleinige C-Quelle auf Minimalmedium nicht mehr wachsen können. In den durchgeführten Wachstumstests mit Maltodextrinen zeigte die *tonB*-Mutante HB2004 jedoch Wildtyp-Verhalten (Tab. 12). Auch ohne das mutmaßliche TonB konnten alle getesteten Maltodextrine aufgenommen werden. Vorausgesetzt, es handelt sich bei CC2327 um dasjenige TonB, welches als Teil des TonB/ExbBD-Energietransduktionskomplexes die Energie aus dem elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran für Transportvorgänge über die äußere Membran zur Verfügung stellt, könnte daraus abgeleitet werden, dass die Maltodextrinaufnahme bei *C. crescentus* nicht Energie-abhängig erfolgt. Somit könnte es sich wie bei LamB auch bei MalA um ein Maltporin handeln, welches die erleichterte Diffusion von Maltodextrinen erlaubt. Dadurch wäre jedoch die Datenbankaussage bezüglich der TonB-abhängigen Rezeptorfunktion von MalA in Frage gestellt.

Für die Hypothese des Energie-abhängigen Maltodextrintransports spricht allerdings das Wachstumsverhalten der *exbBD*-Mutanten HB2006 und HB2007. In der Datenbank werden bei *C. crescentus* jeweils 2 Gene mit *exbB* und *exbD* bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit ist es allerdings nur gelungen, *exbB* (cc2336) und *exbD* (cc2335), welche sich in der Nähe des mutmaßlichen *tonB*-Proteins (cc2327) befinden, chromosomal auszuschalten. Mit Hilfe dieser Mutanten wurde auf eine weitere Weise der eventuell energieabhängige Maltodextrintransport überprüft, da es sich bei ExbB und ExbD um Proteine handelt, welche zusammen mit TonB den für den aktiven Transport über die äußere Membran notwendigen strukturellen und funktionellen Energietransduktionskomplex bilden.

Waren *exbB* und *exbD* deletiert, so konnte ein verändertes Wachstumsverhalten mit Maltodextrinen als alleinige Kohlenstoffquelle auf Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Tab. 13). Das Wachstumsverhalten glich dem der *malA*-Mutante HB2003, die Maltotriose und –tetraose vermindert und Maltopentaose und –hexaose nicht mehr aufnehmen konnte. Somit erfolgte die Maltodextrinaufnahme ExbBD-abhängig.

Dies zeigte außerdem, dass die in der Datenbank vorhergesagten Proteine ExbD/TolR (CC3232) und MotA/TolQ/ExbB (CC3233) die Funktion von ExbBD (CC2335-2336) nicht ersetzen konnten.

Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei diesen ausgeschalteten ExbBD-Proteinen tatsächlich um Proteine handelt, welche eine Rolle bei der Energietransduktion für den äußeren Membrantransport spielen, so kann aus den Ergebnissen der Wachstumstests die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Maltodextrine (zumindest größere Maltodextrine)

Energie-abhängig in die Zelle transportiert werden. Da es relativ unwahrscheinlich erscheint, dass ExbB und ExbD die Energie auch ohne ein vorhandenes TonB an den äußeren Membranrezeptor direkt übertragen können, ist es denkbar, dass ein anderes TonB die Funktion der Energietransduktion übernimmt.

Ein diese Funktion besitzendes Protein könnte ein homologes Protein zu TolA sein, welches in *E. coli* zusammen mit TolQR und PAL neben TonB/ExbBD das zweite Proteinsystem darstellt, das die Energie des elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran für energieverbrauchende Aufnahmeprozesse der äußeren Membran nutzbar macht (Cascales *et al.*, 2002), jedoch keinen Substratimport katalysiert. In der Datenbank wird für *C. crescentus* kein TolA vorhergesagt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Homologievergleiche (Tab. 19) ergaben jedoch, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit bei CC3231 um ein TolA-homologes Protein handelt. CC3231 wies eine 43 %ige Homologie zu dem mutmaßlichen TolA-Protein aus *Agrobacterium tumefaciens* auf. Demzufolge könnte es sich bei den unmittelbar angrenzenden Genen *cc3232-3233*, die in der Datenbank mit „ExbD/TolR family protein“ bzw. „MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein“ bezeichnet werden, wahrscheinlich um TolR bzw. TolQ handeln.

Da das Tol-Pal-System in *E. coli* außerdem eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellstabilität der äußeren Membran besitzt, wäre dies eine Erklärung dafür, warum es nicht möglich war, in *C. crescentus* die potentiellen TolQR-Gene chromosomal auszuschalten. Dies würde ebenfalls die Annahme unterstützen, dass es sich bei CC3232 um TolR und bei CC3233 um TolQ handelt.

Da das mutmaßliche TolA eine relativ hohe Homologie (50 %) zu CC2327 (TonB) aufweist, könnte TolA eventuell die Funktion von TonB ersetzen. Um zu überprüfen, ob das mutmaßliche TolA die Funktion der Energietransduktion besitzt, könnte versucht werden, TolA chromosomal auszuschalten und das Wachstumsverhalten der resultierenden Mutante zu untersuchen. Es würde sich anbieten Wachstumstests bei Eisenmangel bzw. mit Maltodextrinen durchzuführen. Eventuell müsste man allerdings eine alternative Methode zur Inaktivierung von TolA wählen, da es sich bei CC3231 (TolA) vermutlich auch wie bei CC3232 (TolR) und CC3233 (TolQ) um ein essentielles Gen handelt. Es könnte versucht werden, das essentielle Gen über Anti-sense-RNA in einen induzierbaren *Caulobacter*-Vektor zu klonieren. Die durch Induktion synthetisierte Anti-sense-RNA würde an die komplementäre mRNA des Wildtyp-Gens binden und dadurch die Synthese des

auszuschaltenden Proteins unterbinden. Somit könnte durch kontrollierte Expression das Verhalten der Mutante studiert werden.

Da für TolA allerdings nur eine Transportfunktion für den Import von A-Colicinen und den Export von Zellhüllenkomponenten beschrieben wurde (Lazdunski *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2000), besteht die Möglichkeit, dass neben TonB und dem mutmaßlichen TolA eventuell noch mindestens ein weiteres „TonB“ in *C. crescentus* vorhanden ist, welches die Funktion der Energietransduktion besitzen oder übernehmen könnte.

In den meisten Gram negativen Bakterien wie z. B. bei *E. coli* ist nur ein TonB-Protein bzw. TonB/ExbBD-System vorhanden, welches neben TolA die Energie für Transportvorgänge über die äußere Membran zur Verfügung stellt. Jedoch gibt es einige Organismen, die mehrere TonB- bzw. TonB-ähnliche Proteine aufweisen. Das mutmaßliche TonB (CC2327) aus *C. crescentus* ist z. B. zu XAC3362 homolog, einem TonB-ähnlichen Protein aus *Xanthomonas axonopodis*. Diesem Organismus werden zwei TonB-Proteine und drei „TonB-like“ Proteine vorhergesagt (GenBank accession no. NC\_003919). CC2327 zeigt weiterhin Homologie zu XF2287, einem TonB-Protein aus *Xylella fastidiosa*. Neben diesem TonB-Protein werden bei *X. fastidiosa* noch weitere 4 Proteine mit TonB-Protein bezeichnet (<http://www.lbi.ic.unicamp.br/xf>). Occhino *et al.* (1998) zeigte, dass in *Vibrio cholerae* zwei TonB/ExbBD-Systeme für die Aufnahme von Häm existieren. Desweiteren gibt es Hinweise, dass *Vibrio anguillarum* zwei funktionelle TonB-Systeme besitzt (Mourino *et al.*, 2004). Energie-transduzierende Funktionen wurden außerdem für drei Proteine aus *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Poole *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004). TonB1 und TonB2 sind am energieabhängigen Transport von Eisen und Häm beteiligt, wohingegen TonB3 am energieabhängigen Pilitransport zur äußeren Membran beteiligt ist.

Aufgrund dessen wäre es denkbar, dass auch in *C. crescentus* mehr als ein TonB-Protein existiert, welches aktive Transportvorgänge über die äußere Membran ermöglicht.

Das Protein, welches dafür in Frage kommen könnte wäre CC3508. Es zeigt mit 58 % die größte Homologie zum mutmaßlichen TonB CC2327, ist in der Datenbank bezüglich seiner Funktion jedoch nicht näher charakterisiert. Um zu überprüfen, ob CC3508 eine TonB-Funktion besitzt, die eventuell den Maltodextrintransport ermöglicht, sollte eine chromosomale *cc3508*-Deletionsmutante in *C. crescentus* hergestellt werden und Wachstumstests durchgeführt werden.

Da die TonB-Funktion des Proteins CC2327 bislang nicht experimentell bestätigt wurde, könnte andererseits vermutet werden, dass CC2327 keine TonB-Funktion besitzt. Aufgrunddessen könnte das Wildtyp-ähnliche Wachstumsverhalten der *tonB*-Mutante HB2004 bezüglich TonB-abhängige Maltodextrinaufnahme nicht interpretiert werden.

Die Ergebnisse des Komplementationsversuches einer *E. coli tonB*-Mutante mit TonB und ExbBD aus *C. crescentus* ergaben, dass TonB aus *C. crescentus* die Funktion von TonB in *E. coli* nicht ersetzen kann (3.3.1). Da *C. crescentus* und *E. coli* phylogenetisch jedoch nicht sehr nah miteinander verwandt sind und die Homologie der TonB-Proteine von *E. coli* und *C. crescentus* nur 40 % beträgt, kann dies nicht als Beweis angesehen werden, dass CC2327 keine TonB-Funktion besitzt.

Desweiteren sollten Einzelkanalmessungen mit MalA an künstlichen Membranen Aufschluß über einen eventuell TonB-abhängigen Rezeptor geben (3.2.4.5). Im Falle 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 wie z. B. OmpF, OmpC und PhoE von *E. coli* 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). Falls MalA die Funktion eines TonB-abhängigen Rezeptors besitzt, hätte keine Leitfähigkeit beobachtet werden sollen.

Das mittels SDS aus der äußeren Membran herausgelöste und über Ni-NTA-Spin-Säulen gereinigte MalA 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. 14).

Wenn man davon ausgeht, dass MalA während der Messung in seiner nativen Form vorgelegen hat, würde dies bedeuten, dass es sich bei MalA um keinen TonB-abhängigen Rezeptor handelt. Stattdessen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass MalA ein kanalbildendes Porin darstellt. Eine ausgeprägte stufenartige Zunahme der Leitfähigkeit wie sie bei klassischen Porinen Gram-negativer Bakterien gefunden werden kann, war jedoch nicht sichtbar. Dies deutet eventuell auf einen instabilen Kanal hin, bei dem freie „loops“ von MalA in den Kanal rein und wieder raus schwingen und dadurch die Leitfähigkeitsmessung beeinflussen. Desweiteren könnte der „zappelige“ Anstieg auf eventuelle Verunreinigungen schließen lassen, die die Leitfähigkeit des Kanals negativ beeinflussen. Andererseits könnte

das Ergebnis darauf hindeuten, dass es sich bei MalA um kein klassisches Porin handelt, da eine ausgeprägte stufenartige Leitfähigkeitserhöhung nicht beobachtet wurde.

Damit Mess-Artefakte ausgeschlossen und das Ergebnis der Einzelkanalmessung reproduziert werden konnte, sollten Einzelkanalmessungen von weiteren aufgereinigten MalA-Proteinen durchgeführt werden, die durch alternative Detergenzien aus der äußeren Membran gelöst worden waren. Eventuell führte das in erster Messung verwendete relativ starke Detergenz SDS zu einer Konformationsänderung von MalA, die eine Permeabilität für Ionen gewährleistete und somit zur Leitfähigkeitserhöhung führte. Es gestaltete sich jedoch schwierig, MalA mit Hilfe anderer Detergenzien als SDS aus der Membran zu lösen (Abb.12). Neben SDS war nur noch Harnstoff in der Lage, MalA aus der äußeren Membran zu solubilisieren. Das mit Harnstoff solubilisierte und über Ni-NTA gereinigte MalA war in Einzelkanalmessungen jedoch nicht mehr aktiv. Das Ergebnis der Einzelkanalmessung entsprach dem der Vektorkontrolle und stellte Leitfähigkeitserhöhungen von Porinverunreinigungen dar. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das mit Harnstoff solubilisierte MalA in der Messkammer für Einzelkanalmessungen nicht mehr renaturierte und ein Einbau in die künstliche Lipid-Doppelmembran verhindert wurde. Dieses für klassische Porine untypische Verhalten würde die Annahme unterstützen, dass es sich bei MalA um ein nicht-klassisches Porin handelt. Andererseits könnte man sich vorstellen, dass im Gegensatz zu den relativ kleinen (40 kDa), leicht renaturierenden klassischen Porinen OmpF und OmpC, MalA mit 99 kDa ein so großes Porin darstellt, bei dem die Renaturierung erheblich aufwendiger ist und bestimmte Pufferbedingungen voraussetzt, die in der Messkammer nicht vorgelegen haben. Eventuell müssten hier optimale Renaturierungsbedingungen etabliert werden.

Idealerweise hätte das direkt aus *C. crescentus* gereinigte MalA auf Einzelkanalmessung untersucht werden sollen. Aufgrund einer anderen Membranzusammensetzung von *C. crescentus* wäre es vorstellbar, mildere Detergenzien als SDS und Harnstoff zur Solubilisierung von MalA aus der Membran einzusetzen, die die Proteinstruktur von MalA weniger angreifen als SDS und Harnstoff. Eine anschließende Porenleitfähigkeitsmessung hätte somit unter nativeren Bedingungen durchgeführt werden können. Die Klonierung und Expression von MalA in *Caulobacter* schlug jedoch mangels geringer Klonierungseffizienz fehl, so dass das Ergebnis der Einzelkanalleitfähigkeitsmessung des durch SDS solubilisierten MalA-Proteins durch Messungen eines alternativ gereinigten MalA-Proteins nicht bestätigt werden konnte.

#### 4.4 Hinweise für das Vorhandensein eines weiteren TonB-Proteins

Wachstumsexperimente mit *exbBD*-Mutanten in *C. crescentus* ergaben, dass Maltodextrine Energie-abhängig in die Zelle aufgenommen werden. Da das mutmaßliche TonB vermutlich für den Transport nicht allein verantwortlich ist, wird vermutet, dass es mindestens ein weiteres TonB geben könnte, welches zusammen mit ExbB und ExbD die notwendige Energie für den Transport zur Verfügung stellt.

Diese Hypothese kann durch die Ergebnisse der Wachstumstests unter Eisenmangel (3.3.2) und der Siderophoraufnahme (3.3.3) unterstützt werden.

Wurde die *tonB*-Mutante HB2004 unter Eisenmangelbedingungen angezogen, so konnte ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstumsverhalten beobachtet werden (Abb.17). Auch ohne das mutmaßliche TonB konnte eine für das Wachstum ausreichende Eisenversorgung erfolgen. Unter der Annahme, dass die Eisenaufnahme TonB-abhängig erfolgt (Braun, 1995) lassen diese Beobachtungen vermuten, dass es neben dem mutmaßlichen TonB noch mindestens ein weiteres TonB-Protein geben muss, welches die für die Eisenaufnahme notwendige Energie zur Verfügung stellen kann.

Im Gegensatz zur *tonB*-Mutante HB2004 zeigten die *exbBD*-Mutanten HB2006 und HB2007 unter Eisenmangelbedingungen ein langsames und schwächeres Wachstumsverhalten. Dieses Ergebnis legte nahe, dass das mutmaßliche ExbB- und ExbD-Protein an der Eisenaufnahme beteiligt ist. Das noch mögliche, allerdings schwächere Wachstum könnte eventuell durch diffundierte Eisensiderophorkomplexe erfolgt sein oder aber durch homologe TolQ- und TolR-Proteine, die die Funktion ähnlich in *E. coli* (Braun und Herrmann, 1993) von ExbBD zu gewissem Maße übernommen haben könnten.

Desweiteren legten Tests zur Siderophoraufnahme nahe, dass *C. crescentus* neben dem mutmaßlichen TonB mindestens ein weiteres Protein zur Energietransduktion besitzen muss. Die Siderophore Rhodotorulasäure und Desferal, welche bei *E. coli* TonB-abhängig aufgenommen werden konnten von *C. crescentus* zur Eisenaufnahme verwendet werden (Tab. 17). Sowohl der Wildtyp JS1003 als auch die *tonB*-Mutante HB2004 konnten die Siderophore zur Eisenaufnahme nutzen. Dies war an Wachstumshöfen um Siderophor enthaltene Filterplättchen auf Minimalagarplatten ohne Eisenzusätze sichtbar (Tab. 18). Wenn man auch hier davon ausgehen kann, dass *C. crescentus* die getesteten Siderophore TonB-abhängig in die Zelle transportiert, deutet dieses Ergebnis auf das Vorhandensein eines weiteren TonB-Proteins hin.

Hingegen wurden die Siderophore Rhodotorulasäure und Desferal von den *exbBD*-Mutanten HB2006 und HB2007 im Vergleich zum Wildtyp und der *tonB*-Mutante in reduziertem Maß aufgenommen, was an kleineren oder nicht vorhandenen Wachstumshöfen erkennbar war.

Dies bedeutete, dass ExbB und ExbD auch an der Siderophoraufnahme beteiligt waren. Da ein Wachstum ohne ExbBD allerdings noch in reduziertem Maße möglich war, kann dadurch ebenfalls vermutet werden, dass es homologe TolQR-Proteine in *C. crescentus* geben muß, die die Funktion von ExbBD zumindest teilweise übernehmen können. Der Datenbank und Kapitel 3.3.5 zu Folge könnte es sich hierbei um die Proteine CC3232 und CC3233 handeln.

#### 4.5 Hypothese zur Funktion von MalA

Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Daten kann MalA eine Rezeptor- und Aufnahmefunktion für Maltodextrine zugeschrieben werden. Kleinere Maltodextrine wie Maltose, Maltotriose und –tetraose können MalA-unabhängig in die Zelle gelangen, wohingegen die Maltopentaose- und –hexaoseaufnahme das Vorhandensein von MalA voraussetzt. Die in der Datenbank für MalA vorhergesagte TonB-Abhängigkeit konnte durch die beschriebenen Ergebnisse jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Die Maltodextrinaufnahme erfolgte auch ohne das mutmaßliche TonB CC2327 im Gegensatz zu den ExbBD-Proteinen, die für die Maltodextrinaufnahme essentiell waren, was vermutlich doch auf einen Energie-abhängigen Transport hindeutet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Einzelkanalmessungen, die für MalA einen Kanal vorhersagen, könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei MalA um ein Rezeptorprotein in der äußeren Membran handelt, welches Maltodextrine spezifisch bindet und die erleichterte Diffusion von kleineren Maltodextrinen erlaubt und zusätzlich größere Maltodextrine TonB-abhängig in die Zelle transportiert. In diesem Fall wäre MalA das erste Protein, dem eine Transportfunktion für ein anderes Substrat als Eisen zugeordnet werden kann. Aufgründessen sollte sich die weitere Arbeit auf das Auffinden eines weiteren TonB-Proteins konzentrieren.

## 5. Zusammenfassung

Die Genomsequenz von *Caulobacter crescentus* sagt 65 TonB-abhängige Membranrezeptoren voraus, die nicht alle für die Eisenversorgung zuständig sein können. In dieser Arbeit wurde versucht, ein Membranprotein in *C. crescentus* zu identifizieren, dem eine Transportfunktion für andere Substrate als Eisen zugeordnet werden kann.

Nach Anzucht von *C. crescentus* in verschiedenen Medien konnte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in der äußeren Membran ein Protein indentifiziert werden, dessen Expression durch Maltose induziert wurde. MALDI-TOF-Analysen des mit MalA bezeichneten Proteins ergaben, dass es sich dabei um ein TonB-abhängiges Protein handeln sollte, dessen Funktion bisher nicht näher beschrieben wurde.

Zur Charakterisierung von MalA wurde eine chromosomale *malA*-Deletionsmutante in *C. crescentus* hergestellt. Das Wachstumsverhalten dieser Mutante mit Maltodextrinen als alleinige C-Quelle bewies, dass MalA für die Aufnahme von Maltodextrinen verantwortlich ist. Kleinere Maltodextrine wie Maltose, Maltotriose und -tetraose können noch mittels Diffusion über reine Porine in die Zelle gelangen, wohingegen die größeren Maltodextrine wie Maltopentaose und -hexaose MalA-abhängig aufgenommen werden.

Die vorhergesagte TonB-Abhängigkeit von MalA konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden. Die zur Überprüfung hergestellte *tonB*-Deletionsmutante in *C. crescentus* zeigte bezüglich des Wachstums mit Maltodextrinen als alleinige C-Quelle Wildtyp-Verhalten. Desweiteren deuteten Einzelkanalmessungen von MalA auf ein porenbildendes, nicht TonB-abhängiges Protein hin.

Dagegen sprechen Wachstumstests mit Maltodextrinen als alleinige C-Quelle, die mit hergestellten ExbBD-Mutanten von *C. crescentus* durchgeführt wurden, für eine ExbBD- bzw. Energie-abhängige Maltodextrinaufnahme. Aufgrunddessen könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass *C. crescentus* neben dem mutmaßlichen TonB mindestens ein weiteres TonB-Protein besitzen muss. Dafür sprechen außerdem Wachstumstests der *tonB*- und *exbBD*-Mutanten unter Eisenmangelbedingungen sowie Siderophoraufnahmetests. Das Wachstum unter Eisenmangelbedingungen sowie die Aufnahme von Rhodotorulasäure und Desferal erfolgte bei *C. crescentus* TonB-unabhängig und ExbBD-abhängig.

Durch Homologievergleiche konnte in *C. crescentus* ein potentiell Tol-PAL-Cluster identifiziert werden, welches teilweise die energietransduzierende Funktion des TonB/ExbBD-Komplexes ersetzen könnte.

## 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
- Bassford, P.J., Jr., Bradbeer, C., Kadner, R.J., and Schnaitman, C.A. 1976.** Transport of vitamin B<sub>12</sub> in *tonB* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**:242-247
- Benz, R., Janko, K., Boos, W., und Lauger, 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-Scherperkeuter, 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
- Benz, R. 1994.** Solute uptake through bacterial outer membranes. In *Bacterial Cell Wall* (Ghuysen, J.M. & Hakenbeck, R., eds), 397-423. Elsevier Science, Amsterdam
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S., und Llobes, R. 1998** *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**:4872-4878
- 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
- Bischoff, H., Ahr, H.J., Schmidt, D., Stoltefuß, J. 1994.** Acarbose, ein neues Wirkprinzip in der Diabetestherapie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **11**: 1119-1128
- 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. 1985.** The iron-transport systems of *Escherichia coli*. In *The enzymes of biological membranes* (Martonosi, A., ed.), Volume 3, Plenum Press, New York, USA, **11**: 617-652
- Braun, V., Bos 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, T.F., Poulson, S., Gully, J.B., Courtney Empey, J., van Way, S., Putnam, A., and 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., Hantke, K. und Köster, W. 1998.** Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. In *Metal Ions in Biological Systems*, 35. Iron Transport and Storage in Microorganisms. Sigel, H. (eds). New York: Marcel Dekker, pp.67-145
- Braun, V., R. E. W. Hancock, K. Hantke, and A. Hartmann 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 Hantke, K. 2002.** Bacterial iron transport. In: *Molecular and cellular iron transport*. (D.M. Templeton, ed.) Wiley-VCH, Weinheim, pp. 289-426
- 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. 1995.** 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, 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
- 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 membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**:56-63
- 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
- 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. 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., 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

- Cheng, Q., Yu, M.C., Reeves, A.R., und Salyers, A.A. 1995.** Identification and characterization of a bacteroides gen, *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
- 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
- Delcour, A.H., 2003.** Solute uptake through general porins. *Front. Biosci.* **8**:d1055-71
- Derouiche, R., Benedetti, H., Lazzaroni, J.C. Lazdunski, C., und Llobes, 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
- 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., Coulton, J.W., Diederichs, K., und Welte W. 2001B.** The ferric hydroxamate uptake receptor FhuA and related TonB dependent transporters in the outer membrane of gram-negative bacteria. In *Handbook of Metalloproteins*. Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., und Wieghardt, K. (eds) John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 834-849
- 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
- Gorg, A., Postel, W., und Gunther, S. 1988.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546
- Hanahan, D. 1983.** Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**: 557
- Hantke, K., und Braun, V. 2000.** The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In *Bacterial stress responses*. Storz, G., and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington DC, pp 275-288
- 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 B<sub>12</sub> receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**:904-908
- 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 B<sub>12</sub> 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
- 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

- 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
- Krieger-Brauer, H.I. 1979.** Die Funktion des Lambda-Rezeptors in der Aufnahme von Maltotriose. *Diplomarbeit*, Tübingen
- Krone, W.J.A., Stegehuis, F., Koningstein, G., van Doorn, C., Roosendaal, B., de Graaf, F.K., und Oudega, B. 1985.** Characterization of the pColV-K30 encoded cloacin DF13/aerobactin outer membrane receptor protein of *Escherichia coli*; isolation and purification of the protein and analysis of its nucleotide sequence and primary structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**:153-161
- 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
- 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
- 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
- Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., Van der Hoek, P., und Van Alpen, L. 1975.** Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12 into four bands. *FEBS Lett.* **58**: 254-258
- 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
- Luria, S.E., und Delbrück, M. 1943.** Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**:491-511
- 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
- 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
- Molloy, M.P., Phadke, N.D., Maddock, J.R., und Andrews, P.C. 2001.** Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* **22**:1686-1696
- 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
- 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
- Nikaido, H. 1996A.** Outer membrane. In *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Neidhardt F. (ed) ASM Press, Washington DC, pp.29-47
- 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
- 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., und Kadner, R.J. 2003.** Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**:869-882
- 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
- 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
- Rabilloud, T. 1992.** A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* **13**: 429-439
- 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
- 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
- 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
- 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. 1998.** 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
- Schulz, G.E. 2000.**  $\eta$ -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
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, 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
- Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D.D., und Wingerder, W. 1981.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**: 744-761
- 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
- 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

Anhang 1: Schematische Darstellung der Herstellung der chromosomalen Mutanten in *C. crescentus*

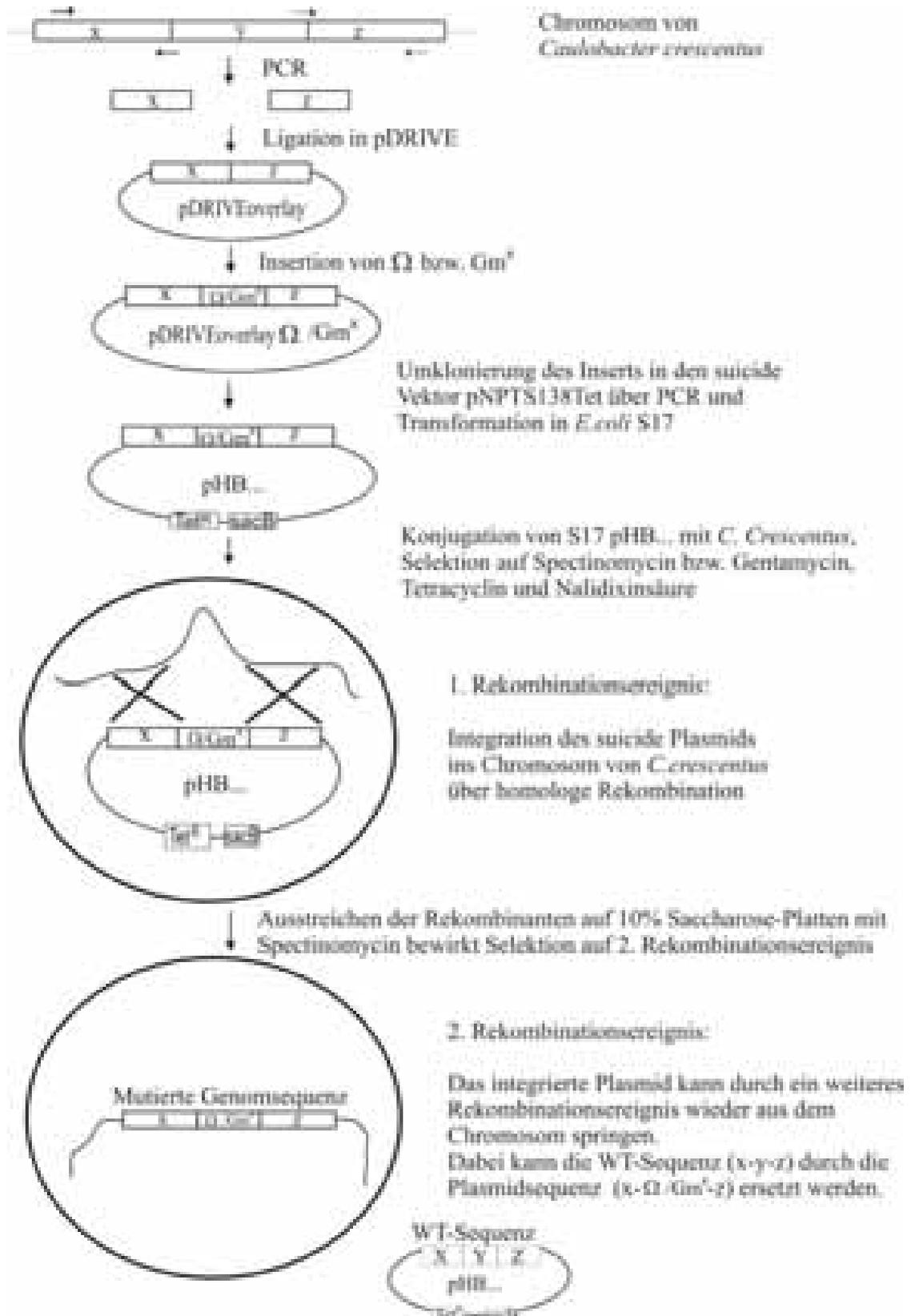


Abb. 18: Schematische Darstellung der Herstellung der chromosomalen Mutanten in *C. crescentus*. 'y' bezeichnet das zu deletierende Gen, 'x' und 'z' die jeweils angrenzenden Gene.

**Anhang 2: Sequenzvergleich der TonB-Proteine von *C. crescentus* und *E. coli***

```

CCTonB      MALALNPNGFGIPGLDNPPPKPAKVVLLIGLVSGALHIALIGYLAYQKWTQPLPLMSPDT 60
EcTonB      MTLDLPRR-----FPWPTLLSVCIHGAVVAGLLYTSVHQVIELPAPAQPISVTMVT 52
             *:* * . * * . * : * *:* * : : : : *::: .

CCTonB      GFIVETVPLTPKPPPPSPPEKPPAAAAAPK---LHIPAPTPLETPPP-----LFADPR- 111
EcTonB      ADLEPPQAVQPPPEPVVEPEPEPEPIPEPPKEAPVVIEKPKPKPKPKPKPKVKKVQEQPKR 112
             . : . . : * * * * * : * * . . ** : * * . * * : : * :

CCTonB      -IIPAGPTTTPGVTTLAPAATTPSPPPQPPPKVITRANWQRIPSADEMARYYPESAQRG 170
EcTonB      DVKPVESRPASPFENTAPARLTSSTATAATSKPVTSVASGPRALSRNQPO-YPARAQALR 171
             : * . . . : * . . * * * * . . . . * : * . . : : : * * **

CCTonB      LSGQVTLNCMVALNGTVRDCVATESPADEGFGSAALKISRFFKMKPQTENGDPVDGATV 230
EcTonB      IEGQVKVKFDVTPDGRVDNVQILSAKPANM-FEREVKNAMRRWRYEP----GKPGSGIVV 226
             : . * * . : : * : * * : : : . * * : * . : * : : * * . * . *

CCTonB      RIPIRFNAGA--- 240
EcTonB      NILFKINGTTEIQ 239
             . * : : * . :

```

CCTonB bezeichnet das mutmaßliche TonB-Protein CC2327 aus *C. crescentus*. EcTonB bezeichnet das charakterisierte TonB-Protein aus *E. coli*.

**Anhang 3: Sequenzvergleich der ExbB-Proteine von *C. crescentus* und *E. coli***

```

CcExbB      MLDIKRKTFFIALVGMALMASAPAFQAQDAAAPAAATAEAQPATDAAAAPAADAAAAAPA 60
EcExbB      -----

CcExbB      PEAAPAEAAAAPAAHSLTPIGMFMQAGVVVKVVMIGLVLASVFSWVLLLTKEFEFAALNK 120
EcExbB      -----MGNNLMQTDLSVWGMQHADIVVKCVMIGLILASVVTWAIFFSKSVEFFNQKR 53
             . * : * * : * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CcExbB      QSDKFLEAFRGARSIADIARISSEEFEGNPMADMAAAAASQVELSRQAGLAVAGEHRDS 180
EcExbB      RLKREQQLLAEARSLNQANDIAADFGSK-SLSLHLLNEAQNELELSEGS-----DDNEG 106
             : . : : * * * : * : . : . : * . * * * * . : : . . .

CcExbB      TLSRATYAINAVQSSSLAKRLSGGMVFLASVSGGPFIFGLFGTVYGIMTSFIGIANTNTTN 240
EcExbB      IKERTSFRLEERRVAAVGRQMGRGNGYLATIGAI SPFVGLFGTVWGMNSFIGIAQTQTTN 166
             . * : : : : : : : . * : * * : * : * * * * * * * * * * * * * * *

CcExbB      LAVVAPGIAEALLATGIGLFAAIPAVIFYNFQTRISAYGTRSEGFVAELMNAISRQLDK 300
EcExbB      LAVVAPGIAEALLATAIGLVAAIPAVVIYNV FARQIGGFKAMLDVAAQVLLQLSRDLDL 226
             * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CcExbB      GA----- 302
EcExbB      EASAAHPVRAQKLRAG 244
             *

```

CcExbB bezeichnet das mutmaßliche ExbB-Protein CC2336 aus *C. crescentus* und EcExbB bezeichnet das charakterisierte ExbB-Protein aus *E. coli*.



**Anhang 6:** Sequenzvergleich der TolQ-Proteine von *C. crescentus* und *E. coli*

```

CcTolQ      MDAAAAAPNFSFFALFMQADWVVKSMIGLILASLGSWAVILDKLFRFQALNRAANRFEE 60
EcTolQ      -----MTDMNILDLFLKASLLVKLIMLILIGFSIASWAI IQRTRILNAAAREAEAFED 54
             .:.:.: *.:.*. :.* :.* ** *.:**.*.:.: :.* * *.: **.:

CcTolQ      QVSGGRSLEDVAGEAGANPRHALPRMLQAALKKEWRDAKSKGAMSETQAGFLIARIDRILD 120
EcTolQ      KFWSGIELSRLYQES-QGKRDNLTGSEQIFYSGFKEFVRLHRANSHAPEAVVEGASRAMR 113
             :. .* *. : * : . * . * . * . :.: . . :. : * :

CcTolQ      TQIARETTKVEEGLGSLAIVATASPFIFLFGTVWGMHAFQNIALSKNKTS LAVVAPSIAE 180
EcTolQ      ISMNRELENLETHIPFLGTVGSISPYIGLFGTVWGMHAFIALGAVKQATLQMVAPGIAE 173
             .: ** :.* : * . *.: **:*:*:*:*:*:*:*:* * . *.:.* :**.***

CcTolQ      ALFATAIGLIAAIPAYIAYNKFSTDAGKYAGRLEGFADDLSTAIQRRLAERV----- 232
EcTolQ      ALIATAIGLFAAIPAVMAYNRLNQRVNKLELNYDNFMEEFTAILHRQAFTVSESNGK 230
             **:*:*:*:*:*:* *:*:*:. . .* . :.* :.:.: :*.:

```

CcTolQ bezeichnet das mutmaßliche TolQ-Protein CC3233 aus *C. crescentus* und EcTolQ bezeichnet das charakterisierte TolQ-Protein aus *E. coli*.

**Anhang 7:** Sequenzvergleich der TolR-Proteine von *C. crescentus* und *E. coli*

```

CcTolR      MAMSSNDAFATGGRRGRRRRGRRSRGALSEINVTPLVDVMLVLLIIFMISAPLLTAGVPLE 60
EcTolR      -----MARARGRGRDLKSEINIVPLLDVLLVLLIIFMATAPIITQSVEVD 46
             . * ** * . ***:**:*:*:*:*:* *:*:* * . * :

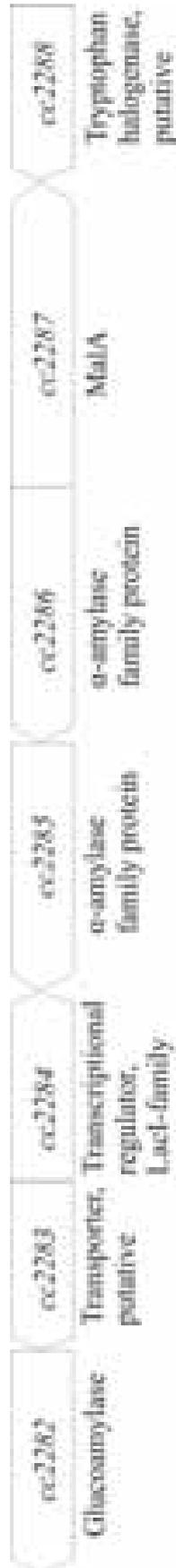
CcTolR      LP-KTEAAALQNQDEP-ITVSIRKDGQIFVGETEIPFENLAPR--IGAIAGDGYDKPIFV 116
EcTolR      LPDATESQAVSSNDNPPVIVEVSGIGQYTVVVEKDRLERLPPEQVVAEVSSRFKANPKTV 106
             ** **.: *.:*:*:* : *.: ** * : :*.*.*. . :.: : * *

CcTolR      RADGGATYAVVAQVMAGLSNAGFNKINLITETGGPSTGAAPRDAQPEGAADLRPAQ 172
EcTolR      FLIGGAKDVPYDEI IKALN-----LLHSAGVKS VGLMTQPI----- 142
             ***. . :.: .* . * :.* *.* .:

```

CcTolR bezeichnet das mutmaßliche TolR-Protein CC3232 aus *C. crescentus* und EcTolR bezeichnet das charakterisierte TolR-Protein aus *E. coli*.

**Anhang 8:** Genanordnung in der Region von *malA* bei *C. crescentus*



## 8. Abkürzungen

2-D	zweidimensional
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indolyl-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CC	<i>Caulobacter crescentus</i>
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxypropansulfonat
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
dest.	destilliert
Dip	Dipyridyl
DiphPC	Diphytanoyl-Phosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDDA	Ethylendiaminodiacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Leitfähigkeit
Gm	Gentamycin
h	Stunde
IPG	Immobiliner pH-Gradient
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo-
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$K_M$	Michaeliskonstante
Km	Kanamycin
l	Liter
LDAO	N-N-Dimethyldodecylamin-N-oxid
$\mu$	Mikro-
M	Molar
M2-CAS	Minimalmedium M2G ohne Eisenzusatz mit Casamminosäuren
M2G	Minimalmedium mit Glucose
M2M	Minimalmedium mit Maltose

m	Milli, Meter
mA	Milliampère
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Salz
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
ns	Nanosekunde
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>578</sub>	Optische Dicht bei 578 nm
OG	Octylglycosid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
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
TY	Trypton, Hefeextrakt
u.a.	unter anderem
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
V	Volt
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

### Aminosäuren

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

**Nukleotide**

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Heidi Neugebauer geb. Brand
Geburtsdatum	04.04.1976
Geburtsort	Leonberg
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

Sep. 1982- Dez. 1985	Grundschule (Haidachschule) in Pforzheim
Jan. 1986- Jul. 1986	Grundschule (Karl-Friedrich-Schule) in Pforzheim-Eutingen
Sep. 1986- Jul. 1995	Hilda-Gymnasium in Pforzheim, Abschluss: Abitur

## Hochschulbildung

Okt. 1995	Beginn des Biologiestudiums an der Universität Tübingen
Jul. 1997	Diplomvorprüfung
Mär. 2000- Dez. 2000	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie/Membranphysiologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun Thema: <i>Identifikation von Regionen in FecR, die mit FecA im Eisen(III)citrattransportsystem bei Escherichia coli K-12 interagieren</i>
Dez. 2000	Diplomprüfung
Jan. 2001- Okt. 2004	Dissertation am Institut für Mikrobiologie/Membranphysiologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun Thema: <i>Identifizierung eines Maltodextrinrezeptors in der äußeren Membran von Caulobacter crescentus</i>
seit Apr. 2001	wissenschaftliche Koordinatorin des Graduiertenkollegs Infektionsbiologie der Universität Tübingen, Sprecher Prof. Dr. F. Götz